ANA PAULA CARNEIRO DOS SANTOS

**Participação da via de sinalização da β -arrestina na produção de
óxido nítrico induzido pelo *shear stress***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Ana Paula Carneiro dos

Participação da via de sinalização da β -arrestina na produção de óxido nítrico induzido pelo *shear stress* / Ana Paula Carneiro dos Santos. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Arrestina 2.Óxido nítrico 3.Células endoteliais 4.Estresse mecânico 5.Mecanotransdução celular 6.Endotélio vascular

USP/FM/DBD-387/14

*Dedico esse trabalho a minha mãe Adagmar,
pelo exemplo de vida, amor e incentivo de todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de maneiras diferentes, contribuíram para este trabalho:

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência e por todo o conhecimento a mim transmitido.

À **Dra. Miriam Fonseca Alaniz**, pelo apoio científico e técnico, pela correção da Tese e pelo companheirismo em todos os momentos do Doutorado.

Às integrantes do meu grupo do coração, Grupo Proteômica, **Gabriela Venturini, Pamella Malagrino, Bianca Kiers, Patrícia Yogi, Kallyandra Padilha e Tamiris Carneiro Gois**. Vocês tornaram minha vida em São Paulo mais feliz, obrigada por tudo.

À querida amiga **Pamella Malagrino**, pelos momentos de descontração, minha companheira de almoços, disciplinas, passeios, revelação dos sofridos *Western blotting*; e pelas palavras de apoio e encorajamento.

Aos queridos amigos **Gabriela Venturini e Rafael Dariolli**, pela amizade e acolhida em São Paulo quando cheguei. Nunca esquecerei o que fizeram por mim. Obrigada!

À **Dra. Adriana Girardi**, pelo incentivo, pelas ideias e pelas críticas sempre muito valiosas.

À **Dra. Ayumi Miyakawa**, pelas discussões de resultados e pelos esclarecimentos.

Ao **Dr. Simão e Josevan** da Bioengenharia (InCor), por cortar as placas de cultura de células para a realização da Microscopia Confocal.

À **Dra. Ana Lúcia Garippo**, pelo auxílio técnico no uso do microscópio confocal. Obrigada pela amizade e pelos conselhos.

Aos funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia molecular do InCor, HC-FMUSP, **Andrea, Brendo, Elida, Renata Carmona, Sileide, Maúde, Márcio, Mariliza, Thiago, Silvana Campos, Maúde e Luciana**, que tem papel importante no funcionamento do laboratório.

Ao **Renato Crajoinas e à Samantha Teixeira**, pelos momentos de descontração e companheirismo na viagem ao Congresso em Boston.

Ao **Prof. Dr. Francisco Rafael Laurindo**, por ceder seu laboratório para o experimento de *shear stress*, e aos colegas do Laboratório de Biologia Vascular, Denise, Ana, Vítor e Luciana, pelas discussões e pelos experimentos.

À **Laura Ventura**, pelas dosagens de Nitrito nas amostras de meio de cultura no analisador de óxido nítrico.

Ao **Vinícius Bassaneze**, pela realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À equipe médica da Cirurgia de Revascularização cardíaca do InCor, em especial, ao **Dr. Luís Alberto Dalan**, pela oportunidade de coletar as amostras.

Aos meus colegas de laboratório, pelas discussões científicas e contribuições em diversos aspectos: **Juliana Nakamuta, Leonardo Jensen, Marcus Vinícius, Samantha Teixeira, Camila Zogbi, Ana Elisa, Vinícius Bassaneze, Thaís Girão e Luciene Campos**.

Aos meus colegas da sala de cultura celular, **André Vaquero, André Martelini, Diogo Biagi**, pela ajuda e pelos momentos alegres trabalhando com as células.

Às **Freiras**, minha primeira moradia em São Paulo, por me proporcionarem histórias de vida bizarras e inusitadas, como o sino que tocava todos os dias as 6h30min da manhã. Eu aprendi muito com essa experiência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de doutorado.

Às minhas amigas de Uberlândia, **Fernanda Evangelista, Cicília Lima, Gisela, Isabela Gasques, Carol Reis, Patrícia Tieme, Mariana e Rosi Araújo**, pelas conversas e pelos momentos de alegria em Minas Gerais.

Aos meus familiares queridos, em especial, a minha avó **Queirozina**, meu irmão **Guilherme**, minha **tia Ivone**, minha **tia Sheila Tatiana** e minha **afilhada Victória**, pela intensa torcida. Em especial, a minha mãe **Adagmar**, pela educação, pelo amor e pelo apoio emocional. Como era bom voltar para casa e reencontrar vocês.

A **Deus**, por todas as graças que tenho alcançado e por me dar saúde, sabedoria e perseverança para finalizar mais uma etapa da minha formação.

*"No mesmo instante em que recebemos pedras em nosso caminho, flores
estão sendo plantadas mais longe. Quem desiste não as vê".*

William Shakespeare

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	β -arrestinas	2
1.2	Mecanotransdução no sistema cardiovascular	8
1.2.1	Mecanotransdução no coração	8
1.2.2	Mecanotransdução no sistema vascular	9
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Cultura primária de células endoteliais de veia safena humana (hSVEC).....	16
3.2	Avaliação da expressão gênica das β -arrestinas	16
3.2.1	Extração de RNA Total	16
3.2.2	Síntese de cDNA	18
3.2.3	PCR em tempo real.....	18
3.4	Transfecção com RNA de interferência (siRNA)	19
3.5	Ensaio de viabilidade celular	22
3.6	<i>Shear stress</i> laminar em células endoteliais.....	23
3.7	Dosagem de Nitrito em meio de cultura	24
3.8	Extração de proteínas	24
3.9	Eletroforese e <i>Western Blotting</i>	25
3.10	Separação de extratos de membrana e citosol por ultracentrifugação	26
3.11	Tratamento com Candesartan, metabólito do Losartan e TRV120027.....	27
3.12	Imunoprecipitação da β - arrestina 1/2.....	27

3.13	Microscopia confocal	28
3.14	Análise estatística.....	29
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Expressão gênica das β -arrestinas 1 e 2	31
4.2	Silenciamento das β -arrestinas 1 e 2	31
4.3	Produção de óxido nítrico em hSVEC silenciadas para β -arrestina 1/2	36
4.4	Papel da β -arrestina na fosforilação da Akt, eNOS e ERK1/2 em resposta ao <i>shear stress</i>	37
4.5	Análise de interação da β -arrestina com mecanossensores do <i>shear</i> <i>stress</i>	40
4.6	Expressão proteica e translocação da β -arrestina 1/2 após o <i>shear stress</i>	46
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÕES	59
7	ANEXOS	61
7.1	Anexo A. Cópia do parecer de aprovação do projeto no Comitê de Ética para análise de projetos de Pesquisa- CAPPesp.....	61
7.2	Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62
8	REFERÊNCIAS	66
9	APÊNDICE.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Proteína quinase B
ANG II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina II subtipo 1
BSA	Albumina de soro bovino
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTL	Controle
DAPI	Diaminofenilidol
DMEM	do Inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DTT	do Inglês, <i>Dithiothreitol</i>
ECL	do Inglês, <i>enhanced chemilluminescence</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	do Inglês, <i>Extracellular regulated kinase</i>
EXP3174	do Inglês, <i>Losartan Carboxylic acid</i>
FACS	do Inglês, <i>Fluorecence activated cell sorting</i>
FBS	Soro fetal bovino
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEK-293	do Inglês, <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
hSVEC	Células endoteliais de veia safena humana
HRP	do Inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Imunoglobulina G
InCor	Instituto do Coração
NO ₂ ⁻	Nitrito
*NO	Óxido nítrico

NS	Estático
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio com Tween 20
PFA	Paraformaldeído
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Aminoácido serina
siRNA	do Inglês, <i>small interfering</i> RNA
SS	do Inglês, <i>shear stress</i>
TBS	Tampão tris base
Thr	Aminoácido treonina
TRV120027	Código comercial para Sar1-D-Ala8- angiotensina II (<i>Trevena Company</i> ®)
VEGFR-2	do Inglês, <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
°C	Celsius
g	Grama
<i>g</i>	Gravidade
h	Hora
kDa	Kilodaltons
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
pmol	Picomol
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Múltiplas funções da β -arrestina	5
Figura 2	Regulação da fosforilação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) pelas quinases Akt, AMPK, PKA e ERK 1/2 após estímulo de <i>shear stress</i>	12
Figura 3	Representação esquemática do sistema cone-e-placa para simulação do estímulo mecânico de <i>shear stress</i>	23
Figura 4	RT-PCR em tempo real para os genes β -arrestinas 1 e 2.	31
Figura 5	Padronização do silenciamento da β -arrestina 1/2	32
Figura 6	Silenciamento da β -arrestina 1 e 2 com siRNA.	33
Figura 7	Morfologia da hSVEC antes e após transfecção com siRNA.	34
Figura 8	Viabilidade das células hSVEC transfectadas com siRNA.....	35
Figura 9	O silenciamento da β -arrestina 1/2 previne a produção de óxido nítrico induzido por <i>shear stress</i>	36
Figura 10	Papel da β -arrestina 1/2 na fosforilação da Akt e eNOS em resposta ao <i>shear stress</i>	38
Figura 11	Papel da β -arrestina 1/2 na fosforilação da ERK 1/2 em resposta ao <i>shear stress</i>	39
Figura 12	Silenciamento do receptor AT1R nas células HEK-293 e hSVEC.....	42
Figura 13	Bloqueio do receptor AT1R nas células endoteliais de veia safena humana	43
Figura 14	β -arrestina interage com caveolina-1 em células endoteliais vasculares humanas (hSVEC)	45
Figura 15	Expressão e translocação da β -arrestina 1/2 em hSVEC após <i>shear stress</i>	47
Figura 16	O <i>shear stress</i> não alterou a fosforilação da β -arrestina 1.....	48
Figura 17	Experimento de co-localização entre β -arrestina 2 e caveolina-1 em hSVEC, por microscopia confocal	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	siRNAs utilizados no silenciamento das β - arrestinas.....	19
Tabela 2	siRNAs utilizados no silenciamento do receptor AT1R.....	21
Tabela 3	Anticorpos primários utilizados no estudo.	26

RESUMO

Santos APC. *Participação da via de sinalização da β -arrestina na produção de óxido nítrico induzido pelo shear stress* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

As células endoteliais são capazes de converter o estímulo mecânico em sinais intracelulares e produzir fatores vasoativos como o óxido nítrico ($^{\circ}\text{NO}$). Evidências recentes sugerem que as β -arrestinas desempenham um papel importante não somente na dessensibilização e internalização de receptores acoplados à proteína G (GPCR) como também na mecanotransdução. Nós testamos a hipótese de que células endoteliais submetidas ao *shear stress* (SS) produzem $^{\circ}\text{NO}$ por meio da ativação da via de sinalização dependente de β -arrestina. Para tal, células endoteliais de veia safena (hSVEC) foram transfectadas com siRNA contra as isoformas 1 e 2 da β -arrestina e, posteriormente, submetidas ao SS (15 dinas/cm²) durante 10 min. Nós encontramos que as SVEC silenciadas para a β -arrestina 1/2 (70%) exibiram uma menor produção de nitrito no meio de cultura em resposta ao SS (166 $\pm$ 17 vs. 326 $\pm$ 44% comparado com hSVEC transfectadas com siRNA controle). Além disso, o silenciamento da β -arrestina 1 e 2 preveniu os níveis de fosforilação da Akt no resíduo de serina 473 e a fosforilação da eNOS no resíduo de serina 1177, enquanto que a fosforilação da ERK 1/2 manteve-se inalterada. Curiosamente, análises de imunoprecipitação mostraram que a β -arrestina interage com caveolina-1, um mecanossensor do *shear stress*, mas não é influenciado pelo SS. Além disso, na situação estática, a β -arrestina encontra-se em uma localização perinuclear e, após o SS, adquiriu um padrão mais difuso no citosol. Coletivamente, esses dados sugerem que a β -arrestina e a sinalização *downstream* Akt/ eNOS são necessárias para a produção de $^{\circ}\text{NO}$ induzido por *shear stress* em células endoteliais vasculares humana.

Descritores: Arrestina; Óxido nítrico; Células endoteliais; Estresse mecânico; Mecanotransdução; Endotélio vascular.

