



Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

JULIO ALVES DA SILVA NETO

Estudo das relações funcionais entre proteínas O-gluconaciladas e a
sinalização do receptor de angiotensina II do tipo 1

Ribeirão Preto

2023

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Estudo das relações funcionais entre proteínas O-gluconaciladas e a
sinalização do receptor de angiotensina II do tipo 1

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

Ribeirão Preto

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva-Neto, Julio Alves da

Estudo das relações funcionais entre proteínas O-gluconaciladas e a sinalização do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1) / Julio Alves da Silva-Neto;

Orientadora: Rita de Cássia Aleixo Tostes; Coorientador: Cláudio Miguel da Costa-Neto. - São Paulo, 2022. 104 p. Tese (Doutorado) – Farmacologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2022.

1. GPCR. 2. Receptor AT1. 3. O-GlcNAc. 4. HEK293T. 5. db/db.

Este trabalho foi financiado com os recursos do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação, em conjunto com uma bolsa de auxílio ao Pós-graduando, benefício número 2017OB812940.

Agradecemos também ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), estruturado com recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia e a Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padronização do modelo in vitro de aumento de proteínas O-gluconaciladas. Células HEK293T expressando estavelmente o AT1R foram cultivadas em placas de 6 poços e, após confluência de cerca de 80%, foram submetidas ao aumento global de O-gluconacilação de proteínas usando thiamet G (TMG, 1 μ M) ou veículo (água) para a condição controle, respectivamente. Este tratamento permaneceu por 16-18 horas para posteriormente estimular com angiotensina II ou TRV027 por diferentes tempos para determinação da cinética de fosforilação de ERK. O TMG impede o desligamento das moléculas de N-acetil glucosamina das proteínas intracelulares, permitindo um aumento de proteínas O-gluconaciladas e detectáveis por imunoblot 38

Figura 2. Fotografia de um leito mesentérico de camundongo. Leito inteiro ligado ao intestino e protegido pelos tecidos adiposo conectivo, linfático e pela membrana peritoneal (à esquerda) e árvore arterial isolada (à direita), na qual foram realizadas as análises funcionais e bioquímicas. 50

Figura 3. Imagens e gráficos representativos das medições por imunoblot de conteúdo proteico citosólico de células HEK293T mantidas em meio de cultura, com privação de soro fetal bovino e na presença de veículo (água) ou do inibidor TMG (1 μ M, 16-18 h). Conteúdo global de proteínas O-gluconaciladas (A e B) e de efetores da via do AT1R, como (C) GRK2, (D) beta-arrestina 1 e 2, (E) Proteína quinase do tipo C-delta, e das principais enzimas relacionadas com a O-gluconacilação: (F) O-GlcNAc-ase OGA e (G) O-GlcNAc-transferase, OGT. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (em unidades arbitrárias) da divisão de valores absolutos de densitometria das bandas da proteína de interesse pelo normalizador (GAPDH ou beta-actina); () $p < 0,05$. Teste estatístico U de Mann-Whitney; $n = 8$ experimentos independentes. 54*

Figura 4. Imagens de imunoblot e gráficos da relação tempo-efeito da cinética de fosforilação de ERK 1/2 em células tratadas com TMG (1 μ M, 16-18 h) (quadros azuis) ou veículo (círculos pretos), e posteriormente estimuladas com (A) angiotensina II ($n = 8$), agonista balanceado e endógeno dos AT1R ou (B) TRV027 ($n = 6$), agonista do AT1R que não ativa as proteínas G α q/ α 11, mas ativa a via da beta-arrestina 1 e 2; () $p < 0,05$; teste t de Student. 56*

Figura 5. Mobilização de cálcio citosólico induzida por angiotensina II: (A) Gráfico temporal que representa a área sob a curva de fluorescência (AUC) após aplicação de veículo (solução de Hanks) ou Ang II a 100 nM. (B) Capacidade máxima do sistema em internalizar cálcio estimulada pelo ionóforo de cálcio ionomicina (10 μ M) em células tratadas com TMG (azul) ou veículo (branco) e (C) gráfico das curvas concentração-resposta, não cumulativas para Ang II realizadas em células controle (círculos pretos) ou tratadas previamente com TMG (quadros azuis), sendo que cada ponto desta sigmoide representa o valor de área sob a curva de cada concentração de Ang II aplicada. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Os valores de pEC_{50} e R_{max} foram obtidos na sigmoide, usando a equação de Hill-Langmuir com análise de 3 parâmetros. () $p < 0,05$; teste t de Student; $n = 8$ experimentos independentes. 57*

Figura 6. Imagem de imunoblot (superior) e gráfico tempo-efeito (inferior) da cinética de fosforilação de ERK 1 e 2 em células tratadas com TMG (1 μ M, 16-18 h) (quadros azuis) ou veículo (círculos pretos), mantidas por 30 minutos na presença de YM-254890 e posteriormente estimuladas por 100 nM de angiotensina II. () $p < 0,05$; teste t de Student. $n = 4$ experimentos independentes. 58*

Figura 7. Gráfico de barras expressando a razão entre o sinal de quimiluminescência que quantifica o anticorpo anti-FLAG e a fluorescência característica de material nuclear de células pela incorporação

de 4-6-diamidino-2-fenilindil (DAPI) em unidades arbitrárias ($p = 0,07$; teste de Wilcoxon). $n = 3$ experimentos independentes. 59

Figura 8. Gráfico temporal do sinal de bioluminescência de internalização do AT1R pelos dois ligantes: Ang II (círculos) ou TRV027 (quadros) na condição controle ou após tratamento com TMG (círculos azuis para angiotensina II e quadros verdes para TRV027). Os agonistas foram introduzidos no tempo 0 s. A redução dos valores representa o afastamento do AT1R-Rluc II do sensor de membrana k-RAS-rGFP $N = 3$ experimentos independentes, $p > 0,05$ 60

Figura 9. Recrutamento de beta-arrestina pelo AT1R ativado em células HEK293T que foram tratadas com thiamet G (TMG) ou veículo e estimuladas por 15 minutos com diferentes concentrações de angiotensina II (Ang II) ou do agonista tendencioso para recrutamento de beta-arrestina, TRV027 (TRV). Razões de BRET para beta-arrestina 1 (superior) ou para beta-arrestina 2 (inferior). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. O aumento da razão de BRET significa afastamento dos biossensores (de membrana e de beta-arrestina): $n = 3$ experimentos independentes. 61

Figura 10. Ativação de proteína quinase C (PKC) decorrente da ativação do AT1R em células HEK293T que foram tratadas com thiamet G (TMG) ou veículo e estimuladas por 15 min com diferentes concentrações de angiotensina II (Ang II) ou do agonista para recrutamento de beta-arrestina, TRV027 (TRV). Razões de BRET cinético (superior) ou dependente de concentração (inferior). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. O aumento da razão de BRET (Δ BRET2) significa a ativação da proteína recombinante GFP-PKC-c1b-Rluc pelo DAG formado após a ativação do AT1R: $n = 3$ experimentos independentes. 62

Figura 11. Caracterização do modelo animal de aumento de proteínas O-gluconaciladas. (A) quantificação da massa corporal e (B) da glicemia de cauda imediatamente anterior a eutanásia. (C) Imagem do leito mesentérico exposto em uma placa de Petri para dissecação no microscópio estereotáxico, (D e E) conteúdo de proteínas modificadas por O-GlcNAc nestas artérias, medidas por imunoblot (*) $p < 0,05$; teste t de Student, $n = 4-17$ animais. 63

Figura 12. Capacidade contrátil de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de animais heterozigotos (db/+) e homozigotos (db/db), submetidas a despolarização produzida por concentrações cumulativas de cloreto de potássio (KCl). (A) gráfico concentração-resposta, (B) registros representativos e (C) razão entre a tensão produzida por cada anel de artéria mesentérica no platô (KCl 90 mM) e o comprimento longitudinal da artéria montada na preparação (miliNewtons/milímetro). Teste t de Student, $p > 0,05$; $n = 8$ experimentos independentes. 64

Figura 13. Registros representativos de curvas cumulativas concentração-resposta para angiotensina II em (A) artérias mesentéricas isoladas de animais db/+ (superior) ou db/db (inferior) e (B) gráfico expressando a eficácia da angiotensina II de acordo com os registros. (*) $p < 0,05$; teste t de Student; $n = 8-9$ experimentos independentes. 65

Figura 14. Contratilidade para angiotensina II após tratamento in situ das preparações com veículo ou TRV027 (1 μ M, 15 min) para recrutar a beta-arrestina 1/2 seguida de uma lavagem da preparação (washout - wo). (A) Gráfico das curvas cumulativas concentração-resposta em artérias isoladas de animais db/+ ou (B) de animais db/db; $n = 7$ animais. 66

Figura 15. Dessensibilização de resposta contrátil para angiotensina II. Registro representativo do protocolo (superior) demonstrando o estímulo (Ang II), a resposta máxima (R_{max}) e o ponto representativo do decaimento médio da resposta contrátil ($T_{1/2}$). A viabilidade da preparação dessensibilizada foi testada acrescentando a mesma concentração de fenilefrina (100 nM).

Representação gráfica (inferior) do valor de $T_{1/2}$ para artérias dos animais db/+ e db/db. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média do tempo de decaimento da resposta máxima ($T_{1/2}$ Rmax) em segundos (s). (*) $p < 0,05$; teste t de Student; $n = 6$ experimentos independentes..... 68

Figura 16. Resposta taquifilática para angiotensina II (Ang II) em artérias mesentéricas de animais db/+ e db/db. Registro representativo (superior) do protocolo com 5 estímulos sequenciais de Ang II e um para fenilefrina, para testar a viabilidade da preparação e representação gráfica (inferior) da fração de resposta máxima (Rmax) em relação ao primeiro estímulo (1,0). (w) = lavagem da preparação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média; $n = 3-4$ experimentos independentes. 69

Figura 17. Gráfico de reatividade vascular para angiotensina II em animais db/+ e db/db. Participação da fosforilação de ERK 1/2 usando 10 μ M do inibidor PD98059. As comparações foram feitas entre db/db veículo e db/db tratado in situ pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($p > 0,05$), $n = 4$ experimentos independentes. 71

Figura 18. Participação da proteína quinase do tipo C (PKC) na eficácia da angiotensina II (Ang II) em artéria mesentérica de camundongos db/+ e db/db. Preparações tratadas in situ com 1 μ M de RO-31 8220. As comparações foram feitas pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 4$ experimentos independentes. 72

Figura 19. Curvas cumulativas concentração-resposta para angiotensina II (Ang II) na presença de BAPTA-AM (10 μ M) ou veículo em artérias mesentéricas de camundongos db/+ e db/db. Registro representativo (superior) da contração de artérias de animais db/+ (esquerda) e db/db (direita), na presença deste quelante de cálcio citoplasmático e gráfico (inferior) expressando a média \pm erro padrão da média das contrações produzidas por Ang II em preparações tratadas com veículo ou BAPTA. ($P < 0,05$; $N = 4$). 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos anticorpos usados neste trabalho, descrevendo a referência comercial, o tipo de anticorpo e a concentração utilizada. 42

Tabela 2. Parâmetros farmacológicos de eficácia (R_{max}) e potência (pEC_{50}) extraídos das curvas concentração-resposta para angiotensina II após uma lavagem da preparação, seja na condição controle (wo = washout) ou após tratamento in situ com TRV027 por 15 minutos seguido de uma lavagem (TRV027 + wo) em segmentos de artérias mesentéricas de animais db/+ e db/db. Os valores expressos correspondem à média \pm erro padrão da média de resposta máxima em miliNewtons por milímetro de artéria (R_{max} mN/mm) ou da pEC_{50} e analisadas pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey () $p < 0,05$; $n = 7$ experimentos independentes. 66*

Tabela 3. Descrição dos valores de eficácia (R_{max}) e potência (pEC_{50}) da angiotensina II (Ang II) em artérias mesentéricas de camundongos db/+ e db/db previamente tratadas com veículo (vei; DMSO 0,001%) ou com 10 μ M do inibidor de fosforilação de ERK 1/2, PD98057. () $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, $n = 4$ experimentos independentes. 71*

Tabela 4. Descrição dos valores de eficácia (R_{max}) e potência (pEC_{50}) da angiotensina II (Ang II) em artérias mesentéricas de camundongos db/+ e db/db previamente tratadas com veículo (vei; DMSO 0,001%) ou com 1 μ M do inibidor da proteína quinase do tipo C (PKC), RO-31 8220. () $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, $n = 4$ experimentos independentes. 72*

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura suplementar 1. Densidade mitocondrial de células HEK293T tratadas ou não com thiamet G: razão entre as fluorescências características de membranas mitocondriais (Mitotracker Red) e de material nuclear (Hoercht) quantificadas na leitora de placas com células frescas cultivadas em placas de 96 poços. P = 0,054; Mann-Whitney; n = 6. Este protocolo foi previamente validado usando os interferentes mitocondriais como o ionóforo de prótons FCCP e vermelho de rutênio. 88

Figura suplementar 2. Quantificação de espécies oxidantes em células HEK293T tratadas ou não com thiamet G: fluorescência da sonda DCFDA..... 89

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II – Angiotensina II

AT1R – Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2R – Receptor de angiotensina II do tipo 2

BAPTA-AM - Éster do ácido bis-aminofenoxietano-tetracético

BRET – Experimento de bioluminescência por transferência de energia

Ca⁺⁺ - íons cálcio

[Ca⁺⁺]_i – Concentração intracelular de íons cálcio

CTL - Controle

DAG – Diacilglicerol, um mensageiro secundário derivado de lipídios de membrana

DMEM – Meio de cultura de células de Eagle modificado por Dulbecco

EC50 – Concentração de fármaco necessária para estabelecer metade do efeito máximo

ELISA – Ensaio de absorção imunoenzimática

ELK-1 – Fator de transcrição relacionado ao oncogene ELK-1

ERK 1/2 - Quinase relacionada a sinal extracelular dos tipos 1 e 2

GFP – Proteína fluorescente verde

GPCR – Receptor acoplado a proteína G ou receptor de sete domínios de membrana

IP3 – 1,4,5-trisfosfato de inositol

IP3R – Receptor de IP3

MAP quinase – Quinase ativada por mitógeno

MEK 1/2 – Quinase de MAP quinases dos tipos 1 e 2

pEC50 – Potência do fármaco ou logaritmo negativo do valor da EC50

PIP2 – 1,4-bisfosfatidil de inositol

PLC – Fosfolipase do tipo C

PKC – Proteína quinase do tipo C

Rluc II – *Renilla luciferase* do tipo II

Rmax – Eficácia, efeito ou resposta máxima do fármaco

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

t_{1/2} – Meia-vida ou tempo para decair em 50% a resposta máxima

TMG – Thiamet g

RESUMO

Estudo das relações funcionais entre proteínas O-gluconaciladas e a sinalização do receptor de angiotensina II do tipo 1. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Tese (Doutorado), 2022.

Os receptores de sete domínios de membrana (GPCR) são proteínas que, ao serem ativadas por hormônios, neurotransmissores ou fármacos, disparam vias de sinalização intracelular pela ativação de proteínas G, de quinases e da beta-arrestina. O receptor de angiotensina II do tipo I (AT1R) é um GPCR que representa importante alvo terapêutico para o controle da hipertensão arterial e outras condições de risco cardiovascular. Quando ativado pela angiotensina II (Ang II), produz aumento no tônus arterial, liberação de neurotransmissores e reabsorção renal de sódio para a regulação do meio interno. A O-gluconacilação (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional que ocorre em proteínas intracelulares, e que está aumentada em distúrbios metabólicos como o diabetes e a hipertensão. Esta modificação ocorre pela anexação enzimática de uma molécula de N-acetil glucosamina endógena a proteínas intracelulares, gerando mudanças na funcionalidade de proteínas responsáveis por regular a fisiologia de vasos sanguíneos e outros órgãos. Considerando estes dois problemas fisiológicos, o objetivo deste trabalho foi investigar, a partir do perfil de sinalização do AT1R em sistemas biológicos com aumento global de proteínas O-gluconaciladas, a hipótese que o aumento de O-GlcNAc altera a sinalização do AT1R, reduzindo o recrutamento de beta-arrestina, e sustentando por mais tempo os efeitos pró-contráteis e deletérios da Ang II. A hipótese foi avaliada por duas frentes de investigação: inicialmente foram cultivadas células HEK293T expressando estavelmente o AT1R humano. As células foram submetidas a aumento global de proteínas O-gluconaciladas usando o inibidor enzimático *thiamet G* (TMG 1 μM por 16 horas). Em seguida, o AT1R foi ativado por Ang II, agonista endógeno, ou pelo TRV027, agonista tendencioso para a via da beta-arrestina. Foram quantificadas a potência (pEC_{50}) e a eficácia (R_{max}) destes agonistas para a fosforilação de quinases, mobilização de cálcio, recrutamento de beta-arrestina e internalização do receptor. Também foi aferida a densidade de AT1R na membrana. Posteriormente foram feitos experimentos usando artérias mesentéricas isoladas de camundongos espontaneamente diabéticos [C57BLKS/6JLepR^{-/+}]; um modelo nativo de expressão de AT1R e de aumento de proteínas O-gluconaciladas, para se relacionar os achados em células com a disfunção vascular associada ao diabetes. Nestas artérias, o AT1R também foi ativado por Ang II e TRV027 e se mediu, além da pEC_{50} e R_{max} de contração, a taxa de taquifilaxia, o recrutamento de beta-arrestina e o tempo de dessensibilização. Nestas artérias isoladas, foram empregados inibidores das quinases PKC (proteína quinase C, RO 31-8220, 1 μM) e MEK [que induz fosforilação e ativação de ERK 1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), PD98059, 10 μM], e o quelante de cálcio citoplasmático BAPTA-AM (10 μM). Nas células HEK293T tratadas com TMG houve aumento persistente de proteínas modificadas por O-GlcNAc e, ao se ativar o AT1R, houve aumento na fosforilação de ERK1/2 e dos transientes de cálcio pelo aumento de O-Gluconacilação. Não houve diferença na densidade ou na taxa de internalização do AT1R, nem no recrutamento de beta-arrestina ou ativação de PKC por ação do TMG. Nos experimentos funcionais em artérias isoladas, a resposta contrátil para Ang II foi maior nos animais db/db, comparando-se às artérias dos camundongos heterozigotos db/+. O estímulo para recrutar beta-arrestina (TRV027) reduziu de maneira igual a eficácia da Ang II em artérias dos dois fenótipos de

camundongos. A perda de resposta por taquifilaxia foi igual para artérias dos dois animais. A taxa de dessensibilização do AT1R foi maior nas artérias de db/db se comparadas àquela em artérias de db/+. Um outro conjunto de experimentos usando inibidores de quinases foi conduzido para se aferir a participação da ERK 1/2 e da PKC no aumento de contratilidade. Por último, se investigou a contribuição do cálcio intracelular no aumento de eficácia da Ang II nas artérias mesentéricas usando BAPTA. A contratilidade vascular em animais db/db desta vez foi menor que nas preparações não tratadas. Tendo em mãos estes dados, conclui-se que o aumento da eficácia da Ang II diante de elevado conteúdo de O-GlcNAc intracelular ocorre em razão de uma maior biodisponibilidade de íons cálcio como mensageiro secundário e não por uma atuação reduzida da beta-arrestina sobre o receptor.