SUMMARY

Santos APC. *β -arrestin-mediated signal transduction participates in laminar shear stress-induced production of nitric oxide in endothelial cells* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2014.

Endothelial cells are capable of converting mechanical stimuli into intracellular signals generating vasoactive factors such as nitric oxide (NO). Recent evidence suggests that β -arrestins play a role not only on G protein-coupled receptors (GPCR) desensibilization but also in mechanotransduction. We tested the hypothesis that β -arrestin and its downstream signaling influence laminar shear stress (SS)-induced NO production by endothelial cells. Towards this end, human saphenous vein endothelial cells (hSVEC) transfected with siRNA against β -arrestins isoforms 1 and 2 were subjected to SS (15 dynes/cm², 10 minutes). We found that the SS-induced production of nitrite in the cell culture medium from down-expressed β -arrestin 1/2 (70%) SVEC decreased (166±17 vs. 326±44% compared to wild-type hSVEC; $P < 0.001$). The β -arrestin 1 and 2 down-regulation in SVEC also inhibited the phosphorylation levels of Akt at the serine residue 473 and the phosphorylation levels of eNOS at the serine residue 1177, whereas ERK phosphorylation remained unchanged. Interestingly, immunoprecipitation analysis showed that β -arrestin interacts with caveolin-1, a shear stress mechanosensor, which is not influenced by SS despite the fact that the static perinuclear localization of β -arrestins changed to the cytosol upon SS. Collectively these data suggest that β -arrestin and Akt/eNOS downstream signaling are required for shear stress-induced nitric oxide production in human vascular endothelial cells.

Descriptors: Arrestin; Nitric oxide; Endothelial cells; Mechanical stress; mechanotransduction; Vascular endothelium.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 β -arrestinas

A família das arrestinas é formada por quatro membros de proteínas citosólicas, duas são expressas somente na retina (arrestina 1 e 4), enquanto a β -arrestina 1 e β -arrestina 2 (também conhecida como arrestina 2 e arrestina 3) são expressas em todos os tipos celulares^{1,2}. As sequências de aminoácidos das duas isoformas de β -arrestinas são 78% idênticas e a maior parte das diferenças está na região C terminal. Estudos mostram que camundongos *knockout* (expressão nula da proteína) para β -arrestina 1 ou β -arrestina 2 são viáveis^{3,4}, entretanto, o duplo *knockout* é letal na fase embrionária, significa que cada β -arrestina pode substituir funcionalmente a outra isoforma⁵.

As β -arrestina 1 e 2 foram, inicialmente, identificadas como mediadores da dessensibilização de receptores de sete domínios transmembrânicos (7TMRs), também conhecidos como receptores acoplados à proteína G (GPCR). O paradigma clássico para a ativação da sinalização do receptor GPCR envolve a estimulação pelo agonista que induz uma mudança na conformação desse receptor, resultando na ativação e dissociação da proteína G heterotrimérica. Essa ativação envolve a mudança do GDP para GTP pela subunidade $G\alpha$ da proteína G, levando à dissociação da proteína heterotrimérica nas subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. Em seguida, essa dissociação promove a formação e subsequente sinalização por mensageiros secundários, como a adenosina 3', 5' monofosfato cíclico (AMP cíclico), diacilglicerol (DAG) e cálcio⁶.

O término dessa cascata, processo conhecido como dessensibilização, ocorre quando enzimas conhecidas como GPCR kinases (GRKs) fosforilam a cauda citoplasmática do receptor ativado⁷, e promove a subsequente ligação das proteínas β -arrestinas que bloqueiam a ativação da sinalização por proteína G e estabilizam o receptor em uma forma de baixa afinidade ao ligante. β -arrestinas servem como adaptadores para a internalização por meio da interação com clatrina e com a subunidade β 2-adaptina do complexo adaptador AP2. Ao interagir com receptor fosforilado, as interações intramoleculares entre os domínios amino e carboxi-terminal da β -arrestina são desfeitas, expondo o domínio C-terminal para que ocorra a interação com as proteínas responsáveis pela formação das vesículas revestidas de clatrina⁸. Em seguida, vesículas revestidas de clatrina se separam da membrana plasmática promovendo a internalização do receptor em pequenas vesículas endocíticas, que podem ser direcionadas à reciclagem ou degradação nos lisossomos⁹.

A β -arrestina forma um complexo com os receptores 7TMR e a estabilidade desse complexo direciona o itinerário da subsequente translocação intracelular dos receptores ativados^{10,11}. Quando a interação entre receptor e β -arrestina é forte e prolongada, esse complexo co-internaliza nas vesículas endocíticas se associam com quinases formando o *signalossomes* (denota a sinalização do receptor associado aos endossomos), receptores que formam esse padrão de recrutamento são chamados de Classe B, inclui o receptor de angiotensina II (AT1R), vasopressina (V2), neurotensina 1, entre outros. Ao contrário, os receptores de Classe A (β -adrenérgico, dopamina D1A, endotelina tipo A) mostram uma interação fraca e transiente com a β -arrestina¹⁰. Adicionalmente, a β -arrestina 2 se liga com maior afinidade aos

receptores da classe A comparado com a β -arrestina 1, enquanto que na Classe B as duas isoformas da β -arrestina tem afinidade similar pelo receptor¹¹.

A dessensibilização e internalização de receptores GPCR são reguladas por modificações pós-traducionais nos receptores GPCR e β -arrestinas, incluindo a ubiquitinação¹², fosforilação¹³⁻¹⁵ e nitrosilação¹⁶. A ubiquitinação da β -arrestina aumenta sua interação por elementos da maquinaria endocítica e, também, por quinases¹⁷, embora a ubiquitinação seja usualmente relacionada com o endereçamento de proteínas para a degradação nos proteassomos, essa modificação também é reconhecida na mediação da translocação de proteínas e transdução de sinal por facilitar a interação da β -arrestina com quinases¹⁸⁻²⁰.

Outra forma de regulação das β -arrestinas é a fosforilação, as β -arrestinas são constitutivamente fosforiladas no citosol e quando recrutadas para a membrana plasmática em resposta à ativação do receptor são defosforiladas. A ERK 1/2 fosforila a β -arrestina 1 na serina 412¹⁵ e a caseína cinase II fosforila a β -arrestina 2 nos sítios treonina 383 e serina 361¹³. A defosforilação da β -arrestina 1/2 é necessária para a interação com a clatrina e posterior formação das vesículas endocíticas, entretanto, a defosforilação não afeta a ligação da β -arrestina no receptor e a dessensibilização^{13,14}.

Ozawa e colaboradores (2009) mostraram que a internalização de receptor GPCR também pode ser regulada pela S-nitrosilação da β -arrestina. A β -arrestina 2 é adaptadora entre eNOS e o receptor β -adrenérgico, assim como outros GPCR. A estimulação do receptor pelo agonista isoproterenol resulta na ativação da eNOS e a S-nitrosilação da β -arrestina. Posteriormente, a β -arrestina nitrosilada se dissocia da eNOS e interage com a clatrina e adaptina 2 acelerando a internalização do receptor.

Portanto, a S-nitrosilação/denitrosilação da β -arrestina 2 regula a internalização de GPCR.

Além do papel da β -arrestina na dessensibilização e internalização dos receptores, nos últimos anos, tem se tornado evidente o papel da β -arrestina como transdutora de sinal independente da proteína G (Figura 1).

Figura 1 - Múltiplas funções da β -arrestina. Dessensibilização: o receptor 7TMR é ativado pelo agonista e ocorre a ativação da proteína G, em seguida, os receptores são fosforilados pelas GRKs e ligados pela β -arrestina, que bloqueia uma futura sinalização. Endocitose: a β -arrestina interage com proteínas da maquinaria endocítica, facilitando a internalização. Sinalização: a β -arrestina é uma proteína adaptadora para várias quinases, como MAPK, levando à ativação da via de sinalização em um distinto compartimento celular²¹.

A β -arrestina atua como proteína adaptadora de ligação ou arcabouço para multiproteínas, o que facilita a ativação de numerosas vias de sinalização, incluindo a *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), c-SRC, *nuclear factor - κ B* (NF- κ B) e *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), AKT²²⁻²⁴. A sinalização mediada por β -arrestina pode resultar em diversas respostas celulares, tais como: quimiotaxia²⁵,

contratibilidade do cardiomiócito²⁶ e prevenção de apoptose²⁷. Estudos mostram que receptores GPCR e tirosina quinase podem ativar uma sinalização intracelular dependente de β -arrestina após a internalização do receptor, porém ainda não estão claros os efeitos fisiológicos dessa sinalização endossomal²⁸.

Com relação ao sistema vascular, alguns efeitos decorrentes da sinalização mediada pelas β -arrestinas também foram descritos dependentes da presença de diferentes estímulos. Por exemplo, em células endoteliais expressando o receptor NK1, a substância P inibiu a apoptose em uma via mediada por β -arrestinas/Src/ERK²⁹. Em células de músculo liso vascular, a estimulação do receptor AT1R pela angiotensina II induziu a ativação mediada pela β -arrestina 2 da síntese proteica³⁰, e das vias da ERK/p90RSK e da PI3K/Akt, que convergem para fosforilar e inativar a proteína pró-apoptótica BAD³¹.

Taguchi e colaboradores (2011) demonstraram em artéria aorta de camundongos diabéticos (ob/ob) o aumento na atividade da GRK2, a redução na expressão proteica de β -arrestina 2, Akt (Thr 308) e eNOS (Ser 1177) com concomitante redução na resposta de relaxamento dependente do endotélio após estimulação com o hormônio insulina. Esses dados sugerem que a β -arrestina 2 participa da ativação da enzima eNOS e do relaxamento dependente do endotélio estimulados pela insulina e que um prejuízo na interação β -arrestina 2/Akt/eNOS pode ser um dos mecanismos relacionados à disfunção endotelial no diabetes³².

A via de sinalização dependente de β -arrestina melhor caracterizada até o momento é a via de ERK1/2. A β -arrestina-2 serve como proteína de ancoragem para os componentes da cascata de MAPK (Raf-1, MEK1 e ERK), em complexos com o receptor AT1R, levando à ativação de ERK1/2. A distribuição espacial da ERK

ativada por vias dependente e independente de proteína G é diferente. A ativação dependente de proteína G dispara a translocação de ERK para o núcleo, enquanto que a ligação da ERK nos endossomos pode prevenir a translocação da ERK para o núcleo, favorecendo a sinalização citoplasmática da ERK³³. Na ausência de β -arrestina 2, AT1R ativa primariamente ERK1/2 via PKC. As duas vias mostram também cinéticas de ativação diferentes: a ativação de ERK via proteína G é rápida e transitória, enquanto a ativação mediada por β -arrestina-2 é lenta e persistente³³.

Com a descoberta da sinalização mediada por β -arrestina, tem surgido uma nova apreciação sobre o termo *ligant biased*, que se refere à propriedade de alguns ligantes acoplarem o receptor e produzir/direcionar seletivamente uma sinalização específica. Isso é devido à habilidade do ligante estabilizar a conformação do receptor de maneira que, preferencialmente, ativa ou inibe um subconjunto de vias de sinalização³⁴⁻³⁶. Exemplos de ligantes *biased* do receptor AT1R são a angiotensina II modificada (Sarcosine¹, Isoleucine⁴, Isoleucine⁸-AngII), chamada de SII, o TRV120027 e o TRV120023 ativam somente a via de sinalização dependente de β -arrestina na ausência de ativação da proteína G³⁶.

A sinalização dependente de β -arrestina é uma área relativamente nova da pesquisa de receptores GPCR quando comparado ao estudo da tradicional proteína G. Os estudos desta via visam à descoberta de funções adicionais da β -arrestina na biologia dos GPCR, e produzir ligantes funcionalmente seletivos/*biased* terapêuticos que diferenciam entre as funções da β -arrestina e proteína G a partir de um mesmo receptor, a fim de melhorar a eficácia e diminuir os efeitos colaterais dos agentes terapêuticos³⁶.

A sinalização mediada por β -arrestina têm sido relacionada à fisiologia e patofisiologia de várias doenças, entre elas: cardiovascular, renal, pulmonar, gastrointestinal, endócrina, neurológica e oncológica³⁷. No coração, a sinalização via β -arrestina promove o crescimento e hipertrofia³⁸, e o aumento da contratilidade de miócitos^{26,39}. Além disso, o ligante *biased* TRV120027 reduz a pressão arterial e aumenta o desempenho cardíaca em ratos³⁹.

Contudo, apesar de inúmeros estudos mostrando o efeito benéfico da sinalização mediada por β -arrestinas no coração, ainda não há evidência do papel dessa sinalização no sistema vascular.

1.2 Mecanotransdução no sistema cardiovascular

1.2.1 Mecanotransdução no coração

Células *in vivo* estão constantemente expostas a forças físicas e estímulos mecânicos associados com o ambiente local. No coração, o estiramento mecânico, que é a força tensional sobre as paredes das câmaras cardíacas gerada pela sobrecarga hemodinâmica, e a Angiotensina II estão envolvidos na hipertrofia cardíaca^{40,41}. O aumento da massa cardíaca exacerbado na hipertensão arterial é um dos principais preditores do aumento do risco de morte cardiovascular⁴².

Em 2004, Jou e colaboradores demonstraram que o estiramento mecânico em cardiomiócitos é capaz de ativar o receptor AT1R sem a participação do ligante Angiotensina II (AngII). Observaram que ativação da ERK pelo estiramento via AT1R é dependente tanto da fosforilação de JAK-2 como de vias intracelulares

dependentes da proteína-G. Além disso, em modelo experimental *in vivo*, induziram a hipertrofia cardíaca por coartação da aorta em animais sem a capacidade de formar angiotensina II (animais KO para o angiotensinogênio). Esses eventos foram inibidos pelo agonista inverso do receptor AT1R, o candesartan, sugerindo ativação direta dos receptores pela sobrecarga pressórica induzida.

Posteriormente, outro estudo mostrou que a ativação do receptor AT1R pelo estiramento mecânico ativa a sinalização celular mediada pela β -arrestina⁴³, pois o estiramento induz alostericamente o receptor AT1R a adotar uma conformação que favorece a ligação da β -arrestina⁴⁴.

1.2.2 Mecanotransdução no sistema vascular

As células endoteliais vasculares revestem a superfície luminal dos vasos sanguíneos e estão constantemente expostas a forças hemodinâmicas: 1) estresse de cisalhamento (do Inglês, *shear stress*), que é a força de atrito tangencial gerada pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso; 2) pressão hidrostática, força que atua perpendicular à parede do vaso; e 3) estiramento cíclico⁴⁵⁻⁴⁷. Essas forças mecânicas são convertidas em sinais bioquímicos intracelulares que desempenham importante papel na regulação da função e do remodelamento vascular⁴⁸.

O *shear stress* regula algumas funções do endotélio, como o controle fisiológico do diâmetro do lúmen, regulação da permeabilidade vascular, consequências patológicas associadas com a inflamação aguda, a cicatrização de feridas, e a doenças cardiovasculares, como a localização da aterosclerose⁴⁹.

A capacidade o endotélio detectar e responder ao estímulo *shear stress* ocorre por meio de um complexo de mecanossensores presentes na membrana plasmática, nomeado recentemente como “mechanosome”⁵⁰. A mecanotransdução descreve os processos celulares que respondem a estímulos físicos ou mecânicos e a transdução em sinais bioquímicos que resultam em uma resposta fisiológica. Os sinais resultantes da mecanotransdução regulam diversos processos celulares, incluindo crescimento celular, diferenciação, migração, angiogênese e a apoptose^{51,52}.

Embora os mecanismos ainda não tenham sido completamente elucidados, diversos estudos têm propostos diferentes moléculas de membrana e microdomínios celulares atuando como sensores mecânicos para o *shear stress*. Dentre essas moléculas, estão incluídos os canais iônicos (ex. canais de K^+ e Ca^{2+}), as cavéolas^{53,54}, glicocálix⁵⁵, citoesqueleto⁵⁶, receptores com atividade de cinases de tirosina, como o receptor do fator de crescimento endotelial 2 (VEGFR2)⁵⁷, proteínas de adesão, incluindo as integrinas⁵⁸, e moléculas de adesão plaquetária endotelial (PECAM-1)⁵⁹ e receptores acoplados à proteína G (GPCR)⁶⁰.

De maneira similar, os estudos sobre as vias intracelulares de transdução do sinal descrevem que há inúmeras moléculas envolvidas na mecanotransdução do *shear stress*, tais como calmodulina e proteínas cinases: PKA, PKC, FAK, c-Src, PI3K, Akt, membros das cinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) e da família das Rho GTPases^{46,48,61}.

Recentemente, foi demonstrado por nós e por outro grupo que o *shear stress* ativa o receptor de angiotensina II, AT1R, na ausência de seu ligante, promovendo a fosforilação da ERK1/2^{62,63}. Nos resultados do nosso grupo, a ativação do receptor AT1R promoveu a fosforilação da ERK 1/2 por mecanismos dependentes e

independentes da proteína G, entretanto, a via de sinalização mediada pelas β -arrestinas não foi analisada⁶³.

O *shear stress* laminar é o principal estímulo fisiológico para a produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase (eNOS). O NO produzido pelo endotélio está envolvido na regulação do tônus vascular, medeia a dilatação do vaso em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo⁶⁴. O decréscimo na disponibilidade de NO é um aspecto característico em pacientes com doença arterial coronária e promove o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, a aterosclerose geralmente ocorre de maneira seletiva em regiões de curvatura ou bifurcação vascular, em que o padrão de fluxo sanguíneo que é laminar ou unidirecional torna-se turbilhonado ou oscilatório, com diminuição do *shear stress*⁶⁵.

A atividade da enzima endotelial NO sintase (eNOS) estimulada por *shear stress* foi originalmente descrita como dependente do aumento da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), mas trabalhos mostram que o *shear* pode ativar as vias de sinalização responsáveis pela produção NO pela fosforilação e ativação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS)^{49,66,67}. Estudos realizados em cultura de células endoteliais e vasos sanguíneos isolados indicam que forças mecânicas e o aumento da taxa de perfusão aumentam a fosforilação de proteína quinase B/Akt^{68,69} e proteína quinase A (PKA)⁷⁰, adenosina monofosfato quinase (AMPK)⁷¹ levando à fosforilação da eNOS na serina Ser 1177 (Akt, PKA e AMPK), Ser 635 (PKA) e Ser 617 (Akt). Além disso, a fosforilação da ERK 1/2 regula o sítio inibitório (treonina 495) da eNOS^{72,73} (Figura 2).

Figura 2 - Regulação da fosforilação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) pelas quinases Akt, AMPK, PKA e ERK 1/2 após estímulo de *shear stress*⁷⁴.

Além de evidenciar a ativação do receptor AT1R pelos *shear stress*, dados do nosso grupo demonstraram que o agonista inverso do receptor AT1R, Candesartan, potencializou a produção de óxido nítrico via modulação da fosforilação da eNOS nos resíduos Ser1177 e Thr495, em células endoteliais humanas submetidas ao *shear stress* laminar⁷⁵.

Assim, considerando o receptor AT1R como um mecanossensor do *shear stress*, independente da presença de seu ligante, e a modulação da atividade da enzima eNOS por drogas bloqueadoras desses receptores, decidimos investigar se a sinalização mediada por β -arrestinas poderia estar envolvida na produção de óxido nítrico em células endoteliais submetidas ao *shear stress*.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento da via de sinalização mediada por β -arrestina 1/2 na produção de óxido nítrico em células endoteliais vasculares submetidas ao *shear stress* laminar.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a participação das proteínas β -arrestina 1 e 2 nas vias de sinalização associadas com a ativação da enzima NO sintase endotelial (eNOS);
2. Investigar a interação da β -arrestina com proteínas mecanossensoras do *shear stress*;
3. Avaliar o padrão de localização celular da β -arrestina em células endoteliais submetidas ao *shear stress* laminar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura primária de células endoteliais de veia safena humana (hSVEC)

Os segmentos de veia safena foram obtidos de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização cardíaca por ponte de safena no Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (CAPPesq-66174/12) (Anexo A) (Termo de consentimento livre e esclarecido, Anexo B).

As células endoteliais de veia safena humana (hSVEC) foram isoladas por digestão enzimática. O lúmen da veia safena foi incubado com Colagenase tipo II (1 mg/mL) durante 1 hora a 37°C. Em seguida, o vaso foi lavado com tampão fosfato (PBS, pH 7,4), as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min e mantidas em meio específico para células endoteliais (EGM-2, Lonza, Walkersville, MD EUA) em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂. As SVEC foram mantidas em cultura até a passagem 7.

3.2 Avaliação da expressão gênica das β -arrestinas

3.2.1 Extração de RNA Total

O RNA total das hSVECs foi obtido utilizando-se o Trizol (*Trizol Reagent*, Invitrogen®) seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. Células hSVECs

em placas de 100 mm e 100% confluentes foram lisadas com 1 mL de Trizol. Para a extração, os homogenatos foram incubados a 4°C por 5 min para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. A seguir, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos e incubou-se a 4°C por 2 a 3 min. A mistura foi centrifugada a 12.000 $\times g$ por 15 min a 4°C e três fases se formaram. A fase aquosa (superior) contendo o RNA foi transferida para outro tubo e, em seguida, foram adicionados 0,5 mL de isopropanol para a precipitação do RNA. O material foi incubado por 10 min a 4°C e centrifugado a 12.000 $\times g$ por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado pela adição de 1 mL de etanol 75%, seguido de centrifugação a 7.000 $\times g$ por 5 min a 4°C. O sedimento foi rapidamente seco ao ar e dissolvido em, aproximadamente, 20 μ L de água deionizada autoclavada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm absorvância. Para análise da pureza do RNA, dividiu-se o valor da absorvância a 260 nm pelo valor obtido a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas), cuja razão ideal para aceitação da amostra deve estar entre 1,6 e 2,0. As amostras foram armazenadas a -80°C.

Para confirmar a integridade do RNA extraído, 1 μ g de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE (Tris-base 0,5 M, ácido acético 1M, EDTA 0,5M e pH 8) e corado com GelRedTM (Uniscience).

3.2.2 Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foi utilizado 2 µg de RNA total de células endoteliais de veia safena, ao RNA, foi adicionado 1 µL de oligo dT (0,5 µg/µL) e incubado a 70°C durante 5 min. Em seguida, adicionou-se 15 µL de uma mistura contendo tampão (5x) da enzima transcriptase reversa Improm II (Promega®), MgCl₂ (25 mM), mistura de dNTPs (10 mM cada), RNAsin (40 U/µL) e enzima transcriptase reversa Improm II (Promega®, U/µL), na sequência, a amostra foi incubada a 25°C por 5 min e, posteriormente, a 42°C por 2h e a 70°C por 15 min. Todas as incubações foram realizadas em termociclador (Eppendorf). O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior amplificação.

3.2.3 PCR em tempo real

Após a síntese de cDNA, foi realizado o PCR em tempo real utilizando o reagente *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), o sistema de detecção *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e oligonucleotídeos iniciadores específicos para a β -arrestinas 1 e 2.

Nesta metodologia, o PCR foi combinado a um intercalante fluorescente de DNA dupla fita, o *SYBR Green I*. Desta forma, um sinal fluorescente gerado é diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR na reação. A intensidade de fluorescência é monitorada após cada ciclo do PCR, o que possibilita a análise durante a fase exponencial da reação. Uma curva de dissociação foi gerada ao final da reação para verificar se um único produto foi amplificado. Todas as amostras

foram analisadas em triplicata. O gene da ciclofilina foi utilizado para normalizar os resultados. O método do ciclo comparativo (CT) foi utilizado para a análise dos dados, o CT indica o número de ciclos em que a quantidade amplificada do gene-alvo atinge um limiar fixo, e ΔCT é a diferença de ciclos entre o gene-alvo e o de referência. Os níveis de expressão gênica foram determinados por $2^{-\Delta CT}$; em que $\Delta \Delta CT$ é o valor de ΔCT subtraído do ΔCT da β -arrestina 1. Os *primers* utilizados foram: **β -arrestina 1**, direto: 5'- TCCAGAGAACGAGACGCCAGTAGA -3', reverso: 5'- GCTGTGGAGAGCCGGTACCA -3'; **β -arrestina 2**, direto: 5'- TGTCCCTGTGGACACCAACCTC -3', reverso: 5'- CCCACCCCGCTTCCTAGC AG -3'; **Ciclofilina**, direto: 5'- ATGGTCAACCCCACC GTGT -3'; reverso: 5'- TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC- 3'.