Palavras-Chave: 1. GPCR. 2. Receptor AT1. 3. O-GlcNAc. 4. HEK293T. 5. db/db.

ABSTRACT

Study of a functional relationship between O-GlcNAcylated proteins and type-1-Angiotensin II Receptor signaling. University of São Paulo. Ribeirão Preto Faculty of Medicine. Thesis (PhD), 2022.

The seven transmembrane-domain receptors are a superfamily of proteins activated by hormones, neurotransmitters and drugs, triggering intracellular pathways through G proteins, kinases and beta-arrestin activation. The type-I angiotensin II receptor (AT1R) is a target for hypertension therapy and other cardiovascular diseases. AT1R blockade attenuates angiotensin II (Ang II) effects on arterial tone, neurotransmitter release and renal sodium reabsorption. O-GlcNAcylation (O-glcNAc) is a post-translational modification in intracellular proteins, and it is augmented in metabolic disorders such as diabetes and hypertension. O-GlcNAc occurs through enzymatic attachment of an endogenous N-acetyl glucosamine moiety in lateral chains of intracellular proteins, generating changes in vascular function and in the function of other organs. Considering these two physiological problems, the aim of this work was to investigate whether high levels of O-GlcNAcylated proteins alters the signaling triggered by AT1R. We tested the hypothesis that increased O-GlcNAc changes-AT1R signaling, reducing the recruitment of beta-arrestin, sustaining pro-contractile stimuli, and hence increasing deleterious vascular effects of Ang II. Experimental procedures were designed into two ways: initially HEK293T cells stably expressing AT1R were cultured and submitted to a global increase of O-GlcNAcylated proteins using the enzymatic inhibitor Thiamet G (TMG 1 μ M for 16 hours). Then, the AT1R was activated by the endogenous agonist Ang II, or TRV027, a biased agonist for the beta-arrestin pathway. Potency (pEC_{50}) and efficacy values (R_{max}) were determined for kinase phosphorylation, calcium mobilization, beta-arrestin recruitment and receptor internalization. The density of AT1R on the cell membrane was also measured. Subsequently, experiments were performed using mesenteric arteries isolated from spontaneously diabetic mice [C57BLKS/6JLepR^{-/+}], a native model of AT1R expression and increased O-GlcNAc-modified proteins, as a tentative to correlate cell findings with diabetes-associated vascular dysfunction. In an isolated organ bath chamber, mesenteric arteries were stimulated with Ang II or TRV027, in cumulative contractile-response curves to evaluate pEC_{50} , R_{max} . Tachyphylaxis, beta-arrestin recruitment and desensitization. In another set of experiments Kinase inhibitors RO 31-8220 (1 μ M; PKC – protein kinase C inhibitor) or PD98059 [(10 μ M; MEK inhibitor (phosphorylation of ERK 1/2 extracellular-regulated kinase)] - and the cytoplasmic calcium chelator BAPTA-AM (10 μ M) were administered *in situ*. HEK293T cells treated with TMG showed a persistent increase in proteins modified by O-GlcNAc. Activation of the AT1R in cells with high O-GlcNAc protein levels induced a greater increase in ERK1/2 phosphorylation and in calcium transients in comparison to control cells. The rate of AT1R internalization, beta-arrestin recruitment or PKC activation remained unmodified after TMG treatment. In the functional experiments, the contractile response to Ang II was increased in db/db arteries compared to arteries from control db/+ heterozygous mice. The biased stimulus for beta-arrestin activation (TRV027) similarly reduced the efficacy of Ang II contraction in both phenotypes equally. Tachyphylaxis-related responses were similar in arteries for both animals. The AT1R desensitization rate was higher in db/db arteries compared to db/+ arteries. Another set of experiments using kinase inhibitors was conducted to assess the role of ERK 1/2, PKC and calcium stored in vascular contractility and finally, the

contribution of intracellular calcium to the increased efficacy of Ang II in these arteries was investigated using BAPTA, a cell-permeant calcium chelator. and it was observed that contractility of the db/db mesenteric arteries was decreased by BAPTA, but not by the PKC and MEK inhibitors. We concluded that the increased response to Ang II in cells with high intracellular O-GlcNAc content is a result of greater bioavailability of calcium ions as a secondary messenger and not due to reduced action of beta-arrestin under AT1R activation.

Palavras-Chave: 1. GPCR. 2. Receptor AT1. 3. O-GlcNAc. 4. HEK293T. 5. db/db.

SUMÁRIO

1 introdução	20
1.1 A angiotensina II é um mediador fisiológico que participa do controle circulatório	20
1.2 A Ang II promove sinalização intracelular por meio de receptores de sete domínios de membrana	23
1.3 O AT1R é um alvo terapêutico para o controle do risco cardiovascular	29
1.4 A O-gluconacilação de proteínas intracelulares se relaciona com alterações nos mecanismos de transdução de sinal	30
1.5 Na fiso-farmacologia da contração do músculo liso o aumento de proteínas O-gluconaciladas altera a contratilidade de artérias	33
2 OBJETIVO	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Experimentos em cultura de células HEK293T	37
3.1.1 Padronização e caracterização do sistema experimental	37
3.1.2 Estudo funcional da cinética de ativação do AT1R em células HEK 293T após aumento global de proteínas O-gluconaciladas.....	38
3.1.3 Preparação dos extratos proteicos, separação de proteínas em gel vertical e marcação com anticorpos	39
3.1.4 Investigação da mobilização intracelular de cálcio para angiotensina II em tempo real em células HEK293T com aumento global de proteínas O-gluconaciladas	42
3.1.5 Quantificação de densidade de AT1R-FLAG	44
3.1.6 Experimentos funcionais de recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 e de ativação pelo AT1R em células HEK293T usando sensores de bioluminescência de transferência de energia por ressonância - BRET	45
3.1.7 Experimentos funcionais de ativação da proteína quinase C usando sensor de BRET	46
3.2 Experimentos funcionais de contratilidade para Ang II em artérias mesentéricas de camundongos espontaneamente diabéticos	47
3.2.1 Animais	47

3.2.2 Drogas e soluções	48
3.2.3 Medidas de contratilidade e análises bioquímicas em anéis isolados de artéria mesentérica	48
3.2.4 Protocolo de recrutamento de beta-arrestina in situ	50
3.2.5 Protocolo de taquifilaxia	50
3.2.6 Protocolo de dessensibilização.....	51
3.2.7 Medidas de contratilidade em anéis isolados de artéria mesentérica na presença de inibidores de quinases	51
3.2.8 Efeito do quelante de cálcio intracelular, BAPTA-AM para reduzir o conteúdo citoplasmático de íons cálcio disponível para produzir a contração	51
5 resultados	53
5.1 Padronização do sistema: o inibidor da OGA promoveu aumento de O-gluconacilação em proteínas intracelulares de célula HEK293T.....	53
5.2 A magnitude da fosforilação de ERK por diferentes agonistas do AT1R é maior em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas.....	55
5.3 A mobilização de cálcio intracelular é maior em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas	56
5.4 A fosforilação de ERK 1 e2 se mantém aumentada em células tratadas com um inibidor da ativação da proteína G.....	57
5.5 A densidade de AT1R em células HEK293T permaneceu constante com o aumento de proteínas O-gluconaciladas	58
5.5 A cinética de internalização do AT1R se manteve igual em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas	59
5.6 O recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 pelo AT1R não foi modificado pelo aumento de O-GlcNAc.....	60
5.8 A ativação da proteína quinase C (PKC) pelo AT1R não foi modificada pelo aumento de O-GlcNAc.....	61
5.7 Caracterização do modelo de aumento espontâneo de proteínas O-gluconaciladas ...	62
5.8 O recrutamento de beta-arrestina pelo TRV027 reduziu a resposta para angiotensina II em magnitude igual nos animais db/+ e db/db	65

5.9 A dessensibilização da resposta contrátil para Ang II é maior em artérias de animais db/db, mas a resposta taquifilática é semelhante	67
5.10 Experimentos funcionais usando inibidores de quinases que participam da contratilidade induzida por Ang II	70
5.11 O quelante de cálcio intracelular reduziu a contratilidade de artérias de animais db/db	72
6 DISCUSSÃO.....	74
6.1 A fosforilação promovida pelo AT1R é potencializada pelo aumento global de O-gluconacilação de proteínas intracelulares.....	74
6.2 O aumento da eficácia da Ang II para gerar sinalização de cálcio demonstra que várias funções celulares podem ser indiretamente alteradas pelo aumento de O-gluconacilação	77
6.3 A densidade de receptores, a cinética de internalização e o recrutamento de beta-arrestina foram os marcadores para se investigar a presença do AT1R na membrana da célula.....	80
6.4 A inibição da proteína Gαq manteve o aumento da eficácia da Ang II sobre o AT1R ...	81
6.5 Animais espontaneamente diabéticos apresentam aumento de O-GlcNAc e da eficácia da angiotensina II	82
7 CONCLUSÃO.....	87
8 REFERÊNCIAS	90
7 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 A angiotensina II é um mediador fisiológico que participa do controle circulatório

Durante o século XIX diversos laboratórios buscaram entender a fisiologia integrada de sistemas biológicos por meio da injeção de extratos de órgãos na circulação sanguínea de outros animais saudáveis, principalmente fluidos extraídos de rim. Estes experimentos permitiram identificar substâncias com capacidade de regular o funcionamento de outros órgãos (MARKS; MAXWELL, 1979). Foi nesta perspectiva que Robert Tigerstedt e seu estudante, Bergman, no *Instituto Karolinska* (Suécia), trituraram o rim de um coelho com solução fisiológica e, após filtração, injetaram o extrato na veia de outros coelhos. Foi observado então um aumento duradouro, porém reversível, de pressão arterial (TIGERSTEDT; BERGMAN, 1898). Este feito trouxe pelo menos duas evidências: (1) a de que os rins podem estar envolvidos na fisiopatologia de doenças cardiovasculares e (2) este envolvimento pode ser, em parte, pela ação de uma substância outrora denominada renina.

De fato, a renina foi posteriormente caracterizada como sendo um peptídeo de natureza proteolítica e sem efeito constritor *per se*, mas indiretamente responsável pela contração do músculo liso (PICARELLI et al., 1954). O que se sabe é que a renina é produzida e liberada na corrente sanguínea principalmente pelo aparelho justaglomerular renal e atua como enzima proteolítica (CATANZARO; MULLINS; MORRIS, 1983; PINET et al., 1987). Os principais estímulos para a liberação de renina são a ativação do sistema nervoso simpático sobre o aparelho justaglomerular e também a redução da concentração de sódio circulante no sangue. A renina atua clivando o angiotensinogênio, sendo este o passo inicial para a cascata de formação da Ang II.

Então, ao se observar atualmente os antigos registros e as descrições feitas por Tigerstedt & Bergman, é possível perceber que pelo perfil hidrossolúvel, taquifilático e de início imediato da ação pressórica encontrado nos experimentos por eles realizados, que a angiotensina II (Ang II) era a substância responsável pelo aumento de pressão arterial nos coelhos que receberam injeção de extrato de rim.

Este conhecimento permaneceu dormente, mas ganhou um salto quase 100 anos depois quando outros laboratórios, principalmente o laboratório do Dr. Harry Goldblatt (Ohio, EUA), se interessaram em compreender a hipertensão promovida por lesão renal. Neste caso, a técnica experimental empregada por Goldblatt e colaboradores (e outros grupos de pesquisa) consistia em promover aumento crônico e persistente da pressão arterial pelo bloqueio do fluxo sanguíneo em uma artéria renal de cães (Goldblatt et al, 1933). Porém, considerava-se que o órgão lesionado era o responsável por gerar a hipertensão. Estes modelos experimentais ainda são bem estudados em roedores, denominando-se animais “dois rins um clipe” ou “um rim um clipe”, quando apropriado (MOLIN; SGUILLA; BENDHACK, 2005; OLIVEIRA-SALES et al., 2016).

O modelo experimental de Goldblatt juntamente com os protocolos apresentados por Tigerstedt e Bergman serviram para uma intensa investigação por vários grupos de pesquisa. Destaca-se que dois grupos independentes: o de Irvine Page (Indianópolis, EUA) e o de Bernardo Houssay com Eduardo Braun-Menendez (Buenos Aires, Argentina), que ao investigarem as propriedades dos constituintes destes fluidos renais, descreveram que o rim contralateral ao rim isquêmico dos cães produzia uma determinada substância hidrossolúvel, resistente ao aquecimento e que era capaz de aumentar a pressão arterial quando injetada nas veias, mas não nas artérias de outros cães. Isto significa que a referida substância, que hoje reconhecemos como sendo o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), precisava ser convertida em uma forma ativa, que hoje reconhecemos como o octapeptídeo AngII (BRAUN-MENENDEZ; PAGE, 1958; BRAUN-MENENDEZ; PALADINI, 1958). Esta conversão ocorre na vasculatura pulmonar, e por isso a Ang I não tem efeito pressórico quando administrada via intra-arterial.

A regulação da pressão arterial que era descrita como uma propriedade do sistema nervoso autonômico, especialmente nos ajustes temporais de curto-prazo, a partir de então ganhou um novo sistema de regulação de longo prazo: o sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Descrevendo-o em linhas gerais, o polipeptídeo pro-renina, presente no interior das células justaglomerulares (também produzida em glândulas salivares e pâncreas) é clivado e liberada no plasma em forma de renina (ou angiotensinogenase; 37 KDa) e, em um passo seguinte, cliva enzimaticamente o angiotensinogênio (uma globulina do tipo alfa-2) produzido

no fígado, transformando-o em decapeptídeos denominados Ang I (CORNISH; JOYNER; GILMORE, 1979; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; NISHIMURA et al., 2000; CORVOL et al., 2008). A Ang I tem pouca função vasoativa, mas, ao perder dois resíduos de aminoácidos na porção carboxiterminal (HIS-LEU), se converte em Ang II, que é um octapeptídeo (ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-FEN-OH) com propriedades biológicas bem mais pronunciadas, especialmente o aumento de tônus de vasos sanguíneos (PICARELLI et al., 1954; HICKLER; LAULER; THORN, 1963; MOORE; KHAIRALLAH, 1976).

Pelo menos duas vias bioquímicas fazem a conversão da Ang I em Ang II: primeiramente a enzima conversora de angiotensina do tipo I (ECA-1), que está ancorada na membrana de células endoteliais nos vasos capilares da circulação renal e pulmonar é de alta taxa catalítica *in vivo* (OPARIL; SANDERS; HABER, 1970; DI SALVO et al., 1971), e também uma fração circulante desta mesma enzima. A outra via é mediada por enzimas do tipo peptidases como as carboxipeptidases, elastase, proteases e quimases, que estão presentes em vários órgãos e compõem o denominado *sistema local* ou *via alternativa de formação de Ang II* (DZAU, 1987; MONTEIRO DE RESENDE; MILL, 2002).

Este sistema de substratos, enzimas e reações enzimáticas endógenas é classificado como sistema renina-angiotensina-aldosterona - SRAA (FORRESTER et al., 2018). De maneira complementar, diversos laboratórios (CORNISH; JOYNER; GILMORE, 1979; DZAU, 1987; OKUNISHI et al., 1987; SCHUIJT et al., 2002) e também o nosso (BECARI et al., 2017) se dedicaram a estudar formação de Ang II de forma tecido-específica, isto é, sem a necessidade de conversão pela ECA-1 do território vascular pulmonar.