3.4 Transfecção com RNA de interferência (siRNA)

O silenciamento simultâneo das β -arrestinas 1 e 2 nas células endoteliais foi realizado utilizando oligonucleotídeos de siRNA contra o RNA mensageiro de cada β -arrestina validado por Ahn *et al.*⁷⁶. Para o controle, foi utilizada uma sequência aleatória de oligonucleotídeos (*scrambled*) que não silencia nenhum RNAm conhecido (Tabela 1). Os siRNAs foram sintetizados pela empresa *Sigma-Aldrich*® (St. Louis, MO, USA).

Tabela 1 - siRNAs utilizados no silenciamento das β - arrestinas.

siRNA	Sequência (5' para 3')
β - arrestina 1	AAAGCCUUCUGCGCGGAGAAU dT dT
β - arrestina 2	AAGGACCGCAAAGUGUUUGUG dT dT
Controle	AAGUGGACCCUGUAGAUGGCG dT dT

As células endoteliais (hSVEC) foram plaqueadas em placa de 100 mm, pré-tratadas com gelatina 3%, de modo a atingir uma confluência de 50% no dia da transfecção. Após 24h do plaqueamento, as células foram mantidas em meio com redução de soro, meio Opti-MEM I (Invitrogen®), durante 16h antes da transfecção. No dia da transfecção, 30 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen®) foi adicionado a um tubo contendo 300 µL do meio Opti-MEM I e, em paralelo, 20 µg de siRNA (10 µg de cada isoforma da β -arrestina) foi adicionado a 400 µL de meio em outro tubo. Para o controle, 20 µg de siRNA controle foi adicionado a 400 µL de meio. Cada solução (siRNA+ meio e Lipofectamina+ meio) foi incubada separadamente por 10 min à temperatura ambiente, e, depois, misturadas e incubadas por mais 20 min. Em seguida, os complexos de transfecção foram adicionados nas placas contendo as hSVEC e 5 mL de meio Opti-MEM novo. Após uma incubação de 6h a 37°C e 5% de CO₂, o meio de transfecção foi substituído por meio EGM-2 completo. Somente após 72h (com carenciamento prévio de soro por 16h), as células foram submetidas ao *shear stress*. A eficiência do silenciamento foi analisada por *Western blotting*.

Para o silenciamento do receptor AT1R humano, utilizamos dois tipos de siRNA, o AT1R siRNA (sc-29750, Santa Cruz) e o AT1R siRNA *Stealth* (Life Technologies). O *Stealth* siRNA tem uma modificação química para melhorar sua estabilidade no meio de cultura. A empresa Santa Cruz não fornece as sequências dos AT1R siRNAs. Para o desenho dos siRNAs (Life Technologies), utilizamos o programa *BLOCK-iT™ RNAi Designer* disponível no site da empresa (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>) (Tabela 2).

Tabela 2 - siRNAs utilizados no silenciamento do receptor AT1R.

siRNA	Sequência (5' para 3')
AT1R_stealth_1	UUGCAAGAGAAUGCUCAGCCAUGUU
AT1R_stealth_2	CAUGAUCGAUACCUGGCUAUUGUU
AT1R_stealth_3	GAAACAGCUUGGUGGUGAUAGUCAU
AT1R_stealth_controle	CAUCUAUAGCCAGGUAUCUUUGGUU

Inicialmente, a eficiência dos siRNA foi testada em células HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*). Como as células HEK-293 não expressam o AT1R, fizemos uma co-transfecção com um plasmídeo para expressão desse receptor juntamente com várias concentrações dos siRNA (das duas empresas, Santa Cruz e Life). Consideramos a proporção de 0,6 µg de siRNA para cada 1 µg do plasmídeo de acordo com o protocolo da Lipofectamina, e testamos 2 µg, 4,8 µg e 6,8 µg de siRNA, sendo que foi utilizado um *pool* com as três sequências de siRNA. Para a transfecção, 2×10^6 células foram crescidas em uma placa de 60 mm em meio DMEM sem antibiótico. Após 16h, foi adicionado o complexo de transfecção composto por plasmídeo, siRNA, 25 µL de Lipofectamina 2000 e meio Opti-MEM I. Após 6h, o meio de transfecção foi substituído por DMEM completo e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Depois de 48 h, células mantidas há 16h em meio de cultura sem soro foram estimuladas com 10^{-6} M de Angiotensina II (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, MO, USA) durante 10 min e lisadas para a extração de proteínas e análise por *Western blotting*. Devido à falta de especificidade dos anticorpos para detectar o AT1R no *Western blotting*, utilizamos como indicador da eficiência do silenciamento do AT1R a expressão da forma fosforilada da proteína ERK 1/2^{77,78}.

O silenciamento do AT1R nas células hSVEC também foi realizado com o *pool* de siRNA. Para a transfecção, 25×10^4 células foram crescidas em uma placa de 60 mm em meio EGM-2 completo a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h do plaqueamento,

as células foram mantidas em meio com redução de soro, meio Opti-MEM I (Invitrogen®), durante 16h antes da transfecção. Em seguida, foi adicionado o complexo de transfecção composto por siRNA nas várias concentrações (2; 4,8 e 6,8 µg), 25 µL de Lipofectamina 2000 e meio Opti-MEM I em placas separadas. Após 6h, o meio de transfecção foi substituído por meio EGM-2 completo e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Depois de 48 h, células mantidas há 16h em meio de cultura sem soro foram estimuladas com 10⁻⁶ M de Angiotensina II (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) durante 10 min, e lisadas para a extração de proteínas e análise da ERK 1/2 fosforilada por *Western blotting*.

3.5 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular das células transfectadas com siRNA foi avaliada com o emprego do reagente 7- aminoactinomicina D (7-AAD; Invitrogen). A coloração pelo 7AAD baseia-se na diferença da permeabilidade da membrana de células vivas, apoptóticas e mortas perante o corante marcador de DNA. Como o 7AAD é um composto químico que apresenta fluorescência e que se intercala entre as bases de DNA de dupla fita, ele serve como marcador de apoptose em análises por citometria de fluxo. As células com membranas intactas excluem o 7AAD, enquanto as membranas de células danificadas e mortas são permeáveis ao composto⁷⁹.

Em resumo, as células transfectadas foram coletadas das placas de cultura utilizando uma solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a 4°C e, aproximadamente, 1x10⁶ células por mL foram ressuspensas em solução de incubação (2% BSA/PBS). Em seguida, foi adicionado 1µg/mL de 7AAD

e incubado por 10 min no gelo e protegido da luz. Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas para retirar o excesso do reagente e ressuspensas com a solução de incubação (2% BSA/PBS) em tubo específico para citômetro (BD® Company). O controle negativo do experimento foram células sem a marcação com 7AAD. Imediatamente após a marcação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur com o *software Cell Quest* (BD Biosciences San Jose, CA).

3.6 *Shear stress* laminar em células endoteliais

Os experimentos de estimulação de células endoteliais com *shear stress* foram realizados usando um sistema de cone-e-placa (Figura 3), como descrito anteriormente^{80,81}. Este sistema consiste de um cone, de ângulo superficial de 0,5° e baixa resistência a líquidos, girando sobre a cultura de células.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema cone-e-placa para simulação do estímulo mecânico de *shear stress*. As células endoteliais de veia safena humana (hSVEC) foram submetidas a *shear stress* (laminar, fluxo unidirecional de 15 dinas/cm²), pela rotação do cone sobre o meio de cultura. A temperatura (37 °C) e a concentração de CO₂ (5%) foram mantidas constantes na incubadora (adaptado de Malek *et al.*, 1992).

As hSVECs, silenciadas ou não, em placa de cultura de 100 mm (Falcon), foram mantidas em meio sem soro e sem suplementos por 16h previamente ao estímulo mecânico. Após esse período, o meio de cultura foi novamente trocado por meio sem soro novo (10 mL) e as células foram submetidas ao *shear stress* de 15 dinas/cm² por 10 min. Em seguida, alíquotas de meio de cultura condicionado (500 µL) foram coletadas e armazenadas a -80°C para posterior quantificação da produção de óxido nítrico (dosagem de nitrito). Como controle do experimento, foram utilizadas hSVEC em condição estática, ou seja, sem alterações hemodinâmicas. Todos os experimentos foram realizados com o sistema de cone-e-placa mantido a 37°C e 5% de CO₂ em câmara úmida. Além da coleta do meio de cultura, as células foram lisadas para a extração de proteínas e análise pela técnica de *Western blotting*.

3.7 Dosagem de Nitrito em meio de cultura

A produção de [•]NO foi avaliada pela quantidade de nitrito (NO₂⁻) acumulada no meio de cultura das células utilizando o equipamento *NO analyzer (Model 208A; Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA)* de acordo com protocolo do fabricante. Os níveis de NO₂⁻ foram corrigidos pelo extrato total de proteína por placa das células hSVECs.

3.8 Extração de proteínas

Os homogenatos celulares foram obtidos pela lise mecânica das células, previamente lavadas com PBS 1X, em tampão de lise contendo: 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% glicerol e 2% SDS, seguido de aquecimento a 100°C durante 10 min e

retirada dos debris por centrifugação a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -80°C até o momento do uso. A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de BCA com um kit de ensaio proteico BCATM (PIERCE *Biotechnology*, Rockford, IL, USA)

3.9 Eletroforese e *Western Blotting*

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Uma quantidade de 20 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (50 mM Tris-HCL, pH 6,8; 0,5% SDS; 10% glicerol; 0,1% azul de bromofenol) acrescido de 50 mM de dithiothreitol (DTT), em seguida, aquecidas a 95°C por 5 min. As amostras e o padrão de peso molecular (*Precision Plus ProteinTM KaleidoscopeTM Standards*, Bio-Rad) foram aplicadas no gel de 10%, contendo o tampão de eletroforese (25 mM Tris-base pH 7,4; 192 mM glicina). Para a análise da expressão das proteínas eNOS total e fosforilada, foram utilizadas 40 µg de proteínas, tampão de amostra sem DTT e gel 8%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 GE *Healthcare Life Sciences*) utilizando o sistema de transferência semi-seco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad), com o tampão de transferência (25 mM de Tris-base, 192 mM glicina, metanol 20%). Fixou-se a voltagem em 12V, e a transferência foi realizada durante 1h. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (5% de BSA, 150 mM NaCl, 50 mM, Tris-HCl, Tween 20 0,1%) à temperatura ambiente durante 1h para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (Tabela 3) a 4°C por

16h sob leve agitação. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com TBST 0,1% e a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP, Invitrogen®) em solução de bloqueio à temperatura ambiente por 1h. A membrana foi, novamente, lavada e revelada por quimioluminescência (ECL) utilizando o fotodocumentador ImageQuant (LAS 4000, GE Healthcare). A análise da densitometria das bandas foi realizada com o programa ImageJ.

Tabela 3 - Anticorpos primários utilizados no estudo.

Anticorpo	Empresa/ N° Catálogo	Diluição
β -arrestina ½	Cell Signaling/ #4674	1:2000
β -arrestina 1	Santa Cruz/ sc-6389	1:500
β -arrestina 1 fosforilada (Ser412)	Cell Signaling/ #2416	1:1000
β -arrestina 2	Santa Cruz/ sc-30938	1:500
Akt fosforilada (Ser473)	Cell Signaling/ #4060	1:1000
Akt total	Cell Signaling/ #9571	1:1000
eNOS fosforilada (Ser1177)	BD/ 612392	1:500
eNOS total	BD/ 610299	1:500
ERK 1/2 fosforilada	Cell Signaling/ #4377	1:1000
ERK 1/2 total	Cell Signaling/ #9102	1:1000
VE- Caderina (D87F2)	Cell Signaling/ #2500	1:1000
Caveolina-1	Cell Signaling/ #3238	1:1000
GAPDH	Abcam/ ab9485	1:5000

3.10 Separação de extratos de membrana e citosol por ultracentrifugação

Células hSVECs em placas de 100 mm e 100% confluentes foram lisadas com 200 μ L de tampão de lise contendo: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0,25 M Sacarose, coquetel de inibidores de fosfatases (C2 e C3) e de proteases (1: 300, *Sigma-Aldrich*®, St. Louis, MO, USA). O homogeneizado foi centrifugado a 100.000 g a 4°C durante 1h e o sobrenadante solúvel foi armazenado e

utilizado como fração citosólica. O precipitado da ultracentrifugação foi ressuspenso em 50 µL do tampão de lise acrescido de 1% de Triton X-100 e centrifugado novamente a 100.000 g, a 4°C por 1h. O sobrenadante solúvel em Triton X-100 foi armazenado e utilizado como fração de membranas.