O SRAA traz grande complexidade na manutenção da vida terrestre (WILSON, 1984). Por exemplo, deleções genéticas experimentais de elementos constitutivos deste sistema ou inibições farmacológicas em neonatos geram tanto incompatibilidades com a vida quanto prejuízos na formação de órgãos como rim e pulmão, além de instabilidades na pressão arterial e no controle de volume (CORVOL et al., 2008; MARIN et al., 2011).

Outro fenômeno interessante para a compreensão da fisiopatologia da hipertensão dependente do SRAA é que quando uma dose baixa de Ang II é administrada na artéria renal de cães (0,5-1 ng/Kg/dia) não ocorre aumento agudo de pressão arterial mas, em longo prazo (depois de 5 dias de infusão contínua) a baixa dose produz aumento persistente da pressão

arterial (DECLUE et al., 1978; LOHMEIER; COWLEY, 1979). É por este fenômeno que foi possível postular que a Ang II é um agente pro-hipertensivo e que a redução deste efeito pode trazer benefícios no controle da hipertensão arterial sistêmica e problemas associados a ela em humanos.

1.2 A Ang II promove sinalização intracelular por meio de receptores de sete domínios de membrana

Os receptores de sete domínios de membrana (GPCR) compõem uma superfamília de proteínas amplamente conservadas e distribuídas em inúmeras espécies de seres vivos (STROTMANN et al., 2011). Os GPCR podem ser ativados por neurotransmissores, hormônios, fármacos (KENAKIN, 2002; AUDET; BOUVIER, 2012), fótons, odores ou forças físicas como a tensão de cisalhamento (*shear stress*) e de estiramento (*stretch*) do sangue em artérias (BARAUNA et al., 2013).

Os GPCRs são evolutivamente importantes para os organismos multicelulares porque permitem a comunicação entre diferentes sistemas biológicos (STROTMANN et al., 2011). Ao serem ativados pela ligação de mensageiros primários extracelulares, que são os mediadores como a noradrenalina, a Ang II, a serotonina, dentre outros, os GPCR disparam um processo instantâneo de amplificação e propagação de sinais fisiológicos no interior da célula.

Na sequência de eventos disparados com a ativação do AT1R os principais efetores ativados são a fosfolipase C (PLC), a proteína quinase C (PKC) e as quinases de mamíferos ativadas por mitógeno (MAP quinases). Estas MAP quinases exercem ações por meio de interações proteína-proteína bastante específicas, como a quinase ativada por MAP quinases (MEK/MKK) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (ALESSI et al., 1994; DÉRIJARD et al., 1995; ZHENG et al., 2012; DA SILVA JUNIOR et al., 2017; NAMKUNG et al., 2018a; LUKASHEVA et al., 2020).

Ao mesmo tempo, a PLC ativada pelo AT1R conduz a formação de mensageiros secundários como o diacilglicerol (DAG), o trifosfato de inositol (IP3) e os íons cálcio (BERRIDGE; IRVINE, 1984; GRIENDLING et al., 1986; ABOULAFIA et al., 1989; HUNYADY; CATT, 2006; BERS, 2008), que amplificarão no interior da célula o sinal gerado pela Ang II. Outros

mensageiros secundários podem ser, porventura, formados, porém o IP₃, o DAG e o cálcio são os responsáveis pela resposta aguda vasoconstrictora da Ang II em vasos sanguíneos.

Ao passo que estes efetores aumentam o conteúdo de mensageiros secundários citosólicos, múltiplos processos enzimáticos são disparados após a fusão do agonista com o receptor, principalmente a fosforilação de proteínas pela (trans)ativação de quinases (AHN et al., 2004b) e a ativação de transcrição de genes em um momento posterior (COSTA-NETO; PARREIRAS-E-SILVA; BOUVIER, 2016). Então, resumidamente, o produto final da ativação dos GPCRs como o AT₁R são alterações em determinadas funções celulares, capazes de modificar transitoriamente a permeabilidade da membrana celular para influxo/efluxo de íons (ABOULAFIA et al., 1989), variações no pH intracelular (TOUYZ; SCHIFFRIN, 1997; HUGHES, 1998), mobilização de cálcio no interior da célula (FREESTONE et al., 2000; AMOBI; GUILLEBAUD; SMITH, 2010; GIRI et al., 2014), exocitose de hormônios (HUNYADY; CATT, 2006), apoptose celular (KIM et al., 2012), dentre outras vias responsáveis pela regulação fisiológica e também sobre os fatores de risco cardiovascular que se estabelecem cronicamente.

De um modo geral, a Ang II atua no corpo por meio da ativação de pelo menos 2 GPCRs, os receptores AT₁ e AT₂. O receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT₁R) é o de maior interesse na fisiopatologia dos fatores de risco cardiovascular (WINGLER et al., 2019). Já o receptor de angiotensina II do tipo 2 (AT₂R) tem maior homologia entre humanos e roedores e é antagonizado pelo PD123319 (DIMITROPOULOU et al., 2001). O AT₂R parece estar muito relacionado ao desenvolvimento fetal (HINES; FLUHARTY; YEE, 2003) e a situações de estresse (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). Porém, ainda não possui um padrão de transdução de sinal bem caracterizado.

O AT₁R é um GPCR da classe A, isto é, pertencente à família dos análogos ao receptor de rodopsina (OLIVEIRA et al., 2007). É formado por 359 resíduos de aminoácidos (*Smith & Timmermans, 1994*) e é presente em vários órgãos em diferentes classes de seres vivos, desde teleósteos até répteis, aves e mamíferos. É amplamente distribuído nos órgãos do sistema cardiovascular, como os vasos sanguíneos (HELMER, 1957; KHAIRALLAH et al., 1966a), coração; além das glândulas suprarrenais (AGUILERA; CATT, 1983) e estruturas inferiores do cérebro (MENDELSON et al., 1983; ARMANDO et al., 2002).

Em seres humanos o AT1R é codificado por um único gene localizado no cromossomo 3 (CURNOW; PASCOE; WHITE, 1992), mas em roedores duas isoformas foram identificadas, sendo codificadas por diferentes cromossomos para formar os receptores AT1a e AT1b (SASAMURA et al., 1992; PAVEL et al., 2008) mas em ambos os casos (humanos ou roedores) o resultado agudo da ativação do AT1R é a mobilização de cálcio para produzir contração de artérias (SASAMURA et al., 1992).

Resumidamente, a sinalização canônica do AT1R se inicia quando a proteína que forma este receptor, ao ser ligada ao seu mensageiro primário (a Ang II, por exemplo) sofre uma perturbação termodinâmica até se estabilizar temporariamente em uma conformação cuja segunda alça intracelular ganha alta afinidade pelas proteínas G (GÁBORIK et al., 2003). Isto significa que o isômero agonista-AT1R ativa as proteínas G que possuem a subunidade alfa do tipo q ou do tipo 11 (Gαq/11). Como consequência, a perturbação da isoforma Gαq/11 faz perder a molécula de GDP constitutivamente ligada a esta proteína G. Então, a subunidade α se desmembrará da subunidade βγ (beta-gama) e agora, carregando uma molécula de GTP capturada no microambiente citosólico, ativará efetores como a PLC para formação dos mensageiros IP3 e DAG, sendo ambos produtos da hidrólise do 4-5 bisfosfato de inositol (PIP2), sendo os fosfolípidios de membrana a matéria prima para a formação destas moléculas (ROSS; GILMAN, 1977; BERRIDGE; IRVINE, 1984; KENAKIN, 2009; FOREMAN, J.C.; JOHANSEN, T.; GIBB, 2011; GIBB, 2011).

Paralelamente à formação destes mensageiros secundários, para a resposta celular produzida pela Ang II ocorrem ativações de diversas superfamílias de quinases como o complexo Ras/Raf, MEK/ERK, JNK, P38 e outras que reforçam a sinalização de curto e longo prazo provocada pela Ang II (CHANG et al., 2003; GÁBORIK et al., 2003; HUNYADY; CATT, 2006; BALBI et al., 2009; CARRILLO-SEPULVEDA et al., 2014; COSTA-NETO; PARREIRAS-E-SILVA; BOUVIER, 2016; NAMKUNG et al., 2018b). Neste sentido, o acúmulo destes mensageiros secundários é uma ferramenta experimental bem utilizada para inferir a magnitude de sinalização do AT1R (USUI et al., 2000; MELONI et al., 2006; WIMMER; BACCARINI, 2010).

A transdução de sinal do AT1R está relacionada à pressão arterial porque, quando ativado, ele participa da regulação do meio interno ao controlar, dentre outras propriedades corporais, a excreção de sódio e a ingestão de água (COVIAN; GENTIL; ANTUNES-RODRIGUES, 1972), o tônus autonômico (FUJIE et al., 1976; DEUCHARS; LALL, 2015) e a contração de vasos

sanguíneos (KHAIRALLAH et al., 1966a; WINGLER et al., 2019), resultando no aumento da resistência periférica que é um dos principais determinantes para o aumento da pressão arterial. De forma complementar, a Ang II facilita a excitação de neurotransmissores adrenérgicos (BROWN; FELDBERG, 1936; ROHSE; KAYE; RANDALL, 1957; XUE et al., 2011) e a liberação de aldosterona (HUNYADY; CATT, 2006), além de modular a taxa de filtração glomerular (AXELSSON et al., 2012) e a proliferação celular dos órgãos-alvo das forças mecânicas do sangue (Kim et al., 2012).

Os transientes de cálcio decorrentes da formação do complexo *Ang II-AT1R ativado-proteína Gαq/11* correspondem a um dos fenômenos clássicos disparados por este receptor, sendo este um sinal imediato e capaz de ativar a maquinaria contrátil do músculo liso arterial e as vias de secreção de neurotransmissores simpáticos e aldosterona (SACHINIDIS et al.; 1993, ; TENG et al., 2002; HUNYADY; CATT, 2006). No entanto, deve-se considerar que outras proteínas G de subunidade αi, α12/13 podem ser disparadas pelo AT1R ativado (NAMKUNG et al., 2018b) sem gerar esta resposta vasoconstritora, mas contribuindo com outros fenômenos fisiológicos mais tardios, como a apoptose, proliferação celular e resposta inflamatória (XU et al., 1993; HUNYADY; CATT, 2006; BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014; NAMKUNG et al., 2018b; LUKASHEVA et al., 2020).

De modo semelhante a diversos tipos de GPCR, especialmente os da classe dos análogos ao receptor de rodopsina, a sustentação do AT1R ativado na membrana da célula por um agonista extracelular atrai para si a atividade catalítica de outra superfamília de quinases citoplasmáticas de GPCRs, as GRKs (FREEDMAN; LEFKOWITZ, 1996a; MILCENT et al., 1999; HULLMANN et al., 2016). Estas quinases fosforilam o AT1R (Forrester et al., 2018; Richard et al., 1997; Vanderheyden et al., 1999) e instantaneamente modificam a estrutura proteica do GPCR ao ponto de gerar alteração nas interações proteicas e na transdução de sinal, processo este denominado *dessensibilização homóloga* (LOHSE et al., 1984).

Descrevendo passo-a-passo este processo, o receptor é fosforilado em um motivo proteico intracelular específico na sétima alça da estrutura da proteína e, assim, expõe sua cauda C-terminal, o que perturba a conformação de uma outra proteína citosólica, a beta-arrestina 1 e 2 (ou arrestina 2 e arrestina 3, respectivamente). A beta-arrestina tem alta afinidade pelo receptor fosforilado (EVRON; DAIGLE; CARON, 2012) e, a partir desta etapa, ocorre um impedimento estérico da ativação da proteína G, sendo este um dos principais

mecanismos que justifica a dessensibilização homóloga (BOUVIER & NAN, 1995; LOHSE et al., 1984). O destino dessa dessensibilização é a formação de um endossomo de internalização, constituído por um complexo de clatrina, mais a molécula do receptor, os efetores e o agonista responsável pela ativação (LEFKOWITZ; SHENOY, 2005; BEAUTRAIT et al., 2017; CAO et al., 2020).

Do ponto de vista da farmacologia molecular, pelo menos duas novidades a respeito do AT1R têm sido elucidadas: primeiramente é que a ativação da beta-arrestina pelo AT1R gera uma segunda onda de sinalização, depois daquela promovida pela proteína G α q (FREEDMAN; LEFKOWITZ, 1996b; AUDET; BOUVIER, 2012; THOMSEN et al., 2016) e este recrutamento seletivo de beta-arrestina pode ser promovido por meio de ligantes (agonistas) de seletividade funcional (VIOLIN et al., 2010a; AUDET; BOUVIER, 2012; NAMKUNG et al., 2018b). De forma complementar, a outra novidade é que há evidências de que o endossomo formado pelo complexo agonista-receptor-efetores mantém um processo de sinalização no ambiente citoplasmático da célula (JIMENEZ-VARGAS et al., 2020; WRIGHT et al., 2021) e, mesmo com a redução da resposta para agonistas extracelulares, a sinalização permanece funcionando no interior da célula.

Além da dessensibilização, que é a perda de resposta diante de um estímulo prolongado, outro fenômeno inerente aos efeitos contráteis da Ang II é a taquifilaxia, ou seja, a perda de resposta após sucessivos estímulos (KHAIRALLAH et al., 1966a; MOORE; KHAIRALLAH, 1976; PAIVA et al., 1976; ABOULAFIA et al., 1989). Isto significa que em uma situação em que a resposta taquifilática esteja reduzida, a manutenção da responsividade do AT1R pode potencializar os efeitos da Ang II (DUARTE et al., 2022), especialmente a hipercontratilidade de vasos sanguíneos, contribuindo com o aumento da pressão arterial.

Os efeitos celulares da Ang II ainda estão sendo elucidados, mas um fato que chama a atenção é que a ativação do AT1R também (trans)ativa a NADPH-oxidase do tipo 2 (NOX2), que gera o radical superóxido no citosol (ZHANG et al., 2015; HARVEY et al., 2017). Isso significa que a Ang II é parecida com uma citocina pró-inflamatória e as espécies oxidantes geradas contribuem com a contratilidade (ZHANG et al., 2015) e podem predispor a artéria a prejuízos estruturais como as lesões aterotrombóticas e aneurismáticas (CASARE et al., 2016; SAWADA et al., 2022).

Um dos fenômenos mais interessantes da cascata de sinalização do AT1R são os subsequentes processos de fosforilação e desfosforilação, mediados por quinases e fosfatases, respectivamente. Descrevendo-os brevemente, o fosfato (PO_4) é covalentemente adicionado em resíduos de serina e treonina (principalmente) por ação catalítica das quinases e, posteriormente, as fosfatases retiram este grupamento das proteínas. Muitas proteínas ao receber o grupamento fosfato têm seu poder catalítico amplificado. A fosforilação e desfosforilação são então fenômenos cíclicos capazes de orquestrar a cinética e a magnitude da amplificação do sinal de GPCRs dentro da célula (KENAKIN, 2002; SINGH et al., 2017b), além do tempo de permanência do receptor na membrana (SASAMURA; DZAU; PRATT, 1994; GUREVIC & GUREVICH, 2008). As fosforilações de proteínas pela sinalização do AT1R pode também potencializar a contratilidade de vasos sanguíneos e permitir que o sinal extracelular da Ang II chegue ao núcleo para a transcrição de genes (BALBI et al., 2009).

Depois que o AT1R gera a primeira onda de sinal caracterizada por ativação da proteína $\text{G}\alpha_q/11$, aumento de cálcio citosólico [Ca^{++}]_i e ativação de quinases -, uma segunda sinalização se manifesta, na qual a beta arrestina vai participar como molécula ancoradora de sinalização (TOHGO et al., 2002; LEFKOWITZ; SHENOY, 2005; PUPO, 2006; SANTOS et al., 2015; CARVALHO-GALVAO et al., 2018; WINGLER et al., 2019). A partir desta premissa, definiu-se teoricamente que o AT1R (e outros GPCRs) podem apresentar uma seletividade funcional (*biased agonism* ou ativação tendenciosa), isto é, a ativação que gera predominância de uma cascata intracelular específica sobre outra (VIOLIN; LEFKOWITZ, 2007; VIOLIN et al., 2010b; BOERRIGTER et al., 2012; WINGLER et al., 2019). Tal fenômeno pode ser artificialmente induzido quando se usa um agonista de GPCR que, ao ativar o receptor, o estabiliza em determinada conformação de modo a formar um complexo com determinado efetor: proteína G ou beta arrestina, por exemplo (KENAKIN, 2011, 2013; GUREVICH; GUREVICH, 2017; NAMKUNG et al., 2018b).

A compreensão das bases moleculares da seletividade funcional tem contribuído com o entendimento de determinadas condições clínicas (CHAKIR et al., 2009; KURDI & BOOZ, 2014; TEIXEIRA et al., 2017) e pode ser usada para, ao selecionar por meio de fármacos a sinalização predominante pela proteína G ou pela beta-arrestina, potencializar efeitos benéficos e evitar reações adversas a fármacos que agem neste sistema (DEWIRE; VIOLIN, 2011; MONASKY et al., 2013; SOERGEL et al., 2013).

No caso específico do AT1R, foram construídas moléculas análogas a Ang II, que são peptídeos com alterações em um ou dois resíduos de aminoácidos e que, assim, são capazes de estabilizar o receptor em diferentes conformações, ativando vias de sinalização preferenciais (VIOLIN; LEFKOWITZ, 2007; WINGLER et al., 2019). Neste caso, os ligantes análogos a Ang II que não disparam a ação das proteínas $G\alpha_q$ e $G\alpha_{11}$, que são as mobilizadoras de $[Ca^{++}]_i$ são os ligantes do tipo SII (Sar-Ile-Ang II) e também os agonistas tendenciosos para a via da beta-arrestina (TRV120023 e TRV120027).

No uso destes agonistas tendenciosos ou de seletividade funcional de AT1R, dois fenômenos chamam a atenção: um deles é a capacidade de se aumentar a contratilidade cardíaca sem aumentar a pressão arterial, decorrente do recrutamento seletivo da via da beta-arrestina em roedores, cães e humanos (VIOLIN et al., 2010b; BOERRIGTER et al., 2012; KIM et al., 2012; MONASKY et al., 2013). Por outro lado, foi descrito o aumento de relaxamento vascular tanto de forma independente quanto dependente de endotélio (SINGH et al., 2017a; CARVALHO-GALVAO et al., 2018), contribuindo com a redução da pressão arterial por ação do TRV027.

1.3 O AT1R é um alvo terapêutico para o controle do risco cardiovascular

O AT1R é um alvo farmacológico importante no controle da hipertensão, insuficiência cardíaca e outras condições de risco cardiovascular (FORD et al., 2001; S. et al., 2007; BOERRIGTER et al., 2012; HO et al., 2021). Assim, os antagonistas do AT1R são empregados no controle clínico da pressão arterial e na redução da morbimortalidade gerada pelos fatores de risco cardiovascular. Por isso estas ferramentas terapêuticas também contribuem com a prevenção de agravos cardiovasculares secundários a quadros de insuficiência cardíaca e diabetes (PEREIRA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2002; CERAVOLO et al., 2007).

Nas últimas três décadas o AT1R passou a ser inibido por ação de antagonistas não-peptídicos como a losartana, candesartana, valsartana, telmisartana, olmesartana e outros análogos. O uso terapêutico principal destes antagonistas é no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca (OIKAWA et al., 2001) ao passo que evidências apontam que estes

medicamentos podem prevenir agravos (HO et al., 2021) e aumentar a sobrevida de portadores de diabetes e de insuficiência renal (STRIPPOLI et al., 2006).

A eficácia terapêutica dos antagonistas do AT1R já está estabelecida, mas o desafio proposto neste trabalho é saber se quando há diabetes associada e, conseqüentemente, aumento do conteúdo de proteínas modificadas por O-GlcNAc há uma exacerbação da resposta promovida pelo AT1R, o que poderia representar que estes antagonistas trazem benefícios se utilizados antes que eventos cardiovasculares sejam estabelecidos.

1.4 A O-gluconacilação de proteínas intracelulares se relaciona com alterações nos mecanismos de transdução de sinal

A O-gluconacilação, O-GlcNAcilação ou O-glicosilação por N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional de proteínas. Faz décadas que há evidências de propriedades bioquímicas relacionadas a anexação de carboidratos a proteínas, contribuindo, por exemplo, com o desenvolvimento da visão em roedores (WALLENFELS, 1979). Porém, os trabalhos desenvolvidos em Baltimore (EUA) por Rosa-Torres & Hart descreveram que na superfície mas, principalmente, no interior de linfócitos murinos (mas não do timo), havia glicoproteínas com afinidade pela galactose tritiada (UDP[³H]-galactose) e passíveis de hidrólise por soda cáustica (TORRES; HART, 1984; HOLT; HART, 1986). Isso poderia significar que um grupamento carboidrato estava anexado a aminoácidos em um átomo de oxigênio destes. O carboidrato em questão é um amino-carboidrato, prioritariamente a N-acetil-glucosamina (ou N-acetil-glicosamina). Este fenômeno é conservado em diferentes reinos da natureza, ocorrendo em procariontes, *Drosophila*, *C elegans* e outros (HART et al., 1995, 2011; HANOVER, 2011) e é considerada um sensor de nutrientes, de metabolismo e de estresse celular (HANOVER, 2011).

Descrevendo brevemente, a O-gluconacilação ocorre quando uma molécula de β -D-N-acetil-glucosamina (GlcNAc) é enzimaticamente anexada por ligação covalente a moléculas de oxigênio (O - ligação) nas hidroxilas das cadeias laterais, em resíduos de serina e treonina que formam as proteínas intracelulares, os mesmos que teoricamente podem ser fosforilados pela ação das quinases (TORRES; HART, 1984; HART et al., 2011). A identificação desta modificação

pós traducional tem sido realizada usando ferramentas radioativas (BANERJEE; MA; HART, 2015), de relação antígeno-anticorpo (AKIMOTO et al., 2003) ou por espectrometria de massas hifenada com cromatografia líquida (TORRES; HART, 1984; ANG et al., 2022).

Até agora, atribui-se esta reação enzimática a ação de uma única enzima do tipo transferase, a O-GlcNAc-transferase (OGT), que é bastante estimulada na presença do seu substrato, a uridina-bisfosfato de N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc). De modo semelhante ao que ocorre após o fenômeno da fosforilação, uma proteína quando modificada por O-GlcNAc é passível de alterações funcionais e de localização no interior da célula, seja ela uma proteína citoplasmática, mitocondrial ou nuclear (SLAWSON et al., 2005; HANOVER, 2011; HART et al., 2011; ZACHARA, 2012, 2018; PHIE et al., 2021).

Na contramão, uma outra enzima do tipo glicosidase, a O-GlcNAc-ase (OGA) retira esta molécula de N-acetil-glucosamina deixando novamente a proteína livre (TORRES; HART, 1984; HART et al., 2011; ZACHARA, 2018). Sintetizando, a O-gluconacilação é proveniente de substratos do metabolismo nutricional de carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas e que precisa de ações das enzimas da via das hexosaminas, cuja magnitude pode ser atribuída principalmente ao balanço catalítico entre OGA e OGT e a disponibilidade de UDP-GlcNAc na célula.

O grupamento N-acetil-glucosamina (GlcNAc) é um produto da via das hexosaminas, que é uma via metabólica colateral à via glicolítica. Ao entrar na célula, a glicose é fosforilada e posteriormente convertida em frutose fosforilada. Esta frutose fosforilada pode seguir adiante na via glicolítica ou ser capturada pela GFAT (Transaminase de glutamina em frutose-6-fosfato) que usa a molécula de frutose 6-fosfato para converter em UDP-GlcNAc, subtraindo-a do caminho metabólico que formaria o piruvato destinado a alimentar o ciclo de Krebs (MCKNIGHT et al., 1992; SCHLEICHER; WEIGERT, 2000; ZHU; LEDEE; OLSON, 2021).

Experimentalmente, diversas pesquisas lançaram mão de ferramentas genéticas e químicas para ativar ou inibir essas duas enzimas (OGA e OGT) modificando o conteúdo de O-GlcNAc na célula. Neste aspecto, intervenções farmacológicas sobre a OGA tem sido mais estáveis em aumentar o conteúdo de proteínas O-gluconaciladas (HART et al., 2011), principalmente com o desenvolvimento do inibidor sintético da OGA, o thiamet G (TMG) (YUZWA et al., 2008), que pode ser usado *in vivo* ou *in vitro*. Por outro lado, a redução do

montante de proteínas O-gluconaciladas tem sido feita usando inibidores da OGT, como o OSMI-1 (HEGYI et al., 2020), mas o inibidor da GFAT (L-DON) também é capaz de promover de maneira eficaz a redução de proteínas O-gluconaciladas (XIE et al., 2016; SILVA-AGUIAR et al., 2018).

O aumento de proteínas O-gluconaciladas se correlaciona com parâmetros nutricionais, principalmente a glicemia (BANERJEE; HART, 2015). Exemplificando, esta modificação pós-traducional é mais abundante em portadores de diabetes (SCHLEICHER; WEIGERT, 2000; HART et al., 2011; CHEN; ZHAO; WU, 2019; PHIE et al., 2021) ou em modelos laboratoriais de diabetes experimental (DENNIS et al., 2011). Também é descrito o aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc em outras condições relacionadas ao estresse como em hipertensão experimental (Lima et al., 2009, 2010, 2011; Silva-Aguiar et al., 2018; Zachara, 2012), em ratos submetidos a dieta hiperlipídica (Lima et al., 2010) em hipertrofia de sobrecarga após constrição cirúrgica da aorta (ZHU; LEDEE; OLSON, 2021). Um trabalho do nosso laboratório, ainda sob revisão, investiga as variações de O-GlcNAc em monócitos extraídos de sangue periférico de voluntários portadores de diabetes submetidos a dieta de restrição calórica, como um possível preditor de redução de risco cardiovascular.

A repercussão biológica da O-gluconacilação de proteínas tem sido paulatinamente desvendada. Do ponto de vista teórico, como já citado anteriormente, os mesmos resíduos de serina e treonina que são propensos a serem fosforilados por quinases também são alvos da O-gluconacilação pela ação enzimática da OGT. Considerando-se então uma competição estequiométrica, ou o modelo binário do *Yin Yang* (HART et al., 1995, 2011), isso significa que a modificação por O-GlcNAc inibe a fosforilação de proteínas.

Por outro lado, quinases e fosfatases podem ter resíduos de aminoácidos alvos da OGT e, conseqüentemente, ter suas funções aumentadas ou reduzidas decorrentes da O-gluconacilação. Esta relação múltipla pode ser mais apropriada para a compreensão dos fenômenos biológicos complexos nos seres vivos; é modelo do *paradoxo do O-GlcNAc* (WANG; GUCEK; HART, 2008; HART et al., 2011). Uma outra situação é a mesma proteína poder ser simultaneamente modificada por fosfato e O-GlcNAc.

Os estudos em sistemas biológicos com elevado conteúdo de proteínas pós-traducionalmente modificadas pode contribuir com a compreensão de processos

patofisiológicos ou, com o estabelecimento de novas terapias. De fato, ainda não se tem um protocolo que preconize aumento ou redução de O-gluconacilação de proteínas para tratar alguma condição clínica em humanos. Porém, alguns laboratórios têm usado uma dose alta de glucosamina hidrocloreto (1,5 g/dia *via oral*) como nutracêutico para o tratamento de dor (CZAJKA et al., 2018) e desgaste osteoarticular (KWOH et al., 2014), sem ainda investigar as potenciais modificações pós-traducionais por O-GlcNAc em proteínas decorrentes deste tratamento.

A glucosamina (ou glicosamina) é um substrato da via metabólica das hexosaminas e é utilizada em ensaios pré-clínicos para enriquecer esta via metabólica e, com isso, induzir aumento de O-GlcNAc *in vivo* e *in vitro*. Assim, foi possível obter resultados que direcionam para alterações agudas de O-gluconacilação com potencial de reduzir agravos na sepse (HWANG et al., 2019) e na isquemia de cardiomiócitos. Por outro lado, o tratamento com glucosamina protegeu células tumorais dos efeitos citotóxicos do tamoxifeno (KANWAL et al., 2013).

Então, o que vai se investigar neste trabalho é a relação entre uma modificação em proteínas no ambiente intracelular (O-GlcNAc) em células que reproduzam fenômenos correlacionados ao aumento de risco cardiovascular (contratilidade de artérias, ativação de quinases e mobilização de cálcio) sob estímulos em um receptor farmacológico responsável pelo controle do sistema cardiovascular (AT1R).

1.5 Na fisiologia da contração do músculo liso o aumento de proteínas O-gluconaciladas altera a contratilidade de artérias

As propriedades contráteis do músculo liso constituinte de veias e artérias se relacionam diretamente com a fisiologia hemodinâmica, ao passo que prejuízos nos processos de contração e relaxamento são sinais de doença cardiovascular e, frequentemente, estas alterações contribuem na manutenção da hipertensão e do diabetes, predispondo estes indivíduos a eventos cardiovasculares graves e redução da qualidade de vida.

O músculo liso das artérias contribui com o controle do tônus arterial e, conseqüentemente, com o aumento da resistência periférica total. Ao contrair ou manter um

tôno aumentado ele tende a gerar um aumento da pressão sanguínea. Descrevendo brevemente, a contração do músculo liso vascular ocorre basicamente por três diferentes tipos de estímulo: (1) os neurogênicos, como a noradrenalina e serotonina liberadas nas terminações nervosas em vasos sanguíneos; (2) os miogênicos, caracterizados pelas respostas autorregulatórias de artérias; ou (3) por ação de mediadores endógenos e hormônios, como é o caso da Ang II, endotelina, vasopressina, adenosina e ATP (SOMLYO, 1968; SOMLYO; SOMLYO, 1994; SIMONNET; BRUNET, 2019). A maioria destes fatores descritos atua ativando GPCRs.

Neste caso, a sequência de eventos que ocorre após a ativação do AT1R, que culminará na contração do músculo liso vascular, é o acúmulo dos mensageiros secundários DAG e IP3. Os receptores de IP3 no retículo sarcoplasmático arterial (IP3R) são canais especializados na Ca^{++} dos estoques reticulares para o citosol e proporcionar a contratilidade (BERRIDGE; IRVINE, 1984; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000). O Ca^{++} e o DAG são capazes de ativar quinases, principalmente a proteína quinase do tipo C (PKC).

O aumento da $[\text{Ca}^{++}]_i$ em células musculares arteriais permite a ativação da calmodulina, que é uma enzima que se ativa quando o Ca^{++} ocupa alguns dos seus 4 sítios de afinidade para este íon (SALDANHA, 1989; MURASAWA et al., 1998). Estando a calmodulina ativada (complexo Ca^{++} -calmodulina), ela fosforila a quinase da cadeia leve da miosina (KCLM), que subsequentemente fosforilará a miosina, expondo o sítio de afinidade pela actina, disparando a contratilidade pela interação entre estes dois microfilamentos proteicos (ANDERSON; GIMBRONE; ALEXANDER, 1981; SOMLYO et al., 1985; SALDANHA, 1989; ZHANG et al., 2014). O Ca^{++} livre no citoplasma e a atividade catalítica de diversas quinases como a calmodulina, as quinases da calmodulina (CaMK), a PKC, a quinase dependente da GTPase Rho-A (RhoK), a KCLM e outras são determinantes na contratilidade de vasos sanguíneos (SOMLYO et al., 1985; SAWADA et al., 2001; AMOBI; CHUNG; SMITH, 2006).

A PKC é uma das quinases relacionadas com a cascata de sinalização do AT1R (CHIU; SANTISKULVONG; ROZENGURT, 2003; FERNANDEZ et al., 2005; NAMKUNG et al., 2018). Ela se apresenta em diversas isoformas, algumas mais dependentes Ca^{++} para se ativar (PKC α , β e γ) e outras mais dependentes do conteúdo de DAG (PKC δ , ϵ e θ), que é um dos principais mensageiros secundários da via do AT1R. A fosfatidilserina também é um cofator da PKC (KHALIL, 2013). Na atividade catalítica, a PKC tem como substratos para fosforilação resíduos

de serina e treonina de diversas proteínas que formam canais iônicos, receptores da membrana da célula e do retículo sarcoplasmático. A natureza bioquímica da PKC também permite que ela transite do citosol para microdomínios de membrana plasmática, retículo sarcoplasmático e núcleo. Neste sentido, teoricamente, a atividade da PKC contribui com o aumento da contratilidade dos vasos sanguíneos (DAMRON et al., 1998; AMOBI; SUGDEN; SMITH, 1999; KHALIL, 2013).

Todos esses aspectos conduzem a um entendimento de que há quatro fatores fundamentais na regulação da contratilidade de artérias: (1) a ativação de GPCRs, como o AT1R; (2) a disponibilidade de Ca^{++} em estoques na célula, (3) a ativação de quinases e fosfatases que contribuem na contração e no relaxamento e (4) o trabalho através de canais iônicos que promovem o influxo e efluxo de cargas que regulam a contratilidade do músculo liso vascular.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório iniciaram uma investigação acerca das repercussões da O-gluconacilação de proteínas na fisiologia de artérias. Assim, foi possível mostrar que o aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc promove alterações biológicas na resposta contrátil. Por exemplo, aumentando em aorta isolada de ratos a eficácia farmacológica de agonistas vasoconstritores como fenilefrina (LIMA et al., 2014) e endotelina (LIMA et al., 2011) e a atividade catalítica da quinase da cadeia leve da miosina (LIMA et al., 2014). A ferramenta utilizada para aumentar o conteúdo de O-GlcNAcAse foi o pugnac, um inibidor da OGA solúvel em álcool.

Então, considerando que a O-gluconacilação de proteínas ocorre com maior cronicidade em doenças metabólicas como a hipertensão e o *diabetes mellitus* (LIMA et al., 2009), será testada a hipótese de que aumento de proteínas O-gluconaciladas no citoplasma da célula pode interferir na transdução do sinal da Ang II via AT1R, reduzindo a probabilidade de fosforilações e, conseqüentemente, alterando o padrão de contratilidade e de recrutamento da beta-arrestina para reduzir a cinética de dessensibilização deste receptor.