3.11 Tratamento com Candesartan, metabólito do Losartan e TRV120027

Após permanecerem em meio sem soro por 16h, as hSVECs foram tratadas com 10^{-6} M de Candesartan, metabólito do losartan EXP3174 (Santa Cruz) ou TRV120027 (cedido pelo Dr. Jonathan D. Violin, da Trevena Inc., King of Prussia, Pennsylvania) por 30 min a 37°C e 5% de CO₂ na incubadora. Em seguida, as células foram estimuladas com 10^{-7} M de Angiotensina II por 10 min e lisadas com tampão de extração de proteínas.

3.12 Imunoprecipitação da β - arrestina 1/2

A extração de proteínas das células endoteliais para a imunoprecipitação foi realizada com o tampão RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). O homogenato total (0,5 mg de proteínas) das células foi incubado com anticorpo anti- β arrestina 1/2 (Cell Signaling, 5 µL), sob agitação a 4°C, durante 16h. Posteriormente, foram adicionados 70 µL de *beads* magnéticos Proteína A (Invitrogen®, Dynabeads#100-02D) previamente lavados com PBS 1X, e incubados sob leve agitação a 4°C, por mais 16h. As *beads* contendo os imunocomplexos foram lavados três vezes com o tampão RIPA e, após a última

lavagem, foi adicionado o tampão de amostra (25 μ L) e as amostras incubadas à 100°C por 5 min. O sobrenadante foi submetido à análise de *Western blotting*. No *Western*, foi utilizado um anticorpo secundário que reage somente com anticorpo IgG na conformação nativa (*Mouse anti-rabbit IgG*, L27A9, *Cell Signaling*, #5127), pois a β -arrestina e a cadeia pesada da imunoglobulina possuem o mesmo peso molecular 50 kDa.

3.13 Microscopia confocal

Placas de 100 mm contendo as células endoteliais submetidas ao *shear stress* (15 dinas/cm², 10 min) ou mantidas como controle estático foram lavadas 3x com PBS/paraformaldeído (PFA) 4% (1:1), e, posteriormente, fixadas em PFA 4% por 1h à temperatura ambiente. As placas foram secas à temperatura ambiente e cortadas no diâmetro de 65 mm pelo serviço de Bioengenharia do InCor. A placa cortada foi subdividida em quatro secções para a incubação do anticorpo primário utilizando um adesivo *CoverWell*TM (Invitrogen®) que foi aderido na placa com o vedante de silicone (*Silicone Bond Garin & Cia. Ltda.*) de modo a formar um campo para a contenção das soluções utilizadas na reação de imunofluorescência.

As células foram lavadas com PBS 1X para retirar algum resíduo do plástico, em seguida, permeabilizadas com Nonidet P (NP40) 0,1% durante 35 min à temperatura ambiente. Depois de 3 lavagens, as células foram bloqueadas em BSA 2% diluída em PBS 1X por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram incubadas simultaneamente com os anticorpos primários anti- β -arrestina 2 (produzido em cabra, Santa Cruz, 1:50) e anti-Caveolin-1 (produzido em coelho, Cell

Signaling, 1:400). O anticorpo VE-Caderina (*Cell Signaling*, 1:400) foi utilizado como controle positivo específico para marcação de células endoteliais. Os anticorpos primários foram diluídos em BSA 2% e incubados por 16h. Após 3 lavagens, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados Alexa (anti-coelho conjugado com Alexa 555 e anti-cabra conjugado com Alexa 488), na diluição de 1:300 por 3h à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com corante de ácidos nucleicos, o DAPI (1:100, Invitrogen®), por 30 min, à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas com PBS/Glicerol (1:1). As células foram observadas com óleo de imersão na objetiva de 63 X utilizando o microscópio confocal invertido (Zeiss LSM510 Meta).

3.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas por meio do teste *t* de *Student* para os valores não pareados ou análises de variâncias de duas vias (ANOVA) com testes *post-hoc* do tipo Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Softwares Inc.*, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Expressão gênica das β -arrestinas 1 e 2

Inicialmente investigamos o perfil de expressão gênica das β -arrestinas 1 e 2 em cultura primária de células endoteliais de veia safena humana (hSVEC) por meio da metodologia RT-PCR em tempo real. A expressão dos transcritos foi normalizada por ciclofilina. Como ilustrado na Figura 4, a expressão basal do RNAm da β -arrestina 2 foi cerca de 3 vezes mais elevada do que β -arrestina 1 ($P < 0,001$).

Figura 4 - RT-PCR em tempo real para os genes β -arrestinas 1 e 2. Avaliação da expressão em cultura primária de células endoteliais de veia safena. Entre parênteses está mostrado o intervalo de confiança. * $P < 0,001$ versus β -arrestina 1.

4.2 Silenciamento das β -arrestinas 1 e 2

O *shear stress* é um estímulo potente para a produção de óxido nítrico endotelial (NO)³⁷. Para avaliar o papel da β -arrestina na produção de NO , as células

endoteliais de veia safena (hSVEC) foram transfectadas simultaneamente com siRNA contra as isoformas 1 e 2 da β -arrestina ou siRNA controle (sequência aleatória). Inicialmente, foram realizados testes para a padronização do silenciamento, testamos a concentração de siRNA, número de células no início da transfecção, tempo de incubação após a transfecção e o meio de cultura utilizado durante a transfecção. O objetivo da padronização era obter células silenciadas, viáveis e com confluência adequada para o estímulo do *shear stress*, isso foi alcançado com 60×10^4 células no início da transfecção (Figura 5). Essa condição foi utilizada nos experimentos posteriores. A redução da expressão proteica da β -arrestina 1/2 foi avaliada por *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal que detecta ambas as isoformas da β -arrestina.

Figura 5 - Padronização do silenciamento da β -arrestina 1/2. Análise da eficiência da transfecção por *Western blotting* com anticorpo específico para β -arrestina 1/2. Curva do número de hSVEC plaqueadas para a transfecção. N=2.

A expressão proteica da β -arrestina 1/2 endógena foi reduzida em 70% comparado com o siRNA controle (Figura 6A), similarmente, foi observada redução na expressão da isoforma β -arrestina 1 (Figura 6B) e β -arrestina 2 (Figura 6C). Foram utilizados anticorpos específicos para cada isoforma.

Figura 6 - Silenciamento das β -arrestina 1 e 2 com siRNA. A. Análise por *Western blotting* da eficiência da redução da expressão proteica das β -arrestina 1/ 2, B. β -arrestina 1 e C. β -arrestina 2. As bandas foram quantificadas por densitometria e corrigidas pelo GAPDH, representação da porcentagem do siRNA CTL. * $P < 0,001$, # $P < 0,05$ em relação ao siRNA CTL, N=6.

Com relação à morfologia das hSVEC durante o procedimento de silenciamento, observamos que 16h após a transfecção, algumas células se soltaram da placa. No final do período de incubação da transfecção (72h), as células recuperaram a confluência na placa (Figura 7).

Figura 7 - Morfologia da hSVEC antes e após transfecção com siRNA. Imagens representativas A. hSVEC antes da transfecção. B. hSVEC 16h após transfecção, imagem com magnificação 100 X e C. 200 X. D. hSVEC 72h após transfecção, no dia do estímulo com *shear stress*.

A seguir, avaliamos a viabilidade celular das hSVEC transfectadas por meio da marcação com o reagente 7AAD que detecta morte celular. Inicialmente, analisamos a condição controle, hSVEC não transfectadas e cerca de 90% das células eram viáveis (10,73% de mortalidade). As células transfectadas com siRNA controle apresentaram uma porcentagem de mortalidade de 30,97% e com siRNA β -arrestina

a porcentagem foi de 11,60%, sendo este um valor bem próximo da situação controle (Figura 8). As hSVEC foram consideradas viáveis para a continuidade dos experimentos.

Figura 8 - Viabilidade das células hSVEC transfectadas com siRNA. *Density plots* representativos da intensidade de fluorescência do 7AAD *versus* tamanho celular (Forward Scatter), as células no *gate* positivo representam a mortalidade celular. A. controle negativo, células não transfectadas e sem o 7AAD. B. células não transfectadas com 7AAD mortalidade. C. células transfectadas com siRNA controle. D. células transfectadas com siRNA para β -arrestina 1/2. N=3.

4.3 Produção de óxido nítrico em hSVEC silenciadas para β -arrestina 1/2

Células endoteliais com expressão reduzida de β -arrestina 1/2 e controles foram submetidos ao *shear stress* (15 dinas/cm²) durante 10 min e, posteriormente, a produção de nitrito foi quantificada no meio de cultura. Interessantemente, o silenciamento das β -arrestinas preveniu o aumento da produção de $\cdot$ NO induzido pelo SS. O nitrito foi normalizado pela quantidade de proteína da cada placa (nmol/mg de proteína), (Figura 9A, 47 $\pm$ 7 vs 183 $\pm$ 32 nmol/mg proteína, respectivamente para estático e SS nas células com siRNA controle, e 57 $\pm$ 10 vs 85 $\pm$ 21 nmol/mg de proteína, respectivamente para estático e SS nas células com siRNA β -arrestina 1/2, n=6). Na figura 9B está representada a porcentagem do NO em relação ao seu próprio estático (NS).

Figura 9 - O silenciamento da β -arrestina 1/2 previne a produção de óxido nítrico induzida por *shear stress*. A concentração do nitrito (NO^{2-}) foi quantificada no meio de cultura das células após o SS e A. corrigida pelo total de proteína da placa e B. expressa como porcentagem da produção obtida no estático (NS). A análise estatística foi realizada com os valores da média da produção de NO^{2-} (nmol/mg proteína), valores de P : interação $P=0,0179$, efeito da transfecção $P=0,0485$, efeito do estímulo $P=0,0010$. Dados são a média $\pm$ SEM, N=6.

4.4 Papel da β -arrestina na fosforilação da Akt, eNOS e ERK1/2 em resposta ao *shear stress*

Para elucidar o mecanismo da sinalização mediada por β -arrestina na produção de óxido nítrico induzido por SS, nós avaliamos o seu papel na fosforilação de proteínas envolvidas na produção de NO em células endoteliais. A fosforilação da Akt no resíduo serina 473 que ocorre após o estímulo do *shear stress* nas células controles não ocorreu em células silenciadas para β -arrestina 1/2 (Figura 10A, 100 ± 31 vs 362 ± 56 , respectivamente para estático e SS nas células com siRNA controle, e 84 ± 26 vs 126 ± 24 , respectivamente para estático e SS nas células com siRNA β -arrestina 1/2, N=6). Valores de *P*: interação *P*= 0,0075, transfecção *P*= 0,0029, estímulo *P*= 0,0006. Adicionalmente, a fosforilação da eNOS na serina 1177 também foi prevenida nas células transfectadas com siRNA β -arrestina 1/2 (Figura 10B, 100 ± 14 vs 221 ± 37 , respectivamente para estático e SS nas células com siRNA controle, e 82 ± 18 vs 75 ± 20 , respectivamente para estático e SS nas células com siRNA β -arrestina 1/2, N=6). Valores de *P*: interação *P*= 0,0172, transfecção *P*= 0,0039, estímulo *P*=0,0319. A expressão da Akt e eNOS total não foram alteradas pelo silenciamento da β -arrestina 1/2 ou pelo *shear stress*. Desse modo, nossos dados demonstram que as proteínas β -arrestina 1 e 2 são necessárias para a fosforilação da Akt e ativação da eNOS induzidas pelo SS em células endoteliais.

Por outro lado, a fosforilação da ERK1/2 pelo *shear stress* não mostrou diferença significativa entre as células silenciadas e as controle, como representado na Figura 11 (100 ± 35 vs 143 ± 29 , respectivamente para estático e SS nas células com siRNA controle, e 97 ± 13 vs 176 ± 31 , respectivamente para estático e SS nas células com siRNA β -arrestina 1/2, N=6). Valores de *P*: interação *P*= 0,5379, efeito da

transfecção $P=0,6005$, efeito do estímulo $P= 0,0429$. A expressão da ERK total não foi alterada pelo silenciamento da β -arrestina 1/2 ou *shear stress*. Esses dados demonstram que a ERK1/2 não está envolvida na resposta ao SS mediada por β -arrestina.

Figura 10 - Papel da β -arrestina 1/2 na fosforilação da Akt e eNOS em resposta ao *shear stress*. Células endoteliais foram transfectadas com siRNA CTL (sequência aleatória de siRNA) e siRNA β -arr1/2 (siRNA contra a sequência da β -arrestina). Após 72h da transfecção, as células foram carenciadas em meio sem soro por 16h e, em seguida, submetidas ao SS (15 dinas/cm²) por 10min. Análise da expressão da Akt total e sua forma fosforilada (Ser473). Os valores da fosfo-Akt/ total Akt foram representados graficamente como porcentagem do siRNA CTL estático. Significância estatística foi calculada por análise de variância, valores de P : interação $P= 0,5379$, efeito da transfecção $P=0,6005$, efeito do estímulo $P= 0,0429$. Do mesmo modo, a análise foi realizada para a fosfo- eNOS/ total eNOS valores de P : interação $P= 0,0172$, transfecção $P= 0,0039$, estímulo $P= 0,0319$. Dados são a média $\pm$ SEM, $N=6$.

Figura 11 - Papel da β -arrestina 1/2 na fosforilação da ERK 1/2 em resposta ao *shear stress*. Células endoteliais foram transfectadas com siRNA CTL (sequência aleatória de siRNA) e siRNA β -arr1/2 (siRNA contra a sequência da β -arrestina). Após 72h da transfecção, as células foram carenciadas em meio sem soro por 16h e, em seguida, submetidas ao SS (15 dinas/cm²) por 10min. Análise da expressão da ERK 1/2 total e sua forma fosforilada (Thr202/Tyr204). Os valores da fosfo-ERK/total ERK foram representados graficamente como porcentagem do siRNA CTL estático. Análise de variância (*two way ANOVA*), valores de *P*: interação *P*= 0,5379, efeito da transfecção *P*=0,6005, efeito do estímulo *P*= 0,0429. Dados são a média $\pm$ SEM, N=6.

4.5 Análise de interação da β -arrestina com mecanossensores do *shear stress*

O estímulo do *shear stress* é detectado pelo endotélio via diferentes sensores mecânicos (mecanossensores) presentes na membrana das células endoteliais. Tem sido proposto que alguns desses sensores podem ser agrupados em um complexo denominado “mechanosome”⁵⁰, que é constituído por cavéolas, moléculas de adesão endotelial plaquetária (PECAM), receptor de fator de crescimento endotelial 2 (VEGFR2), endotelial vascular (VE)-caderina e receptores acoplados à proteína G (GPCR)⁵⁰.

Inicialmente nos propusemos a analisar o envolvimento do receptor AT1R na produção de NO via β -arrestina em hSVEC submetidas ao SS e para tal, induzimos o silenciamento do AT1R utilizando siRNA específico. Primeiro foi realizado um teste de eficiência em células HEK-293 com dois tipos de siRNA que possuem sequências alvo diferentes e que foram sintetizados pela empresa Santa Cruz ou pela *Life Technologies*. Como as células HEK-293 não apresentam o receptor AT1R, fizemos uma co-transfecção do plasmídeo para expressão do AT1R concomitantemente com várias concentrações do siRNA para essa mesma proteína. A eficiência do silenciamento do AT1R foi analisada a partir da estimulação das células com a Angiotensina II e análise da expressão proteica da pERK 1/2, devido à falta de especificidade dos anticorpos para detectar o AT1R no *Western blotting*^{77,78}.

Como demonstrado na Figura 12, as células HEK-293 transfectadas com o receptor AT1R responderam à AngII aumentando a fosforilação da ERK 1/2 quando comparadas às células controle, ou seja, células sem transfecção (CTL) ou transfectadas com siRNA Controle (CTL siRNA). O silenciamento do AT1R nas células HEK-293 resultou na diminuição da fosforilação da ERK nas células

estimuladas com AngII, sendo o siRNA da empresa *Life Technologies* mais eficiente nesse processo (Figura 12A). Entretanto, o emprego dos mesmos siRNA nas células endoteliais (hSVEC) não foi efetivo em promover o silenciamento do receptor AT1R (Figura 12B).

B

Figura 12 - Silenciamento do receptor AT1R nas células HEK-293 e hSVEC. A. Teste de eficiência do siRNA para o AT1R nas células HEK-293. As células foram co-transfectadas com o plasmídeo AT1R e diferentes concentrações de siRNA das empresas *Life Technologies* ou Santa Cruz e, em seguida, estimuladas com AngII (10^{-6} M). B. Silenciamento do AT1R nas células hSVEC. Análise do silenciamento com ativação da fosforilação da ERK 1/2 por *Western blotting*. Dado normalizado pelo siCTL NS, CTL, células não transfectadas, N=3. NS= estático.

Devido a ineficiência do silenciamento do AT1R com siRNA resolvemos bloquear o receptor AT1R com as seguintes drogas: Candesartan (10^{-6} M), metabólito do Losartan (EXP3174; 10^{-6} M) e o TRV120027 (10^{-6} M), um agonista *biased* do receptor AT1R que ativa somente a via de sinalização da β -arrestina. Para analisar se o bloqueio do AT1R foi efetivo, incubamos as hSVEC com as drogas durante 30 min antes de serem estimuladas com a AngII ou o *shear stress*. Como controle do

experimento utilizamos hSVEC sem estímulo (NS) e também estimuladas somente com AngII. Na análise dos controles do experimento observamos que as hSVECs responderam ao estímulo do *shear stress* com aumento na fosforilação da ERK1/2 enquanto que a resposta à AngII foi praticamente nula (Figura 13). Essa falta de resposta à AngII pode ser devido à redução/perda de expressão do AT1R quando as células endoteliais são mantidas em cultura primária o que impossibilita a análise do efeito dos bloqueadores AT1R na resposta destas células. Como esses dados inviabilizam a análise da interação entre a β -arrestina 1/2 e o AT1R na resposta ao *shear stress*, seguimos com a investigação da sua associação com outros mecanossensores do *shear stress*.

Figura 13 - Bloqueio do receptor AT1R nas células endoteliais de veia safena humana. As hSVEC foram previamente tratadas com 10^{-6} M de Candesartan (Cand), metabólito do Losartan (EXP74) ou TRV120027 (TRV) separadamente, durante 30 min e, em seguida, estimuladas com Angiotensina II (10^{-7} M) nos tempos (5, 10 e 20 min) ou SS durante 10 min. Análise do silenciamento com ativação da fosforilação da ERK 1/2 por *Western blotting*. Dado normalizado pelo NS. NS= estático ou não estimulado. N=4.

Utilizamos a técnica de imunoprecipitação para avaliar se a β -arrestina interage com mecanossensores do *shear stress*. As células endoteliais foram submetidas ao SS por 10 min, lisadas e, em seguida, a β -arrestina 1/2 endógena foi imunoprecipitada com anticorpo específico. A análise da imunoprecipitação foi visualizada por *western blotting* com anticorpo específico para os candidatos, caveolina-1 e VE-caderina. Na Figura 14, verifica-se que a caveolina-1 foi co-imunoprecipitada com a β -arrestina 1/2 endógena, tanto em células mantidas na condição estática (NS) quanto naquelas sob o estímulo de SS nos tempos de 2, 5 e 10 min, e sem diferença na intensidade dessa associação após o SS. Por outro lado, a VE-Caderina não foi co-imunoprecipitada com a β -arrestina (Figura 14C).

Figura 14 - β -arrestina interage com caveolina-1 em células endoteliais vasculares humanas (hSVEC). A. Imunoprecipitação da β -arrestina endógena do homogenato total na condição estática (NS) e após o *shear stress* (SS) de 10 min e B. SS de 2 e 5 min. C. Em todos os tempos de SS a VE-caderina não foi imunoprecipitada com a β -arrestina. HT: homogenato total, IP: imunoprecipitação, PIP: sobrenadante pós-imunoprecipitação, UL: última lavagem, IgG: anticorpo utilizado na imunoprecipitação. N=3.

4.6 Expressão proteica e translocação da β -arrestina 1/2 após o *shear stress*

Considerando a participação da β -arrestina 1/2 na via de sinalização em resposta ao *shear stress*, nossos próximos experimentos tinham como objetivo verificar o perfil de expressão e de translocação dessas proteínas após o estímulo mecânico.

Conforme representado na figura 15A, o *shear stress*, nos tempos de 0, 10, 30 e 60 minutos, não alterou a expressão proteica total da β -arrestina 1/2. Além disso, a β -arrestina permaneceu na fração de citosol após o SS, sem haver translocação para as frações de membrana (Figura 15B).

As β -arrestinas citosólicas são constitutivamente fosforiladas e após recrutamento para a membrana plasmática em resposta à ativação do receptor GPCR por agonistas, elas são desfosforiladas¹³⁻¹⁵. A β -arrestina 1/2 desfosforilada interage melhor com a clatrina, promovendo a internalização do receptor^{13,14}. Em nosso modelo experimental, investigamos se o *shear stress* influenciava a desfosforilação da β -arrestina 1 e, conforme demonstrado na Figura 16 não houve diferença no grau de fosforilação da β -arrestina 1 entre as condições estática e SS, sugerindo não haver translocação da β -arrestina 1 para a membrana após o estímulo mecânico e corroborando o dado anterior de fracionamento celular.

Figura 15 - Expressão e translocação da β -arrestina 1/2 em hSVEC após *shear stress*. A. Análise por *western blotting* da expressão da β -arrestina 1/2 no estático (NS) e após *shear stress* (SS) de 15 dinas/cm² por 10, 30 e 60 min. B. Análise da β -arrestina 1/2 em homogenatos celulares de fração de membrana e citosol no estático (NS) e após 10 e 30 min de SS. A quantificação da expressão proteica está exibida, graficamente, a partir dos valores obtidos por densitometria e corrigidos pelo controle de GAPDH. N=3.

Figura 16 - O *shear stress* não alterou a fosforilação da β -arrestina 1. Análise da expressão proteica da forma fosforilada da β -arrestina 1 (Ser412). As bandas foram quantificadas por densitometria e corrigidas pelo GAPDH. N=4.

Ainda com o objetivo de avaliar alteração no perfil de translocação das β -arrestinas, realizamos análise por microscopia confocal que mostrou uma redistribuição celular da β -arrestina 2 após o *shear stress* (Figura 17). Na condição basal, a β -arrestina estava predominantemente localizada na região perinuclear, e, após o *shear stress*, essa localização passou a ser mais difusa, abrangendo toda a célula.

Figura 17 - Experimento de co-localização entre β -arrestina 2 e caveolina-1 em hSVEC, por microscopia confocal. Figura representativa da imunodeteccção da β -arrestina 2 (verde), caveolina-1 (vermelho), e núcleo (corado por DAPI, Azul) em hSVEC na condição estática e submetida ao *shear stress*. N=4.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho sugerem a participação da via de sinalização mediada pela β -arrestina 1/2 na produção de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) induzida por *shear stress* agudo em células endoteliais de veia safena de humanos (hSVECs). A redução de 70% na expressão da proteína β -arrestina 1/2 inibiu a produção de $\cdot\text{NO}$ em hSVEC submetidas a 10 min de SS laminar e de alta intensidade, este efeito esteve associado à inibição da fosforilação e consequente ativação das proteínas Akt e eNOS, envolvidas na sinalização e síntese de $\cdot\text{NO}$. A ativação da ERK 1/2, por sua vez, não foi comprometida pelo silenciamento da β -arrestina 1/2.

A ativação da enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) pelo *shear stress* já é bem descrita na literatura^{70,74,82}. Estudos mostram que a ativação da eNOS para a produção de $\cdot\text{NO}$ pode ocorrer na ausência de um aumento na concentração intracelular de cálcio e pode ser atribuída à ativação da via Akt/PKB e subsequente fosforilação da eNOS no resíduo de aminoácido Serina localizado na posição 1177⁸³. Entretanto, o mecanismo molecular responsável pela detecção do *shear stress* e conversão em sinais bioquímicos que levem à ativação da eNOS e produção de óxido nítrico não é totalmente compreendido, podendo envolver vários mecanossensores, como os receptores acoplados à proteína G (GPCR)^{62,63}, cavéolas⁵³, integrinas⁵⁸, entre outros.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o receptor de angiotensina II, AT1R, pode ser ativado pelo *shear stress* na ausência do seu ligante e pelas vias dependente e independente de proteína G⁶³. Além disso, o tratamento prévio com o

agonista inverso do AT1R, o candesartan, potencializou a produção de NO estimulada pelo *shear stress*, via fosforilação da eNOS⁷⁵.