2 OBJETIVO

Investigar se o aumento de proteínas intracelulares modificadas por O-gluconacilação reduz o acoplamento entre o AT1R e a beta-arrestina e, conseqüentemente, altera a transdução do sinal da Ang II potencializando a sinalização do AT1R.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos em cultura de células HEK293T

3.1.1 Padronização e caracterização do sistema experimental

Células HEK293T constituem uma linhagem de células originárias de um embrião humano feminino, imortalizada por um vírus Símio SV40, que produzem um antígeno T e apresentam um gene de resistência a neomicina. Estas células são extensivamente usadas em experimentos de farmacologia porque apresentam poucos receptores de membrana, porém possuem diversos efetores intracelulares capazes de permitir a visualização de efeitos funcionais quando se incorpora receptores via transfecção heteróloga de plasmídeos codificadores, seja de forma transitória ou permanente.

Inicialmente, esta célula foi transfectada com um lentivírus para expressar estavelmente um clone humano do AT1R fusionado a uma sequência FLAG e um gene de resistência a puromicina. Então, a partir de uma única célula HEK293T transfectada com o lentivírus e posteriormente isolada e subcultivada por algumas semanas foi possível gerar uma população de um clone estável, com uma densidade intermediária de AT1R (clone 4). A descrição e caracterização desta célula (HEK-AT1) podem ser consultadas na tese “Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por ligantes com diferentes perfis farmacológicos” (CEPELUPE-SIMÕES, 2019).

As células HEK-AT1 foram cultivadas em condições estéreis com meio de cultura (*Dulbecco Modified Eagle Medium* – DMEM), acrescentado de 10% de soro fetal bovino, bicarbonato de sódio (2 g/L), glicose (4,5 g/L = *high glucose*) e os antibióticos gentamicina e puromicina (50 e 2 mg/L, respectivamente). A cada descongelamento, estas células eram testadas para a capacidade de aumentar $[Ca^{++}]_i$ por estímulo com Ang II como controle da integridade funcional (este protocolo está descrito adiante).

Utilizando deste mesmo meio de cultura, em 2 placas de 6 poços, semeou-se entre 850 mil e 1 milhão de células por poço, sob 2 mL de meio DMEM. As placas foram mantidas em incubadora de células (NU-4750, Nuair, Plymouth, EUA) com atmosfera de 5% de CO₂,

saturada com H₂O e temperatura de 37°C por 24 horas (h). Após 70-80% de confluência, foi feita a privação de soro fetal bovino e acrescentou-se em uma destas placas meio de cultura contendo o inibidor da OGA thiamet G (TMG 1 μM) e na outra placa o meio de cultura sem TMG, permanecendo assim por 16-18 h na estufa (figura 1).

Posteriormente, cada poço foi lavado com Solução fisiológica salina em tampão fosfato (PBS) gelado e as células foram congeladas na presença de tampão de lise celular para extração de proteínas e caracterização por imunoblot.

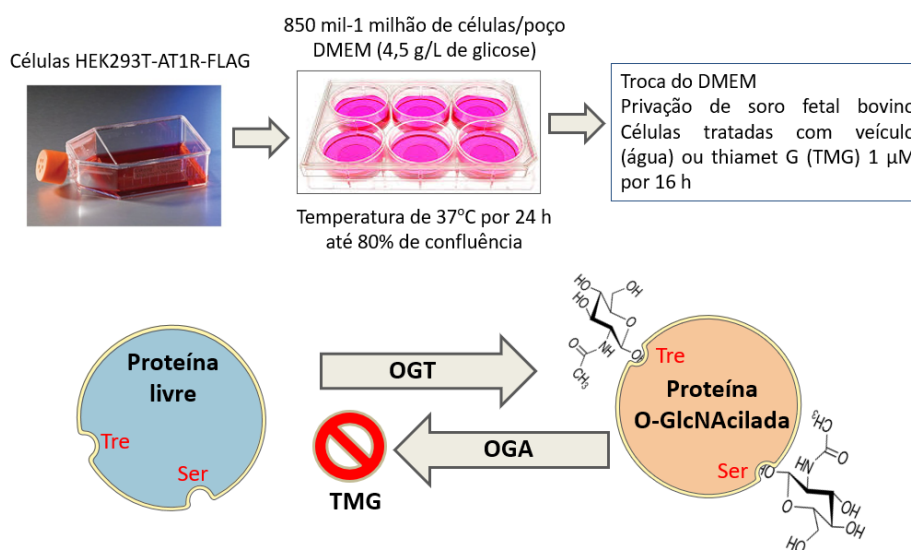


Figura 1. Padronização do modelo in vitro de aumento de proteínas O-gluconaciladas. Células HEK293T expressando estavelmente o AT1R foram cultivadas em placas de 6 poços e, após confluência de cerca de 80%, foram submetidas ao aumento global de O-gluconacilação de proteínas usando thiamet G (TMG, 1 μM) ou veículo (água) para a condição controle, respectivamente. Este tratamento permaneceu por 16-18 horas para posteriormente estimular com angiotensina II ou TRV027 por diferentes tempos para determinação da cinética de fosforilação de ERK. O TMG impede o desligamento das moléculas de N-acetil glucosamina das proteínas intracelulares, permitindo um aumento de proteínas O-gluconaciladas e detectáveis por imunoblot

3.1.2 Estudo funcional da cinética de ativação do AT1R em células HEK 293T após aumento global de proteínas O-gluconaciladas

Para aferir a cinética de transdução de sinal do AT1R em um ambiente celular com aumento global de proteínas modificadas O-gluconaciladas, as células foram cultivadas em placas de 6 poços, igualmente ao que está descrito no item 3.1.1. Após 16-18 h de ação do

TMG (1 μ M), o meio de cultura DMEM foi trocado para 800 μ L de DMEM sem soro fetal bovino (FBS) e sem antibióticos em cada poço e cada placa permaneceu por 15 minutos (min) a 37°C. A partir deste momento, 800 μ L de DMEM sem agonistas foi acrescentado no primeiro poço (tempo 0 min) e, nos poços subsequentes, 800 μ L de DMEM contendo 200 nM de angiotensina II ou de TRV027 foi adicionado em cada poço, perfazendo um estímulo temporal regressivo para os tempos 20, 10, 5, 2 e 1 min. Ao fim dos estímulos, cada placa foi imediatamente colocada sobre gelo, aspirando-se em seguida o DMEM e lavando 1 vez com PBS gelado. As amostras foram mantidas em tubos de 1,5 mL, sempre em ambiente refrigerado.

Os detalhes do passo subsequente que é a realização do protocolo de *western blotting*, estão descritos no item 4.1.3 e o resultado deste protocolo foi expresso em média \pm erro padrão da média em unidades arbitrárias acima do basal (que foi considerado = 1,0) e analisado estatisticamente pela Análise de Variância - ANOVA de medidas repetidas, considerando-se estatisticamente diferente em valor com $p < 0,05$. O n foi considerado como o número de experimentos independentes usando células com diferentes passagens.

3.1.3 Preparação dos extratos proteicos, separação de proteínas em gel vertical e marcação com anticorpos

Para as análises de conteúdo de proteínas, as amostras biológicas de células ou fragmentos de artérias foram lisadas usando um tampão de desintegração de membranas (tampão de lise) que consiste em uma mistura de dodecil-sulfato de sódio (SDS) 0,5%, Triton X100 1%, Nonidet P-40 1%, cloreto de sódio (NaCl) 250 mM, tampão aquoso TRIS-HCl 10 mM (pH 7,5), fluoreto de sódio (NaF) 100 mM, ortovanadato de sódio (Na_2VO_3) 1 mM, fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF) 10 μ g/mL, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM e o coquetel inibidor de proteases (SigmaFast, S8830, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

Quando as amostras eram células em cultura, foram adicionados 200 μ L de tampão de lise em cada poço e todo o conteúdo raspado com auxílio de um rodo (Corning sterile cell scraper and lifter, Corning, EUA). No caso das artérias, após serem congeladas em nitrogênio líquido, elas foram mecanicamente pulverizadas usando um pistão e martelo e, sobre o pó, foram adicionados 100-120 μ L do tampão de lise, sempre mantendo as amostras em baixa

temperatura. Foi utilizado ultrassom (sonicador) por cerca de 30 segundos nestas amostras para aumentar o estresse sobre as membranas celulares.

Então, as amostras foram maceradas por pelo menos meia hora no mesmo tampão de lise usando um rotor orbital (a 8º C na geladeira) e posteriormente centrifugadas (5427R, rotor de raio igual a 8 cm, Eppendorff, Hamburgo, Alemanha) dentro de tubos Eppendorff de 1,5 mL a uma rotação de 11.000 rpm por 12 min e temperatura de 4º C. O sobrenadante com proteínas solubilizadas foi recolhido em novos tubos e uma alíquota seguiu para quantificação pelo método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad, Hercules, EUA), usando amostras 10 vezes diluída (1:10) e albumina de soro bovino (0,125-1 mg/mL) para a curva padrão e os respectivos controles (tampão de lise 10 vezes diluído e água ultrapura). A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Epoc, Agilent Biotek, Santa Clara, EUA) capturando o sinal em 595 nm em placas transparentes de 96 poços.

Posteriormente, 30 ou 40 µg de proteínas (de células ou artérias, respectivamente) foram submetidas a eletroforese vertical em gel de 10 ou de 12% de poliacrilamida + SDS durante 2 h em um sistema Transblot cell (Biorrad, Califórnia, EUA). As membranas de imunoblot foram marcadas com padrão de peso molecular de proteínas Spectra Multicolor Broad Range (Thermo Scientific #26623) ou PageRuler prestrained protein ruler (Thermo Scientific #26617).

Após as proteínas serem separadas no gel, elas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Amershan, General Electric, Alemanha) que estavam previamente ativadas com metanol anidro. A transferência também foi feita no tanque de eletroforese por 2 h a 75 V (tampão tris-glicina + 15% de metanol). Em seguida, cada membrana de PVDF foi lavada 3 vezes e bloqueada por 1 hora usando albumina de soro bovino a 4%. Então, incubou-se cada anticorpo primário diluído em tampão salino Tris/HCl (pH7,5) + NaCl 0,9% acrescentado de Tween-20 1 mL/L (TBS-T) e manteve-se em um balanço na geladeira. Após cerca de 16 h na presença do anticorpo primário, as membranas foram lavadas para desligar ligações inespecíficas (3 lavagens consecutivas com intervalo de 5 min entre elas) e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (tabela 1) por um período de 30-45 min. Após 3 novas lavagens, foi feita a revelação no aparelho fotodocumentador Imagequant (General Electric - GE, Boston, EUA) usando como líquido de revelação o substrato de peroxidase Luminata Forte (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA). O registro de

quimioluminescência e a quantificação das proteínas marcadas com anticorpo foram realizados com auxílio do software ImageQuant (GE, Boston, EUA).

Os anticorpos usados estão descritos no quadro abaixo:

Alvo	Referência	Fonte	Diluição	Marca
Proteínas totais modificadas por O-GlcNAc	07764 clone CT110.6	camundongo	1: 3.000	Sigma -Aldrich
O-GlcNAcAse (OGA) região carboxiterminal	SAB4200311 policlonal	coelho	1:3.000	Sigma -Aldrich
O-GlcNAc-Transferase (OGT)	SAB2500715 policlonal	cabra	1:3.000	Sigma - Aldrich
ERK 1 e 2 (p44/42) fosforiladas em treonina 202 e tirosina 204	4733 lote 10, monoclonal	coelho	1:2.000	Cell Signaling
ERK 1 e 2 total	4696, monoclonal	camundongo	1:2.000	Cell Signaling
GRK2	4674	coelho	1:2.000	Abcam
PKC δ	4143	coelho	1:500	Abcam
Beta-arrestina 1 e 2	4674, monoclonal	coelho	1:1.000	Cell Signaling
Beta-actina	4967	coelho	1:4.000	Cell Signaling
GAPDH	G9545	coelho	1:15.000	Sigma - Aldrich
Anti-FLAG	F3165	camundongo	1:3.000	Sigma - Aldrich
Anti-coelho – IgG conjugado a peroxidase	A0545 policlonal	cabra	1:10.000	Sigma - Aldrich

Anti-camundongo – IgG conjugado a peroxidase	1234-9 policlonal	cabra	1:10.000	EMD Milipore
Anti-cabra – IgG conjugado a peroxidase	AB9720 policlonal	macaco	1:5.000	Abcam

Tabela 1. Relação dos anticorpos usados neste trabalho, descrevendo a referência comercial, o tipo de anticorpo e a concentração utilizada.

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média da razão da densidade óptica do sinal da proteína em questão pela proteína usada como controle de carregamento (beta-actina, GAPDH) em unidades arbitrárias (UA). Após confirmada a não-parametricidade (Teste de Shapiro-Wilk), comparou-se os grupos com o teste U de Mann-Withney, considerando estatisticamente diferentes valores com $p < 0,05$. O n foi considerado como o número de experimentos independentes.

3.14 Investigação da mobilização intracelular de cálcio para Ang II em tempo real em células HEK293T com aumento global de proteínas O-gluconaciladas

Células HEK293T expressando estavelmente o AT1R foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços, paredes pretas e fundo transparente. Estas placas foram previamente tratadas com poli-L-lisina (1 mg/mL por 60 min) para aumentar a aderência (LUO et al., 2011). Foram distribuídas 50 mil células por poço em um volume final de 90 μ L de DMEM com 10% de FBS e antibióticos. Depois de 24 h, foram acrescentados 10 μ L de DMEM em metade dos poços da placa e 10 μ L de DMEM acrescentados de TMG (10 μ M) na outra metade, para permitir condição controle ou concentração final de 1 μ M de TMG, respectivamente.

Depois de 16-18 h, todo este DMEM foi aspirado e foram adicionados 20 μ L de DMEM sem fenol, antibióticos ou FBS. Posteriormente, foram acrescentados 30 μ L de solução de Hanks contendo a sonda fluorescente FLUO-4 AM (Invitrogen, Cambridge, EUA), a uma concentração final de 1 μ M. Esta sonda é permeável à membrana e gera fluorescência em tempo real ao quelar os Ca^{++} citoplasmáticos.

A mistura de trabalho continha solução de Hanks, FLUO-4, probenecida a 3,6 mg/mL (para inibir a extrusão da sonda via transportador de íons orgânicos da membrana celular), albumina de soro bovino (10 mg/mL, para dar pressão oncótica) e pluromicina (Pluronic® F127 a 0,02%), para facilitar a permeabilidade da sonda pela membrana. A placa permaneceu protegida da luz por 50-60 min em estufa a 37° C.

Depois a placa foi lavada por 2 vezes com solução nutriente de Hanks usando uma pipeta multicanal e um aspirador suave de vácuo (Manifold BrandTech 8; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e as células foram mantidas com 100 µL desta mesma solução de Hanks em cada poço por 15 min, dentro do aparelho aquecido e protegidas da luz antes de iniciar o registro.

A solução de Hanks usada é de seguinte composição (em mM): 136 de NaCl; 5,3 de KCl; 0,7 de Na₂HPO₄; 0,44 e KH₂PO₄; 1 de MgSO₄ 7H₂O; 1 de MgCl₂; 10 de HEPES; 10 de C₆H₁₂O₆ e 1,6 de CaCl₂.2H₂O. O pH foi ajustado para 7.4 com NaOH 1 mol/L. Após ajustado o volume final, esta solução foi filtrada a vácuo através de filtro de 0,22 µm de poro.

Para fazer as alíquotas de FLUO-4, ionomicina e Pluronic F127 usou-se dimetilsulfóxido estéril (DMSO), cuja concentração sobre as células foi sempre menor que 1:1000.

A placa foi lida no fluorímetro FlexStation 3 (Molecular Devices, San José, EUA) para produção de curvas concentração-resposta (não cumulativas) para Ang II. Isto significa que o aparelho pipetava automaticamente 25 µL das drogas 5 vezes mais concentrada no tempo de 16 segundos a partir do início da leitura e se monitorava o sinal até o tempo de 90 segundos. O controle positivo foi feito com 10 µM de ionomicina, um ionóforo de cálcio.

A leitura do sinal foi feita a 37° C, com fluorescência de excitação de 494 nm e a emissão foi adquirida com filtro de 525 nm e um *cut off* de 515 nm. A taxa de amostragem foi de 1 evento a cada 2 segundos e o fotomultiplicador permaneceu com sensibilidade média.

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. O sinal da fluorescência gerada pelo estímulo foi subtraído pelo sinal basal (0-15 segundos) e pelo sinal do poço não-estimulado (branco). Cada resposta foi quantificada pela área sob a curva de fluorescência (AUC) em unidades arbitrárias (RFU; figura 4A) e cada ponto no gráfico representa a AUC produzida pelas diferentes concentrações de Ang II (DUARTE et al., 2022) em razão da AUC produzida pela ionomicina (10 µM).

O gráfico concentração-resposta foi modelado pela sigmoide de Hill-Langmuir em análise de três parâmetros e a análise estatística foi feita ponto a ponto com o teste t de Student, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente diferente. O n é o número de experimentos independentes.