Além do seu papel na mecanotransdução ao *shear stress*, Rakesh e colaboradores (2010) mostraram que o estiramento mecânico em cardiomiócitos ativa o receptor de angiotensina II (AT1R) por um mecanismo dependente de β -arrestina, e na ausência de ligante e de ativação de proteína G. Sabe-se que após interação com seu agonista, receptores AT1R formam aglomerados na membrana em interação com a β -arrestina 2 e são internalizados em seguida¹⁰. No estudo de Rakesh e colaboradores (2010), os autores avaliaram que o estiramento mecânico parecia induzir a β -arrestina 2 a adotar uma conformação distinta daquela adquirida quando o receptor era ativado pela AngII, o que também foi observado após estimulação com o agonista *biased* SII⁴³. Além disso, demonstraram que a β -arrestina estava envolvida na fosforilação da ERK 1/2 e na ativação da Akt associada a um efeito antiapoptótico⁴³.

Considerando que a mecanotransdução do SS não está totalmente elucidada, que a via da proteína G tem participação parcial nesse processo e que a β -arrestina é considerada como uma sinalização distinta e paralela à proteína G, no presente trabalho nos propomos a investigar se a β -arrestina poderia estar envolvida na ativação de vias de sinalização em células endoteliais submetidas ao *shear stress*.

A sinalização independente de proteína G, processo mediado por β -arrestina, é um conceito relativamente novo que vem sendo bastante estudado no sistema cardiovascular. Nossos dados obtidos com o silenciamento da β -arrestina em hSVEC sugerem a participação dessa via na produção de óxido nítrico induzido pelo *shear stress*, associado à redução na fosforilação da proteína Akt, que, posteriormente,

fosforila a enzima eNOS. Nossos resultados são corroborados pelo estudo de Violin (2010) e colaboradores que, mostraram que o agonista seletivo para a via de β -arrestina no AT1R, o TRV120027 estimula a ativação da eNOS via Akt em células U2-OS, e que essa ativação da eNOS foi eliminada nas células silenciadas para a β -arrestina-2. Recentemente, outro grupo reportou que a diminuição a expressão proteica da β -arrestina 2 inibiu a sinalização Akt/eNOS em células endoteliais humanas em condições de elevada glicose/insulina no meio de cultura⁸⁴, sugerindo que a β -arrestina pode atuar como um modulador positivo na sinalização Akt/eNOS.

Outros estudos também têm descrito a ativação da Akt mediada pela via de β -arrestina para diferentes funções fisiológicas. O trabalho de Ahn e colaboradores (2009) mostrou que a estimulação do receptor AT1R em cultura de células vasculares do músculo liso levou à ativação da Akt que convergiu para a fosforilação e inativação da proteína pró-apoptótica BAD, sugerindo o papel citoprotetor da via da β -arrestina³¹. Em outro estudo, a ativação da Akt dependente de β -arrestina reduziu a apoptose após a reperfusão em modelo de isquemia cardíaca, efeito inibido nos animais *knockout* para a β -arrestina⁸⁵. Já em receptores de dopamina, a β -arrestina tem papel importante na regulação da Akt, pois serve como adaptadora entre a quinase e sua fosfatase PP2A após a ativação do receptor e camundongos deficientes em β -arrestina apresentaram redução na resposta dependente de dopamina⁸⁶.

Embora diversos trabalhos descrevam a ativação da ERK 1/2 como dependente de β -arrestina^{39,43,87}, nossos dados não demonstram redução na fosforilação da ERK 1/2 em resposta ao *shear stress* nas células silenciadas para a β -arrestina. Essa ausência de alteração está de acordo com a produção de NO pelo endotélio, pois a

ERK1/2 não participa da ativação da eNOS, regulando seu sítio inibitório (Treonina 495)⁷².

Recentemente, foi demonstrado por nós, em células CHO (*Chinese hamster ovary*) com superexpressão de AT1R e por outro grupo, em células endoteliais de cordão umbilical (HUVEC), que o receptor de angiotensina, AT1R, é um mecanossensor do *shear stress*^{62,63}. Com isso, decidimos investigar se o AT1R estaria envolvido com a via de sinalização mediada por β -arrestina na produção de óxido nítrico induzido por *shear stress* agudo e realizamos experimentos de bloqueio do receptor AT1R com Candesartan, um dos metabólitos do Losartan (EXP3174) e o agonista *biased* TRV027. Já em um primeiro momento, observamos que a cultura primária de hSVEC respondeu muito pouco ao estímulo da Angiotensina II em promover a fosforilação da ERK 1/2 (Figura 13), sem no entanto, deixar de responder efetivamente ao *shear stress*. A ausência de resposta à AngII pode ser devido à redução e ou perda total da expressão do receptor AT1R na nossa cultura primária de células de veia safena. Desse modo, não conseguimos avaliar a interação entre AT1R e β -arrestina na resposta ao *shear stress* em nosso modelo experimental. As evidências indicam que o AT1R é um mecanossensor do *shear stress*, mas não significa que este receptor é responsável por 100% da resposta, e certamente ocorre a participação de outros mecanossensores, e possivelmente as β -arrestinas estariam envolvidas na mecanotransdução.

Existem vários mecanossensores no endotélio vascular que são importantes para a detecção e/ou conversão do *shear stress* em sinais biológicos, como, por exemplo, as cavéolas^{53,88}. Observamos por imunoprecipitação a interação da principal proteína de cavéolas, a caveolina-1, com a β -arrestina, em condição estática e após o *shear*

stress (Figura 14). A interação entre a β -arrestina e caveolina-1 foi descrita anteriormente em células HUVEC, onde foi demonstrado que a ativação da sinalização citoprotetora dos receptores ativados por protease (PAR1) pelo agonista APC ocorre nas cavéolas e é dependente de β -arrestina 1/2⁸⁹. Adicionalmente, a interação entre o receptor PAR-1, β -arrestina 1/2 e caveolina-1 ocorreu em células em condições basais e após a estimulação com o agonista APC⁸⁹. Esses resultados sugerem que β -arrestinas e caveolina-1 estão num complexo previamente montado que se mantém associado mesmo após a estimulação.

As cavéolas ricas em caveolina-1 são abundantes nas células endoteliais e estão envolvidas na regulação do tônus e da homeostasia vascular por meio da produção de óxido nítrico pela eNOS. Nas células não estimuladas, a enzima eNOS é mantida no estado inativo por meio da associação com a caveolina-1⁶⁸. Após estímulos como o *shear stress*, a eNOS dissocia-se da caveolina-1 podendo ser ativada pela fosforilação da serina 1177 via Akt^{68,69} ou interage com a calmodulina e a chaperona Hsp90⁹⁰, e inicia a síntese de óxido nítrico. Embora sejam necessários estudos futuros para analisar se as proteínas β -arrestinas, caveolina-1, Akt e eNOS estão localizadas no mesmo compartimento celular durante o *shear stress*. Nossos dados sugerem que a interação entre β -arrestina 1/2 e caveolina-1 está envolvida na produção de NO .

Os resultados de microscopia confocal não mostram co-localização entre β -arrestina e caveolina-1, possivelmente devido a uma pequena fração dessas proteínas se associarem antes e após o *shear stress*. Os dados de microscopia mostram a localização subcelular da β -arrestina após o *shear stress*, que adquiriu um padrão difuso por todo o citoplasma após o estímulo comparado com uma localização

perinuclear nas células na condição estática. Estudos recentes têm apresentado diferentes padrões de recrutamento da β -arrestina em células HEK-293. Por exemplo, o tratamento com isoproterenol, agonista do receptor β -adrenérgico (receptor classe A), resultou na redistribuição da β -arrestina 1 e 2 do citosol para a membrana plasmática⁴³. Entretanto, a ativação do receptor AT1R (receptor classe B) com Angiotensina II resultou na translocação da β -arrestina para vesículas endocíticas, o que sugere uma interação estável entre a β -arrestina e o receptor internalizado^{91,92}. Esse padrão também foi encontrado com a ativação do AT1R por estiramento osmótico e cíclico em células HEK-293 transfectadas com AT1R⁴³. O padrão de translocação da β -arrestina encontrado no *shear stress* foi diferente destes citados, já que, por exemplo, não envolve a participação do receptor AT1R na resposta ao estímulo. Além da microscopia confocal, a análise da expressão proteica da β -arrestina em frações de membrana e citosol por *western blotting* confirmam que o *shear stress* não induziu a translocação da β -arrestina do citosol para a membrana plasmática (Figura 15B), tal como se é observado quando há ativação de receptores β -adrenérgicos por seus agonistas⁴³.

A descoberta da via mediada por β -arrestina tem gerado interesse no desenvolvimento de alvos terapêuticos mais eficazes por meio de uma sinalização seletiva para a β -arrestina ou proteína G. Como por exemplo, o agonista do receptor AT1R que é seletivo para a via da β -arrestina, o TRV0027, foi responsável por aumentar a contratilidade cardíaca, prevenir a apoptose cardíaca e reduzir a pressão arterial em modelo animal⁸⁵, e já está sendo testado em humanos⁹³. Por outro lado, em outros estudos, a via da proteína G teve papel benéfico ao invés da β -arrestina, como por exemplo, com o ligante do receptor μ -opioide TRV130, em que a ativação

da proteína G é um potente analgésico, melhor que a morfina e a via mediada pela β -arrestina está relacionada com os efeitos colaterais como a constipação e tolerância⁹⁴.

A ativação da via Akt/eNOS para a produção do $\cdot\text{NO}$ durante o *shear stress* agudo é bem conhecida, entretanto, é a primeira vez que se mostra a participação da β -arrestina nessa via de sinalização no sistema vascular.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nossos dados indicam um importante papel da β -arrestina 1/2 na produção de óxido nítrico induzido por *shear stress* agudo em células endoteliais. Essa ativação envolve a via de sinalização Akt/ eNOS. Adicionalmente, a β -arrestina está associada com a caveolina-1 independente do *shear stress*, sugerindo que estas proteínas estejam previamente associadas em um complexo que se mantém após o estímulo mecânico. O *shear stress* agudo, por sua vez, induziu uma redistribuição subcelular da β -arrestina sem alterar sua expressão. Estes resultados evidenciam um papel importante da sinalização mediada por β -arrestina no sistema vascular.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A. Cópia do parecer de aprovação do projeto no Comitê de Ética para análise de projetos de Pesquisa- CAPPesq.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

3752/12/008

PROJETO DE PESQUISA

Título: PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA BETA-ARRESTINA NA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR AT1 INDUZIDA PELO SHEAR STRESS
Pesquisador Responsável: José Eduardo Krieger
Pesquisador Executante: Ana Paula Carneiro dos Santos
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

Versão: 1
CAAE: 00688412.5.0000.0068

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número On Line CAPPesq: 8887

Número do Parecer: 66174

Data da Relatoria: 08/08/2012

Apresentação do Projeto: O Projeto que apresenta como proposta estudar a via de sinalização da Beta-arrestina na ativação do receptor AT1 induzida pelo Shear stress, está bem desenhado e descreve sua casuística de maneira clara, assim como a metodologia utilizada para chegar aos seus objetivos.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo do projeto apresenta relevância científica e é de grande importância na área básica, pois trará conhecimentos sobre mecanismos biológicos de sinalização celular, que poderão ser utilizados no estabelecimento de futuras terapias em humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os sujeitos de pesquisa não terão benefícios diretos com a pesquisa, mas seu consentimento será de grande valia a longo prazo, pois novas terapias poderão ser padronizadas a partir do material doado. Por outro lado, os riscos para o paciente só existem no que diz respeito a própria cirurgia de revascularização cardíaca por ponte de safena.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O Projeto dá continuidade a linha de pesquisa dos pesquisadores e faz uma ligação importante entre os conhecimentos na área básica e clínica. O estabelecimento de uma linhagem endotelial será de grande valia na área de clínica médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O termo de consentimento está adequado e explica a importância do estudo de forma clara e adequada ao entendimento do sujeito da pesquisa.

Recomendações: Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.

Situação do Parecer: APROVADO

Andressa
COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
09/08/2012

São Paulo, 08 de Agosto de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

7.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:.....Nº..... APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “Participação da via de sinalização da beta arrestina na ativação do receptor AT1R induzida pelo *shear stress*

PESQUISADOR : Prof. Dr. José Eduardo Krieger

CARGO/FUNÇÃO: Diretor Lab. Genética e Cardiologia Molecular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração- Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 15 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

O objetivo desta pesquisa é estudar as células endoteliais que constituem a camada celular interna dos vasos sanguíneos, tais como a veia safena. Este estudo é importante para a compreensão de como estas células respondem a diferentes estímulos, como por exemplo, a força de atrito entre o sangue e a parede do vaso, medicamentos, entre outros.

O paciente será submetido ao procedimento rotineiro da cirurgia de revascularização cardíaca por ponte de safena no Instituto do Coração (HCFMUSP) e o segmento da veia safena não aproveitado será utilizado na pesquisa, sem nenhum procedimento adicional ao rotineiro.

O segmento da veia safena será utilizado para a obtenção das células endoteliais que serão mantidas em cultura celular para realização de experimentos que representam a condição *in vivo*. Estas células serão armazenadas no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular no 10º andar.

Não há benefício direto para o participante desta pesquisa. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que as células endoteliais quando submetidas à força de atrito do sangue ativam uma via sinalização dependente de uma proteína chamada beta-arrestina. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para a área médica.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. José Eduardo Krieger, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44, bloco II, Laboratório de Cardiologia e Genética Molecular. Telefone: (11) 2661-5543. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

A equipe de pesquisadores compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Participação da via de sinalização da beta arrestina na ativação do receptor AT1R induzida pelo “*shear stress*”.

Eu discuti com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*. 1990;248(4962):1547-50.
2. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:289-319.
3. Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, Christe M, Vatner SF, Seidman CE, Seidman JG. beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res*. 1997;81(6):1021-6.
4. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*. 1999;286(5449):2495-8.
5. Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(4):1601-6.
6. Lefkowitz RJ. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(8):413-22.
7. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*. 1998;273(30):18677-80.
8. Zimmerman B, Beaudrait A, Aguila B, Charles R, Escher E, Claing A, Bouvier M, Laporte SA. Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling

- and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal*. 2012;5(221):ra33.
9. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(4):159-65.
 10. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32248-57.
 11. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(22):17201-10.
 12. Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*. 2001;294(5545):1307-13.
 13. Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry*. 2002;41(34):10692-9.
 14. Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem*. 1997;272(49):31051-7.
 15. Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*. 1999;274(23):15971-4.
 16. Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, Stamler JS. S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell*. 2008;31(3):395-405.

17. Shenoy SK, Barak LS, Xiao K, Ahn S, Berthouze M, Shukla AK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem*. 2007;282(40):29549-62.
18. Hicke L, Dunn R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:141-72.
19. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*. 2003;375(Pt 3):503-15.
20. Wojcikiewicz RJ. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(1):35-41.
21. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(9):521-33.
22. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:483-510.
23. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol Cell*. 2006;24(5):643-52.
24. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 2005;308(5721):512-17.
25. DeFea KA. Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:535-60.
26. Rajagopal K, Whalen EJ, Violin JD, Stiber JA, Rosenberg PB, Premont RT, Coffman TM, Rockman HA, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(44):16284-9.

27. Povsic TJ, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51334-9.
28. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol*. 2009;7(8):e1000172.
29. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(20):11086-91.
30. DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10611-20.
31. Ahn S, Kim J, Hara MR, Ren XR, Lefkowitz RJ. {beta}-Arrestin-2 mediates anti-apoptotic signaling through regulation of BAD phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8855-65.
32. Taguchi K, Sakata K, Ohashi W, Imaizumi T, Imura J, Hattori Y. Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(2):199-208.
33. Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(5):1442-7.
34. Kenakin T. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(8):407-15.

35. Kenakin TP. Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(8):617-26.
36. Violin JD, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(8):416-22.
37. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med.* 2010;17(3):126-39.
38. Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, Liu J, Masurekar M, Thaisz J, Irie K, Holle E, Yu X, Kupersmidt S, Roden DM, Wagner T, Yatani A, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J. 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.* 2005;115(11):3045-56.
39. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335(3):572-9.
40. Cooper GT. Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:501-18.
41. Mondry A, Swynghedauw B. Biological adaptation of the myocardium to chronic mechanical overload. Molecular determinants of the autonomic nervous system. *Eur Heart J.* 1995;16(Suppl I):64-73.
42. Gosse P. Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl.* 2005;23(1):S27-33.
43. Rakesh K, Yoo B, Kim IM, Salazar N, Kim KS, Rockman HA. beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal.* 2010;3(125):ra46.
44. Tang W, Strachan RT, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Allosteric modulation of beta-Arrestin-Biased AT1R signaling by membrane stretch. *J Biol Chem.* 2014.

45. Nerem RM. Hemodynamics and the vascular endothelium. *J Biomech Eng.* 1993;115(4B):510-4.
46. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6(1):16-26.
47. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev.* 2011;91(1):327-87.
48. Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech.* 2005;38(10):1949-71.
49. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75(3):519-60.
50. Chatterjee S, Fisher AB. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(6):899-913.
51. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1209-24.
52. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.* 2006;259(4):381-92.
53. Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(4):H1720-9.
54. Yang B, Rizzo V. Shear stress activates eNOS at the endothelial apical surface through 1 containing integrins and caveolae. *Cell Mol Bioeng.* 2013;6(3):346-54.

55. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med.* 2006;259(4):339-50.
56. Loufrani L, Henrion D. Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med Biol Eng Comput.* 2008;46(5):451-60.
57. Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2003;93(4):354-63.
58. Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12001-4.
59. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005;437(7057):426-31.
60. Gudi SR, Clark CB, Frangos JA. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res.* 1996;79(4):834-9.
61. Yamamoto K, Ando J. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: blood flow sensing mechanism in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci.* 2011;116(4):323-31.
62. Ramkhalawon B, Rivas D, Lehoux S. Shear stress activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the angiotensin II type 1 receptor. *FASEB J.* 2013;27(8):3008-16.
63. Barauna VG, Magalhaes FC, Campos LC, Reis RI, Kunapuli SP, Costa-Neto CM, Miyakawa AA, Krieger JE (2013a) Shear stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013a;434(3):647-52.

64. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986;250(6 Pt 2):H1145-9.
65. Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;902:230-9; discussion 239-40.
66. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(3):C499-508.
67. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2427-9.
68. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5.
69. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601.
70. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(5):H1819-28.
71. Zhang Y, Lee TS, Kolb EM, Sun K, Lu X, Sladek FM, Kassab GS, Garland T, Jr, Shyy JY. AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1281-7.
72. Bao X, Lu C, Frangos JA. Mechanism of temporal gradients in shear-induced ERK1/2 activation and proliferation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(1):H22-9.
73. Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, McDonald JM. Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase

- in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem.* 1997;272(2):1395-401
74. Zhang QJ, McMillin SL, Tanner JM, Palionyte M, Abel ED, Symons JD. Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol.* 2009;587(Pt 15):3911-20.
75. Barauna VG, Mantuan PR, Magalhaes FC, Campos LC, Krieger JE. AT1 receptor blocker potentiates shear-stress induced nitric oxide production via modulation of eNOS phosphorylation of residues Thr(495) and Ser(1177.). *Biochem Biophys Res Commun.* 2013b;441(4):713-9.
76. Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(4):1740-44.
77. Elliott KJ, Kimura K, Eguchi S. Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type-1 receptor protein. *Hypertension.* 2013;61(4):e31
78. Herrera M, Sparks MA, Alfonso-Pecchio AR, Harrison-Bernard LM, Coffman TM. Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type 1 receptor protein. *Hypertension.* 2013;61(1):253-8.
79. Brons PP, Van Erp PE, Pennings AH. Simultaneous DNA content and cell-surface immunofluorescence analysis. *Methods Cell Biol.* 1994;41:95-102.
80. Miyakawa AA, de Lourdes Junqueira M, Krieger JE. Identification of two novel shear stress responsive elements in rat angiotensin I converting enzyme promoter. *Physiol Genomics.* 2004;17(2):107-13.
81. Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol.* 1992;263(2 Pt 1):C389-96.

82. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996;79(5):984-91.
83. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand*. 2000;168(1):81-8.
84. Taguchi K, Sakata K, Ohashi W, Imaizumi T, Imura J, Hattori Y. Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(2):199-208.
85. Kim KS, Abraham D, Williams B, Violin JD, Mao L, Rockman HA. beta-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(8):H1001-10.
86. Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*. 2005;122(2):261-73.
87. Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35518-25.
88. Rizzo V, Sung A, Oh P, Schnitzer JE. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem*. 1998;273(41):26323-9.
89. Soh UJ, Trejo J. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through beta-arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(50):E1372-80.

90. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*. 1998;392(6678):821-4.
 91. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):10782-7.
 92. Morinelli TA, Lee MH, Kendall RT, Luttrell LM, Walker LP, Ullian ME. Angiotensin II activates NF-kappaB through AT1A receptor recruitment of beta-arrestin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(12):C1176-86.
 93. Soergel DG, Subach RA, Sadler B, Connell J, Marion AS, Cowan CL, Violin JD, Lark MW. First clinical experience with TRV130: pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2013;54(3):351-7.
 94. DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen XT, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblish M, Lark MW, Violin JD. A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;344(3):708-17.
-

9 APÊNDICE

9 APÊNDICE

CURRICULUM VITAE

Ana Paula Carneiro dos Santos (Carneiro AP)

Nascimento: 22 de Junho de 1984, Brasília- DF.

Formação acadêmica/ Titulação

Pós-Graduação - Doutorado (2010- 2014)

Área: Ciências Médicas

Orientação: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração

Universidade de São Paulo- USP

Pós-Graduação- Mestrado (2008-2010)

Área: Ciências Básicas- Clínica Médica

Orientação: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Instituição: Faculdade de Medicina, Universidade de Campinas- Unicamp

Graduação (2002-2007)

Curso: Ciências Biológicas (Licenciatura/Bacharelado)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia- UFU

Ocupação

Professor substituto (início: 2014)

Instituição: Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

Bolsista Doutorado (2010- 2014)

Agência financiadora: Capes

Orientação: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Bolsista Mestrado (2008- 2010)

Agência financiadora: FAPESP

Orientação: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Instituição: Faculdade de Medicina- Unicamp

Publicações

Carneiro AP, Fonseca-Alaniz MH, Barauna VG, Miyakawa AA, Krieger, JE. β -arrestin and AKT/eNOS downstream signaling are required for early shear stress-induced nitric oxide production in human vascular endothelial cells (Submitted).

Carneiro AP, Reis CF, Morari EC, Maia YCP, Nascimento R, Bonatto JMC, Souza MA, Goulart LR, Ward LS. A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. *British Journal of Cancer*, v. 111, p. 551-558, 2014.

Araujo TG, Paiva CE, Rocha RM, Maia YCP, Sena AAS, Ueira-Vieira C, **Carneiro AP**, Almeida JF, Faria PR, Santos DW, Calábria L, Alcântara TM, Soares FA, Goulart LR. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. *Cancer Letters (Print)*, v. 343, p. 275-285, 2014.

Reis CF, **Carneiro AP**, Vieira CU, Fujimura PT, Morari EC, Silva SJ, Goulart LR, Ward LS. An antibody-like peptide that recognizes malignancy among thyroid nodules. *Cancer Letters (Print)*, v. 335, p. 306-313, 2013.

Resumos publicados em anais de congressos

Carneiro AP, Barauna VG, Fonseca-Alaniz MH, Girardi ACC, Krieger JE. β -arrestin-mediated signal transduction participates in laminar shear stress-induced production of nitric oxide in endothelial cells. In: Experimental Biology 2013, Boston. The FASEB Journal, 2013.

Patentes e registros

Goulart, LR; Reis, CF; **Carneiro, AP**; Capparelli, FE; Fujimura, PT; Morari, EC; Vieira, CU; Ward, LS. Anticorpos e peptídeos ligantes a tecidos tumorais a sua aplicações, Brasil, 2011. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PII103676 data de depósito: 08/04/2011, título: "ANTICORPOS E PEPTÍDEOS LIGANTES A TECIDOS TUMORAIS E SUAS APLICAÇÕES", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.