3.1.5 Quantificação de densidade de AT1R-FLAG em células tratadas com TMG

Considerando que as células HEK293T que expressam estavelmente o AT1R traduzem uma sequência FLAG na porção amino-terminal e extracelular deste receptor, usou-se a técnica de ELISA para quantificar em células inteiras estes receptores (AT1R), após o aumento global de proteínas O-gluconaciladas por TMG. Para isso, de modo semelhante ao descrito no item 3.1.4, as células foram distribuídas em placas de poliestireno brancas de fundo opaco, previamente tratadas com poli-lisina, a uma densidade de 50.000 células por poço. Alguns poços foram preenchidos com células não-transfectadas para controle. Após 24 h, as células foram tratadas com DMEM ou com DMEM + TMG (1 μM por 16-18 h) e, no dia seguinte, cada poço foi lavado 1 vez com 200 μL de PBS usando uma bomba a vácuo e uma pipeta multicanal. Em seguida, as células foram fixadas com 50 μL de uma solução de paraformaldeído (PFA 3% em PBS) por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida lavou-se 3 vezes com uma solução de albumina de soro bovino (0,5% em PBS) mantendo este bloqueio por 10 min para reduzir a probabilidade de ligações inespecíficas do anticorpo.

No passo seguinte, as células em cada poço foram incubadas com 50 μL do anticorpo monoclonal anti-FLAG (1:3.000 em PBS + 0,5% de albumina; tabela 1) por 1 h sob temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3 vezes com a mesma solução de bloqueio e mantidas por 10 min nesta solução na última lavagem. A seguir, cada poço já com 50 μL de conteúdo recebeu mais 50 μL desta solução contendo anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado a peroxidase (1:1.000), permanecendo por 1 h. Após esta etapa, cada poço foi lavado com 100 μL de PBS por 3 vezes e com intervalo de 10 min para cada lavagem. Este PBS foi aspirado e foram adicionados 50 μL de PBS e sobre ele, 50 μL da solução com substrato de peroxidase Luminata Forte (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA). Após 2 min, foi realizada leitura da quimiluminescência durante 250 ms de exposição com sensores

posicionados por cima da placa usando a leitora de placas (Flexstation 3, Molecular Devices, San José, EUA).

Com o intuito de estabelecer a razão matemática da fluorescência relativa ao FLAG do domínio aminoterminal extracelular do AT1R pelo número de células por poço, após esta leitura, o líquido de cada poço foi substituído por PBS contendo a sonda marcadora de núcleos 4',6-diamidino-2-fenil-indol di-hidroclorado (DAPI) na proporção de 1:10.000 em PBS. Após 15 min, foram realizadas 3 lavagens, e posteriormente se realizou uma nova leitura de fluorescência na mesma leitora de placas (excitação a 358 nm e emissão a 461 nm). Foram quantificadas a fluorescência relativa ao FLAG e a quimioluminescência da peroxidase pela fluorescência dos núcleos (DAPI).

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média da razão entre a fluorescência e quimioluminescência (FLAG/DAP) e analisados estatisticamente pelo teste de Wilcoxon, considerando como $p < 0,05$ para diferença estatística e o n é o número de experimentos independentes.

3.1.6 Experimentos funcionais de recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 pelo AT1R em células HEK293T usando sensores de bioluminescência de transferência de energia por ressonância - BRET

Células HEK293T foram suspensas com tripsina e contadas em câmara de Neubauer. Então, $3,2 \times 10^6$ células foram co-transfectadas com plasmídeos para codificar o AT1R humano (2,8 μ g), a pequena GTPase KRAS fusionada a proteína fluorescente verde – GFP como acceptora de energia (2,4 μ g) e a beta arrestina 1 ou 2 fusionada a *Renilla luciferase* - RlucII (175 ng). O conteúdo total de DNA para cada grupo foi igualado acrescentando-se DNA de esperma de salmão (31149, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A partir desta mistura, foi acrescentada polietileiminina de cadeia linear de 25 KDa (PEI; 765090, Sigma-Aldrich) na proporção 3:1 (PEI:DNA). Manteve-se esta mistura no fluxo laminar durante 15 min para formação das vesículas de transfecção.

As células já suspensas foram dispostas em um reservatório, misturadas a este conjunto de plasmídeos e, após uma homogeneização de 20 vezes usando pipeta de 10 mL, elas foram distribuídas em duas placas brancas de 96 poços e fundo opaco (previamente

tratadas com poli-lisina) a uma taxa de 40 mil células em 90 µL de DMEM por poço e foram usados 64 poços por placa. Após 24 h de plaqueamento foram acrescentados 10 µL de DMEM contendo veículo ou TMG a 10 µM. Depois de 16-18 h o meio de cultura foi aspirado e lavado 1 vez mantendo cada poço com 80 µL de solução de Tyrode de seguinte composição (em mM) 140 de NaCl; 2,7 de KCl; 1 de CaCl₂; 12 de NaHCO₃; 5,6 de C₆H₁₂O₆; 0,5 de MgCl₂; 0,37 de NaH₂PO₄ e 25 de tampão HEPES. As placas foram mantidas a 37º C por 30 min. Em seguida, foram acrescentados 10 µL de Tyrode contendo os ligantes Ang II ou TRV027 (1 pM – 1 µM) por 7 min, acrescentado logo em seguida o substrato de luciferase, *coelenterazina purple*, mantendo dentro da leitora de placas por mais 7 min, para em seguida iniciar a leitura do sinal de BRET usando a leitora de placas Synergy Neon (Biotek, Vermont, EUA), com filtros de excitação ajustados em 410/80 nm e de detecção em 515/30 nm.

3.1.7 Experimentos funcionais de ativação da proteína quinase C usando sensor de BRET

Para investigar a ativação da PKC, que é uma quinase ativada pelo DAG produzido pela via da proteína Gαq/11 e da PLC, posteriormente à ativação do AT1R, usou-se um método previamente descrito (NAMKUNG et al., 2018b) em que simultaneamente transfectou-se células HEK293T com plasmídeos para codificar o AT1R e uma isoforma de PKC fusionada a biossensores - GFP-PKC-c1b-Rluc, que muda de conformação quando ativada pelo DAG produzido. A partir de então seguiu-se o mesmo protocolo de ativação do AT1R, como descrito no item 3.1.6.

3.2 Experimentos funcionais de contratilidade para Ang II em artérias mesentéricas de camundongos espontaneamente diabéticos

3.2.1 Animais

Foram usados camundongos cujo genótipo apresenta alteração espontânea no gene que codifica o receptor de leptina em homozigose ou C57BKS/J^{Lep^R -/-}, denominado também db/db (fenótipo obeso) e os respectivos pares de ninhada não-homozigotos: C57BKS/J^{Lep^R +/-} ou + (fenótipo magro) denominados de db/m ou db/+ (referência 0697, Jacksons Laboratory, Bar Harbor, EUA), que respectivamente apresentam ou não a deficiência funcional no receptor de leptina. Esta deficiência em homozigose resulta em hiperfagia, sobrepeso, aumento dos depósitos corporais de gordura e hiperglicemia (VELASQUEZ; KIMMEL; MICHAELIS, 1990). Estes animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia em caixas isoladoras, 2-3 animais por caixa, em estante de exaustão, à temperatura ambiente de 23 ± 1º C, com ração em *pellets* (Nuvilab CR-1 comum, Quimtia, Colombo, Brasil) e água *ad libidum*.

Foram usados camundongos machos, com idade entre 130-150 dias (16-20 semanas), que é o tempo necessário para ultrapassar 2 meses de hiperglicemia (que ocorre por volta dos 90 dias de vida). Os protocolos foram autorizados pela Comissão de ética em experimentação animal (CEUA, autorização 72/2020) e conduzidos de acordo com as diretrizes do CONCEA, do Guia de Eutanásia de animais de laboratório (CFMV - CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012) e do guia ARRIVE de reprodutibilidade em experimentação animal (KILKENNY et al., 2010).

Estes camundongos foram eutanasiados em câmara vaporizada de gás isoflurano + oxigênio (3% + 100%) seguida de exsanguinação intraventricular (usando agulha de 22G e seringa de 2 mL). Em seguida o abdômen foi aberto e todo o intestino foi dissecado em uma placa de Petri forrada com resina Sylgard (Elastomer 184, Dow Corning, Midland, EUA) contendo solução de Krebs-Henseleit gelada (4-8 °C). As artérias mesentéricas de segundo ramo foram isoladas usando 2 pinças Dumont Biology #55 e uma tesoura do tipo *Vannas* de 2 mm (Fine Science Tools, North Vancouver, Canadá).

3.2.2 Drogas e soluções

As preparações de artérias isoladas foram perfundidas em solução nutriente de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (em mM): 130 de NaCl; 4,7 de KCl; 1,18 de KH_2PO_4 ; 1,17 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 14,9 de NaHCO_3 ; 1,6 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,5 de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ e 0,026 de EDTA. O pH desta solução é 7,4 e a preparação foi borbulhada com mistura carbogênica de $\text{O}_2 + \text{CO}_2$ (95% + 5%, respectivamente).

Nos ensaios funcionais, usou-se para testar a funcionalidade de cada preparação fenilefrina (Sigma #P6126) e acetilcolina (Sigma #A6625). Nos testes farmacológicos usou-se angiotensina II (Tocris #1158), TRV120027 (Aminotech, Diadema, Brasil). Todos foram solubilizados em água. Para melhorar a conservação, os peptídeos Ang II e TRV027 foram dissolvidos em água acidificada com ácido acético (proporção aproximada de 10^{-6} v/v, pH= 5,4) e estocados em alíquotas a -20°C . Os inibidores usados foram o mesilato-RO-318220/bis-indolilmaleimida 9 (Tocris #2002), PD98059 (Cayman) e BAPTA-AM (Tocris #2787), todos solubilizados em DMSO, sempre ficando em concentração final menor que 1:1.000.

3.2.3 Medidas de contratilidade e análises bioquímicas em anéis isolados de artéria mesentérica de animais espontaneamente diabéticos

Após extração e limpeza das artérias, segmentos de 1,8-2,0 milímetros foram montados em miógrafo de Mulvanny (DMT, Aarhus, Dinamarca) e sustentados transversalmente por dois fios de tungstênio de 25 μM (DMT #300096). Cada preparação foi normalizada a uma tração de 90% da tensão necessária para a artéria desenvolver 13,3 KPa; conforme preconizado pelos desenvolvedores do aparelho (MULVANY; HALPERN, 1977). Após estabilização por pelo menos 15 min, a viabilidade de cada anel foi testada por uma despolarização promovida pela adição de cloreto de potássio (KCl 90 mM), o que normalmente gera uma contração maior que 1 mN, para validar a preparação. Este estímulo foi repetido por pelo menos uma vez. Posteriormente, a viabilidade do endotélio vascular foi testada por uma contração para fenilefrina (1 μM) e, sobre o tono produzido, foi seguida uma curva de relaxamento para acetilcolina (10 μM). Considerou-se ausência de endotélio o relaxamento menor que 10% produzido pela acetilcolina em relação ao tono induzido por fenilefrina.

Em seguida, curvas cumulativas concentração-efeito para Ang II foram produzidas aumentando-se sucessivamente a concentração de 0,1 nM até 1 µM. Os experimentos foram pareados, comparando-se simultaneamente uma artéria de animal db/+ e uma artéria de animal db/db). Apenas uma curva para Ang II foi realizada em cada preparação.

Um conjunto de experimentos foi realizado com um estímulo prévio de TRV027 (1 nM) durante 15 min para ativar os AT1R para a via da beta-arrestina. Após este estímulo, a preparação foi lavada trocando-se a solução nutriente do reservatório uma vez (*washout*) e, após 5 min, foram produzidas curvas concentração-resposta para Ang II.

Outros experimentos foram realizados usando a bis-indolil-maleimida IX (ou mesilato de RO-31-8220, 20µM) para inibir a PKC ou o PD98057 (10 µM) para inibir a MEK1 e consequentemente a fosforilação de ERK1/2 (ou MAPK P42/44).

Os dados de contratilidade foram registrados em miliNewtons de tensão produzida por milímetro de artéria (mN/mm) e expressos em média ± erro padrão da média e estes valores foram modelados usando a equação de Hill-Langmuir de três parâmetros:

$$\text{Resposta farmacológica} = \text{Resposta máxima} + \frac{\text{Variação de resposta}}{1 + 10^{\log EC_{50} - \text{concentração}}}$$

A análise estatística foi feita pelo teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma via, quando apropriado. Assumiu-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativo e “n” foi considerado o número de animais.

Para os experimentos bioquímicos, todo o leito arterial mesentérico foi limpo em placa de Petri e as amostras foram acondicionadas em tubos cônicos do tipo Eppendorff de 1,5 mm e congeladas com nitrogênio líquido. Em seguida estas amostras foram pulverizadas sobre uma base de aço usando um martelo. O conteúdo transformado em pó foi transferido para o mesmo tubo contendo tampão de lise (100-200 µL) e todo o procedimento foi realizado de modo semelhante ao descrito no tópico 3.1.3.



Figura 2. Fotografia de um leito mesentérico de camundongo. Leito inteiro ligado ao intestino e protegido pelos tecidos adiposo conectivo, linfático e pela membrana peritoneal (à esquerda) e árvore arterial isolada (à direita), na qual foram realizadas as análises funcionais e bioquímicas.

3.2.4 Protocolo de recrutamento de beta-arrestina in situ

Para mensurar a participação da beta-arrestina 1 e 2 na contratilidade para Ang II nos segmentos das artérias mesentéricas isoladas dos animais saudável e diabético foi realizado o seguinte protocolo:

1 – Após a normalização e testes de viabilidade da preparação usando KCl 90 mM, cada preparação foi estimulada com veículo ou TRV027 (1 nM) durante 15 min. Depois a preparação foi lavada uma vez com solução nutriente.

2 – Após decorridos 5 min da lavagem, nas preparações previamente primadas com veículo ou TRV027, foram produzidas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang II.

3.2.5 Protocolo de taquifilaxia

Considerando que a taquifilaxia é a perda de resposta após sucessivos estímulos (KHAIRALLAH et al., 1966b; WALTER; BASSENGE, 1969; MOORE; KHAIRALLAH, 1976), mediu-se a magnitude de taquifilaxia para resposta contrátil em artérias mesentéricas de animais db/+ e db/db; que é o modelo de aumento natural de proteínas O-gluconaciladas. O protocolo foi adaptado de Paiva e colaboradores (PAIVA et al., 1976). Após estabilizados, cada anel foi estimulado para 10 nM de Ang II, que é a concentração que aproximadamente corresponde a EC₅₀ para contração, sendo este dado observado previamente nas curvas cumulativas concentração-resposta.

Então, sucessivos estímulos foram promovidos adicionando **Ang II** (10 nM) às cubas e lavando-se a preparação assim que a resposta máxima fosse alcançada, aguardando-se 5 min até o estímulo subsequente. Sendo assim, a Rmax do primeiro estímulo foi considerada como 100% de resposta e, em razão deste Rmax, foi calculada a perda de resposta aos estímulos subsequentes.

3.2.6 Protocolo de dessensibilização

Para medir a taxa de dessensibilização do AT1R para a resposta contrátil, os anéis de artéria mesentérica foram estimulados a produzir um tônus para 100 nM de **Ang II**, que é a concentração necessária para atingir a resposta máxima. A partir de então, mediu-se o tempo necessário para a perda de 50% da contração gerada (tempo de decaimento).

3.2.7 Medidas de contratilidade em anéis isolados de artéria mesentérica na presença de inibidores de quinases

Para investigar a participação de quinases no aumento de eficácia para Ang II nas artérias dos animais com aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc (db/db), investigou-se a resposta da Ang II inibindo duas das principais quinases efetoras da sinalização do AT1R: a **PKC** e as **MAP quinases** ERK 1/2. Para isso, foram usados os inibidores mesilato de RO-31820 (ou bis-indolilmaleimida I; Tocris 2002/10) e do PD98059 (Tocris 1213), respectivamente. O tempo de incubação do RO-318220 foi de 30 min e o do PD98059 foi de 60 min. A partir de então, foram construídas curvas cumulativas para Ang II conforme previamente descrito.

3.2.8 Efeito do quelante de cálcio intracelular, BAPTA-AM para reduzir o conteúdo citoplasmático de íons cálcio disponível para produzir a contração

Para investigar a participação do Ca⁺⁺ citoplasmático no aumento de contratilidade para Ang II em artérias mesentéricas dos animais db/db, foi usado como quelante de cálcio citosólico; o éster do ácido bis-aminofenoxietano-tetracético - BAPTA-AM (Invitrogen B6769,

10 μM por 30 min), composto permeável através da membrana e que, ao sofrer ação das esterases, é ativado e captura o cálcio citoplasmático.

Após estabilização das preparações e tratamento com veículo ou BAPTA, foram produzidas curvas concentração-resposta para Ang II.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do sistema: o inibidor da OGA promoveu aumento de O-gluconacilação em proteínas intracelulares de célula HEK293T

Após tratar as células HEK293T com TMG por 16 h em privação de SFB, os extratos proteicos foram submetidos ao protocolo de imunoblot e a análise foi feita pela razão densitométrica entre a marcação de proteínas totais modificadas por O-GlcNAc e do GAPDH como controle endógeno. Assim, para a condição controle a média foi de $1,5 \pm 0,2$ unidades arbitrárias (UA) e de $7,7 \pm 1,7$ UA para as células tratadas com TMG ($p < 0,05$; teste U de Mann-Whitney; $n = 6$). Nestas mesmas amostras foram marcados os conteúdos proteicos totais para algumas proteínas importantes para a sinalização do AT1R. Não foi observada diferença estatística no conteúdo de GRK2 ($0,27 \pm 0,06$ UA no controle e $0,29 \pm 0,06$ UA no grupo TMG) ou de beta-arrestina 1 e 2 ($0,49 \pm 0,07$ UA e $0,40 \pm 0,09$ UA no grupo TMG) ou PKC-delta ($1,48 \pm 0,5$ UA e $1,48 \pm 0,7$ UA, respectivamente; figura 2).

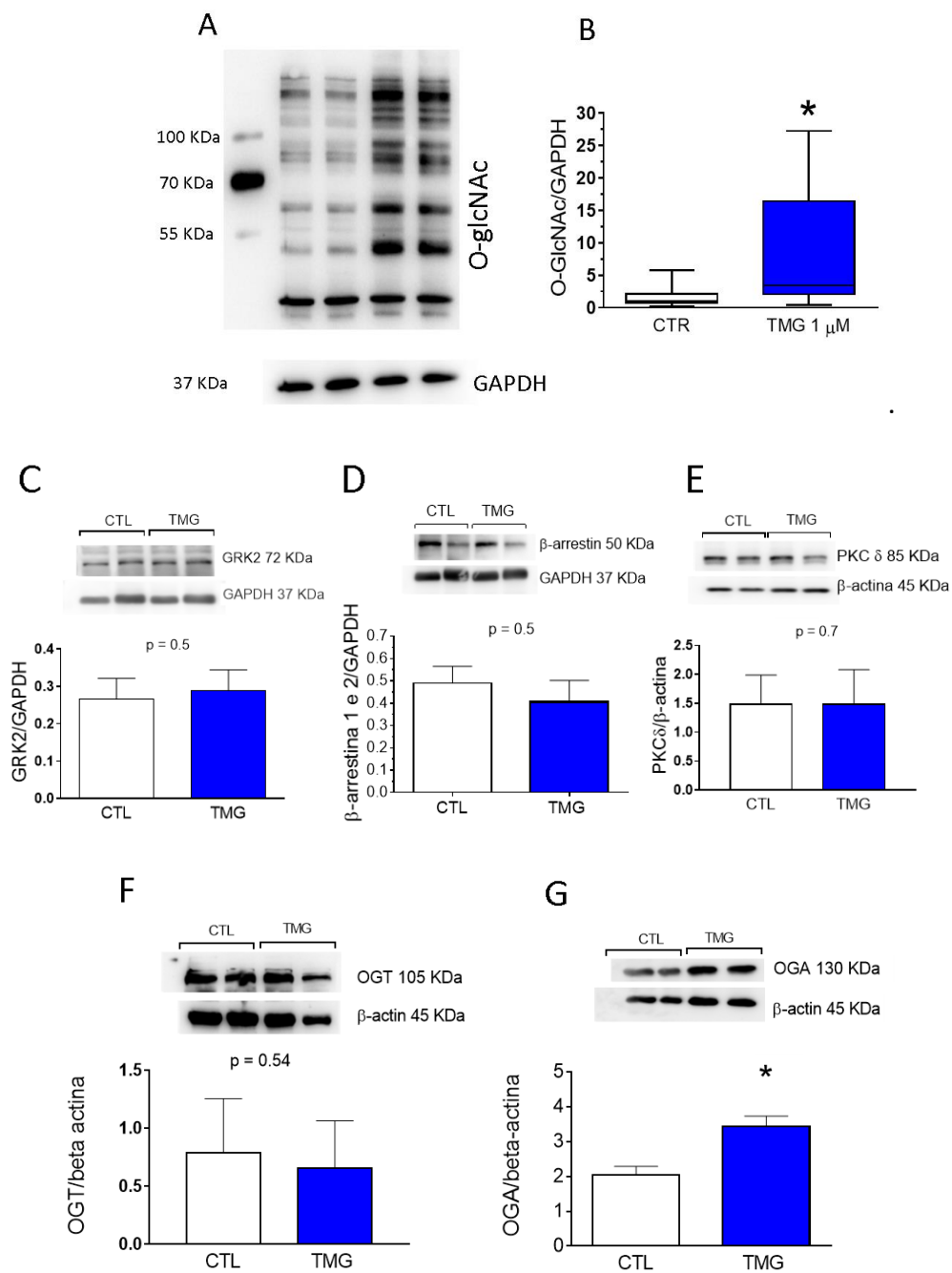


Figura 3. Imagens e gráficos representativos das medições por imunoblot de conteúdo proteico citosólico de células HEK293T mantidas em meio de cultura, com privação de soro fetal bovino e na presença de veículo (água) ou do inibidor TMG (1 μ M, 16-18 h). Conteúdo global de proteínas O-gluconaciladas (A e B) e de efetores da via do AT1R, como (C) GRK2, (D) beta-arrestina 1 e 2, (E) Proteína quinase do tipo C-delta, e das principais enzimas relacionadas com a O-gluconacilação: (F) O-GlcNAc-ase OGA e (G) O-GlcNAc-transferase, OGT. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (em unidades arbitrárias) da divisão de valores absolutos de densitometria das bandas da proteína de interesse pelo normalizador (GAPDH ou beta-actina); (*) $p < 0,05$. **Teste estatístico U de Mann-Whitney; n = 8 experimentos independentes.**

5.2 A magnitude da fosforilação de ERK por diferentes agonistas do AT1R é maior em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas

Inicialmente, para controle do protocolo, foi observado que células HEK293T que não expressam o AT1R não produziram o padrão típico de aumento de fosforilação de ERK em resposta a concentração de 100 nM do agonista Ang II (dados não mostrados), que é teoricamente a concentração necessária para ativar 98% dos AT1R.

Antes dos estímulos, observou-se que células HEK293T que expressam estavelmente o AT1R, sendo elas tratadas com veículo ou com TMG, apresentaram o mesmo nível basal de fosforilação de ERK baixo [basal significa tempo = 0 min e a quantificação = 1 unidade arbitrária (UA)]. Foi observado que nas células controle a Ang II produziu aumento na fosforilação de ERK 1/2 imediatamente após 1 min de estímulo ($2,66 \pm 0,45$ UA; $p < 0,05$), que posteriormente diminuiu no tempo de 2 min ($1,7 \pm 11$ UA) e aumentou, numa segunda onda de fosforilação mais fraca, em 5 min ($2,2 \pm 0,5$ UA), voltando aos valores basais nos tempos posteriores. Por outro lado, as células previamente tratadas com TMG (que apresentavam aumento de O-GlcNAc) mostraram um perfil semelhante de fosforilação de ERK 1/2 para Ang II, porém com valores de fosforilação de ERK 1/2 maiores que no controle. Em ambos os casos o sinal se manteve maior que o basal até o tempo de 5 min (figura 3A).

Um conjunto semelhante de experimentos foi feito, desta vez ativando o AT1R com o agonista tendencioso para a via da beta arrestina, o TRV027 a 100 nM, que também foi usado na concentração que teoricamente promoveria a ativação total dos AT1R. Neste caso, o perfil de fosforilação no grupo controle teve resposta máxima mais tardiamente (2 min; $2,7 \pm 0,7$ UA, figura 3B), retornando ao nível basal a partir de 10 min de estímulo com TRV027. Novamente, no grupo TMG a fosforilação de ERK 1/2 ocorreu em maior proporção, podendo-se visualizar em 2 min de estímulo ($4,7 \pm 1,3$ UA; $p < 0,05$) e, neste caso, não retornou ao valor basal até o tempo de 20 min.

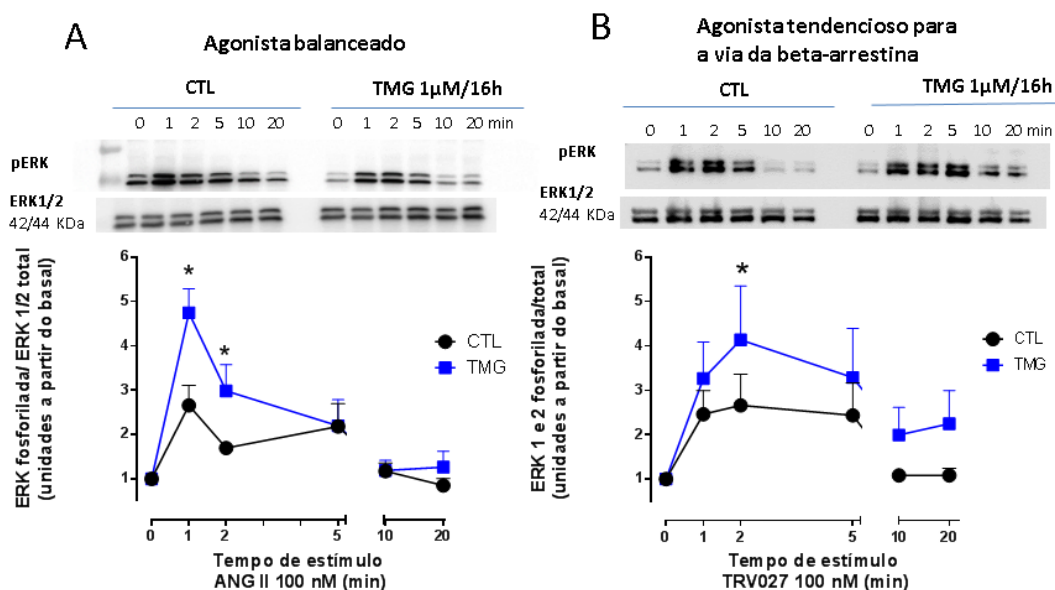
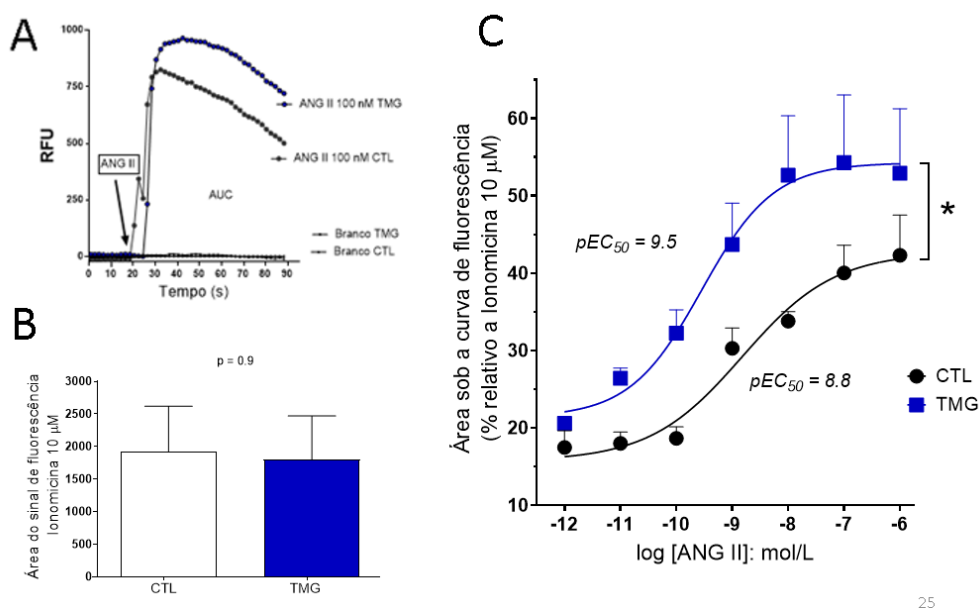


Figura 4. Imagens de imunoblot e gráficos da relação tempo-efeito da cinética de fosforilação de ERK 1/2 em células tratadas com TMG (1 μ M, 16-18 h) (quadros azuis) ou veículo (círculos pretos), e posteriormente estimuladas com (A) angiotensina II ($n = 8$), agonista balanceado e endógeno dos AT1R ou (B) TRV027 ($n = 6$), agonista do AT1R que não ativa as proteínas G α q/ α 11, mas ativa a via da beta-arrestina 1 e 2; (*) $p < 0,05$; teste t de Student.

5.3 A mobilização de cálcio intracelular é maior em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas

Células HEK293T expressando estavelmente o AT1R quando estimuladas com Ang II mostraram aumento transitório (ou transiente) de $[Ca^{2+}]_i$, de forma dependente de concentração (figura 4A), sendo estes valores apresentados em unidades de fluorescência (RFU). A fluorescência máxima do sistema produzida pelo ionóforo de cálcio (ionomicina 10 μ M) foi igual nos grupos controle e TMG (1920 ± 699 RFU e 1802 ± 669 RFU, respectivamente; $p = 0,06$; figura 4B). Na análise da sigmoide das curvas representativas das células tratadas com TMG a potência (pEC_{50} ou pD_2) não foi significativamente maior que no grupo controle, mas a eficácia (R_{max}) para o sinal de cálcio foi maior no grupo TMG. Os valores encontrados foram $18,6 \pm 1,5$ RFU no controle e $32,2 \pm 3,0$ RFU no grupo TMG ($p < 0,05$; figura 4C).



25

Figura 5. Mobilização de cálcio citosólico induzida por angiotensina II: (A) Gráfico temporal que representa a área sob a curva de fluorescência (AUC) após aplicação de veículo (solução de Hanks) ou Ang II a 100 nM. (B) Capacidade máxima do sistema em internalizar cálcio estimulada pelo ionóforo de cálcio ionomicina (10 μ M) em células tratadas com TMG (azul) ou veículo (branco) e (C) gráfico das curvas concentração-resposta, não cumulativas para Ang II realizadas em células controle (círculos pretos) ou tratadas previamente com TMG (quadros azuis), sendo que cada ponto desta sigmoide representa o valor de área sob a curva de cada concentração de Ang II aplicada. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Os valores de pEC_{50} e R_{max} foram obtidos na sigmoide, usando a equação de Hill-Langmuir com análise de 3 parâmetros. (*) $p < 0,05$; teste t de Student; $n = 8$ experimentos independentes.

Como controle do protocolo, células não-transfectadas com o AT1R e estimuladas com Ang II ou células HEK-AT1 estimuladas por TRV027 não apresentaram sinal de fluorescência (dados não mostrados).

5.4 A fosforilação de ERK 1 e 2 se mantém aumentada em células tratadas com um inibidor da ativação da proteína G

Após tratar as células HEK-AT1 com TMG, um outro conjunto de experimentos foi realizado. Desta vez foi usado 1 μ M do inibidor de $G_{\alpha q}$, YM-258490, por 30 min. Em seguida, ativou-se o AT1R com Ang II (100 nM). Como esperado, o disparo inicial da fosforilação de ERK foi mais sutil. Outrossim, a magnitude da fosforilação se manteve maior em células tratadas

com TMG, sendo a diferença máxima ocorrida no tempo de 5 min, $1,21 \pm 0,20$ UA para o controle e $2,57 \pm 0,49$ UA ($p < 0,05$; $n = 4$) para o grupo tratado com TMG (figura 5).

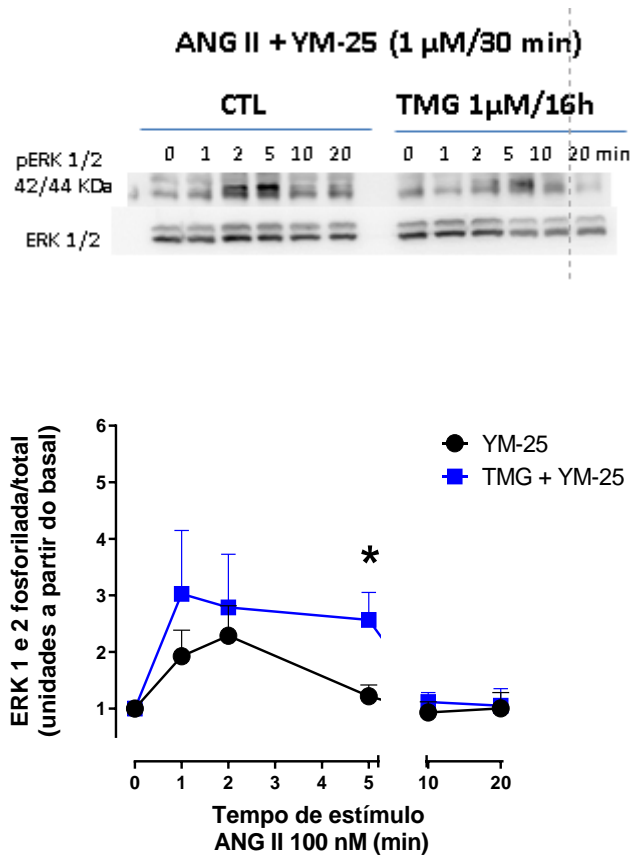


Figura 6. Imagem de imunoblot (superior) e gráfico tempo-efeito (inferior) da cinética de fosforilação de ERK 1 e 2 em células tratadas com TMG (1 μ M, 16-18 h) (quadros azuis) ou veículo (círculos pretos), mantidas por 30 minutos na presença de YM-254890 e posteriormente estimuladas por 100 nM de angiotensina II. (*) $p < 0,05$; teste *t* de Student. $n = 4$ experimentos independentes.

5.5 A densidade de AT1R em células HEK293T permaneceu constante com o aumento de proteínas O-gluconaciladas

O rastreamento usando a relação antígeno-anticorpo das sequências FLAG extracelulares no AT1R nas células HEK293T mostrou valores iguais tanto para células não-tratadas quanto para as tratadas com TMG. Usou-se a razão do sinal de FLAG (marcador do AT1R) por sinal de DAPI (marcador de núcleos celulares) e a média foi de $11 \pm 0,6$ UA no controle e $12 \pm 0,7$ UA no grupo TMG ($p = 0,7$; $n = 3$).

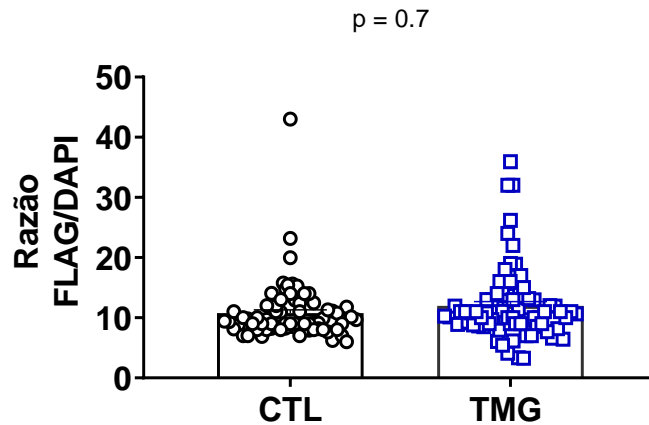


Figura 7. Gráfico de barras expressando a razão entre o sinal de quimiluminescência que quantifica o anticorpo anti-FLAG e a fluorescência característica de material nuclear de células pela incorporação de 4-6-diamidino-2-fenilindil (DAPI) em unidades arbitrárias ($p = 0,07$; teste de Wilcoxon). $n = 3$ experimentos independentes.

5.5 A cinética de internalização do AT1R se manteve igual em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas

Nas células HEK293T, desta vez transfectadas transientemente com plasmídeos codificadores dos sensores de bioluminescência AT1 (Rluc II) + kRAS (GFP) e estimuladas com os agonistas do AT1R (Ang II e TRV027), foi determinada a razão entre a variação do sinal de bioluminescência (Δ BRET2) pelo tempo após os estímulos. Assim, após 25 min (1550 segundos) a variação do sinal característico de internalização do receptor induzido por Ang II ou TRV027 (100 nM) foi semelhante nestes dois grupos; sendo $-0,51 \pm 0,05$ (Ang II) e $-0,6 \pm 0,06$ (TRV027) e se manteve igual em células tratadas com TMG (respectivamente, $-0,52 \pm 0,02$ e $-0,58 \pm 0,05$).

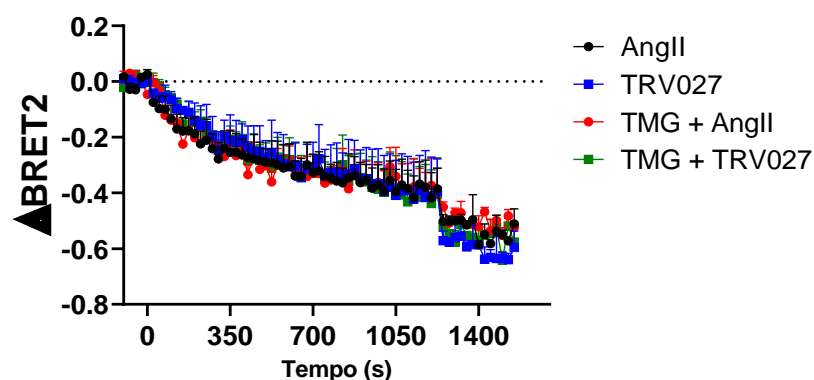


Figura 8. Gráfico temporal do sinal de bioluminescência de internalização do AT1R pelos dois ligantes: Ang II (círculos) ou TRV027 (quadrados) na condição controle ou após tratamento com TMG (círculos azuis para angiotensina II e quadrados verdes para TRV027). Os agonistas foram introduzidos no tempo 0 s. A redução dos valores representa o afastamento do AT1R-Rluc II do sensor de membrana k-RAS-rGFP N = 3 experimentos independentes, $p > 0,05$.

5.6 O recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 pelo AT1R não foi modificado pelo aumento de O-GlcNAc

Conforme descrito na seção dos métodos contendo protocolos para sensores bioluminescentes, este conjunto de experimentos destinou-se a investigar se o aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc direcionava a seletividade funcional de sinalização do AT1R, alterando o recrutamento das duas arrestinas principais desta via. Como observado (figura 8), a Ang II foi mais potente e mais eficaz que o TRV027 para o recrutamento de beta-arrestina 1 e de beta-arrestina 2. O tratamento das células com TMG para elevar o conteúdo de O-GlcNAc não modificou nem a eficácia nem a potência de recrutamento de beta arrestina 1/2 para a Ang II ou para o TRV027.

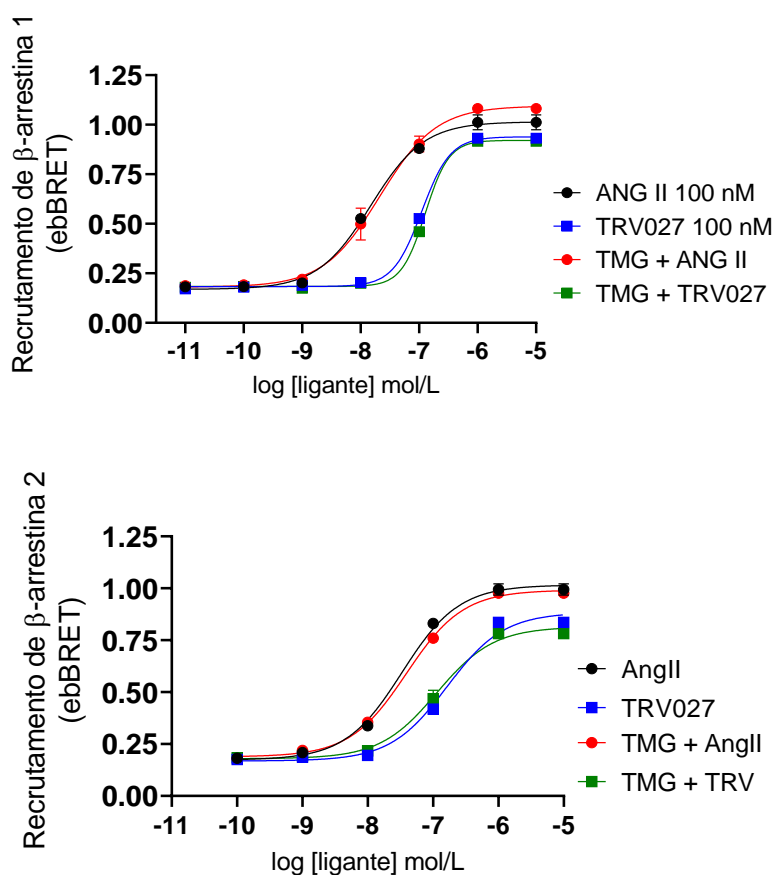


Figura 9. Recrutamento de beta-arrestina pelo AT1R ativado em células HEK293T que foram tratadas com thiamet G (TMG) ou veículo e estimuladas por 15 minutos com diferentes concentrações de angiotensina II (Ang II) ou do agonista tendencioso para recrutamento de beta-arrestina, TRV027 (TRV). Razões de BRET para beta-arrestina 1 (superior) ou para beta-arrestina 2 (inferior). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. O aumento da razão de BRET significa afastamento dos biossensores (de membrana e de beta-arrestina): $n = 3$ experimentos independentes.

5.8 A ativação da proteína quinase C (PKC) pelo AT1R não foi modificada pelo aumento de O-GlcNAc

Inicialmente, as células HEK293T transfectadas com o sensor de BRET para PKC, tratadas com veículo ou TMG (1 μ M por 16-18 h) foram estimuladas com Ang II ou TRV027 (100 nM). Então, as placas foram monitoradas por 20 min para investigar a ativação temporal de PKC conforme previamente descrito.

O que foi observado na cinética temporal é que a Ang II foi mais eficaz na ativação de PKC que o TRV02 (64,3 \pm 0,86 UA e 10,1 \pm 0,7 UA, respectivamente; $n = 3$) e não houve

diferença significativa após o tratamento com TMG seja para Ang II ($50,13 \pm 0,19$ UA) ou para o TRV027 ($7,0 \pm 0,49$ UA; figura 9A).

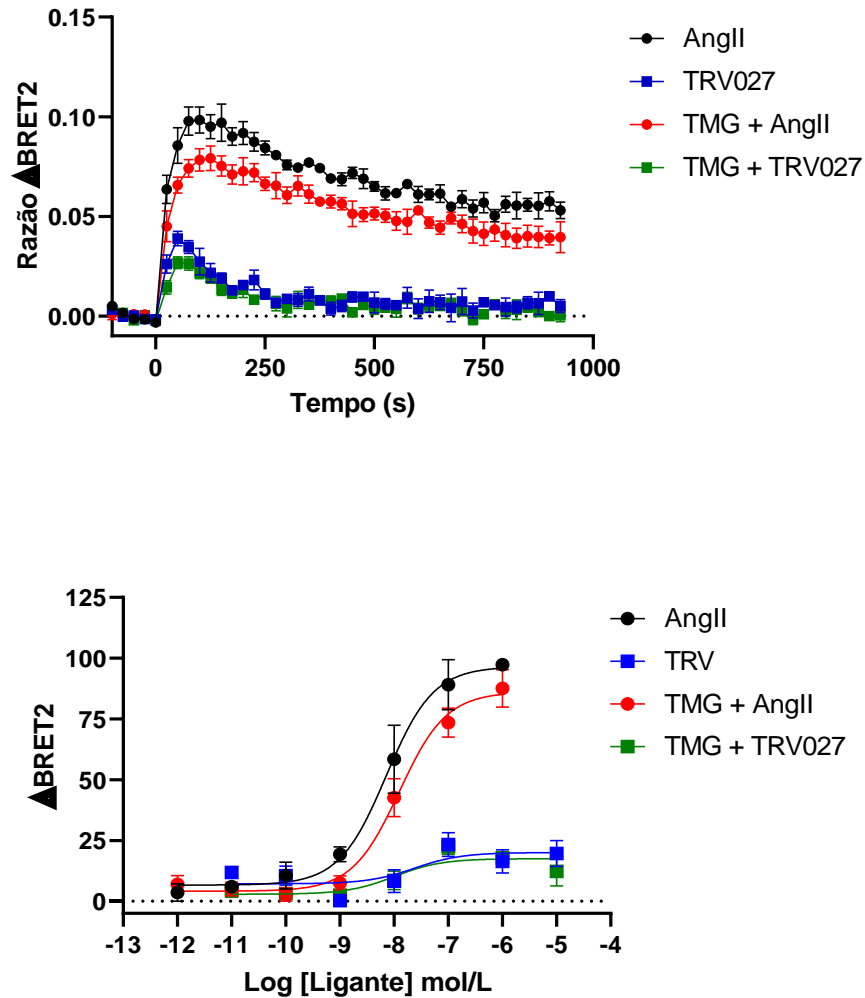


Figura 10. Ativação de proteína quinase C (PKC) decorrente da ativação do AT1R em células HEK293T que foram tratadas com thiamet G (TMG) ou veículo e estimuladas por 15 min com diferentes concentrações de angiotensina II (Ang II) ou do agonista para recrutamento de beta-arrestina, TRV027 (TRV). Razões de BRET cinético (superior) ou dependente de concentração (inferior). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. O aumento da razão de BRET (Δ BRET2) significa a ativação da proteína recombinante GFP-PKC-c1b-Rluc pelo DAG formado após a ativação do AT1R: $n = 3$ experimentos independentes.

5.7 Caracterização do modelo de aumento espontâneo de proteínas O-gluconaciladas

Comparando os camundongos heterozigotos (db/+) e os homozigotos (db/db) foi observado aumento da massa corporal ($27 \pm 0,8$ g e $55 \pm 0,8$ g, respectivamente; $p < 0,05$, $n =$

17) e aumento da glicemia no sangue da cauda no momento da eutanásia (174 ± 6 mg/dL e 244 ± 12 mg/dL; $p < 0,05$, $n = 17$). O extrato proteico destas artérias também mostrou que o conteúdo de proteínas modificadas por O-GlcNAc nos animais db/db é maior ($3,06 \pm 0,5$; $p < 0,05$; $N = 4$) que nos animais db/+ ($2,24 \pm 0,4$; figura 10).

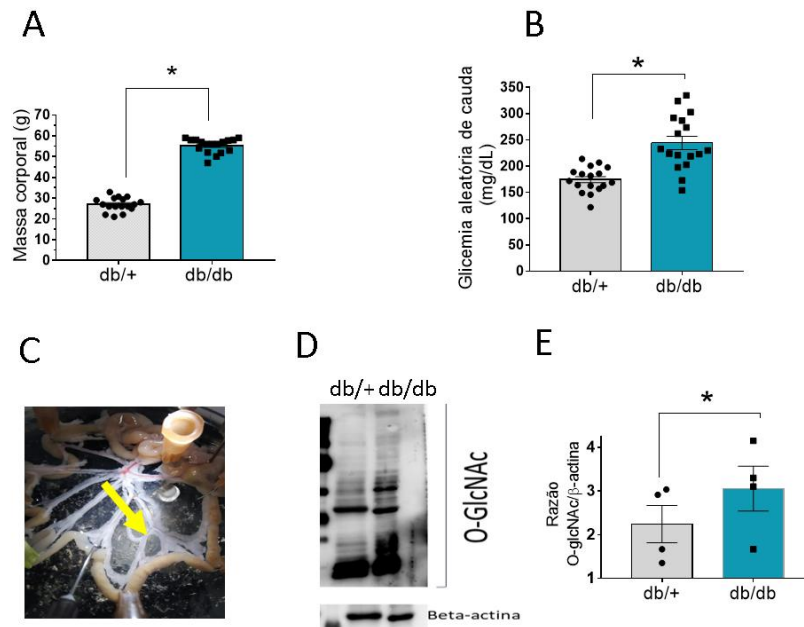


Figura 11. Caracterização do modelo animal de aumento de proteínas O-gluconaciladas. (A) quantificação da massa corporal e (B) da **glicemia** de cauda imediatamente anterior a eutanásia. (C) Imagem do leito mesentérico exposto em uma placa de Petri para dissecção no microscópio estereotáxico, (D e E) conteúdo de proteínas modificadas por O-GlcNAc nestas artérias, medidas por imunoblot (*) $p < 0,05$; teste t de Student, $n = 4-17$ animais.

Inicialmente, a resposta contrátil dos segmentos arteriais foi testada usando cloreto de potássio (KCl 30-120 mM) como agente despolarizante e o platô da resposta máxima ocorreu para a concentração de 90 mM, sendo semelhantes para as artérias dos animais db/+ $1,84 \pm 0,36$ mN e para as artérias de db/db $1,62 \pm 0,42$ mN ($p > 0,05$, $n = 8-10$).

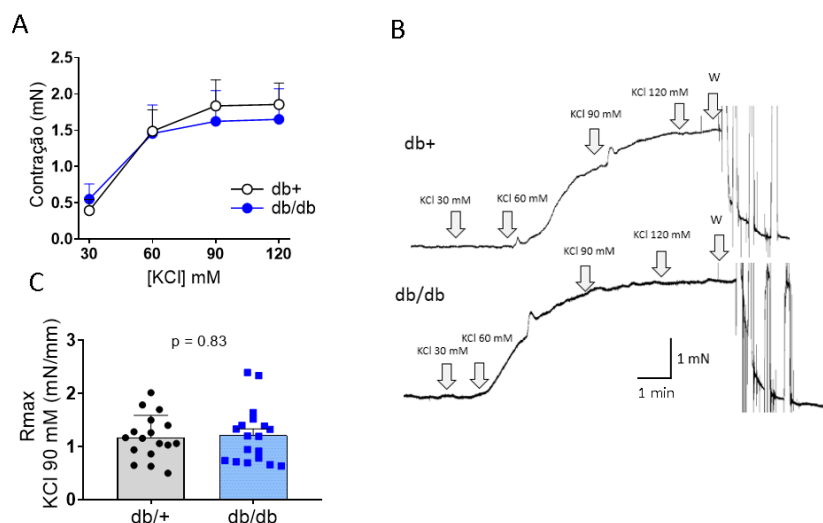


Figura 12. Capacidade contrátil de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de animais heterozigotos (*db/+*) e homozigotos (*db/db*), submetidas a despolarização produzida por concentrações cumulativas de cloreto de potássio (KCl). (A) gráfico concentração-resposta, (B) registros representativos e (C) razão entre a tensão produzida por cada anel de artéria mesentérica no platô (KCl 90 mM) e o comprimento longitudinal da artéria montada na preparação (miliNewtons/milímetro). Teste *t* de Student, $p > 0,05$; $n = 8$ experimentos independentes.

Após este protocolo, e obedecendo o critério de inclusão no estudo (contração maior que 1 mN/mm para KCl 90 mM), os anéis de artérias mesentéricas foram testados com um tônus promovido por fenilefrina (1 μ M), seguido de relaxamento para acetilcolina (10 μ M). Após lavagens e uma nova estabilização da preparação por 20 min, foram realizadas estimulações com Ang II. As curvas cumulativas concentração-resposta demonstraram maior eficácia (Rmax) para Ang II em artérias de animais *db/db* ($2,0 \pm 0,2$ mN/mm) em comparação a artérias dos animais *db/+* ($1,25 \pm 1,0$ mN/mm). A potência (pEC_{50}) não foi diferente entre os dois grupos ($8,0 \pm 0,2$).

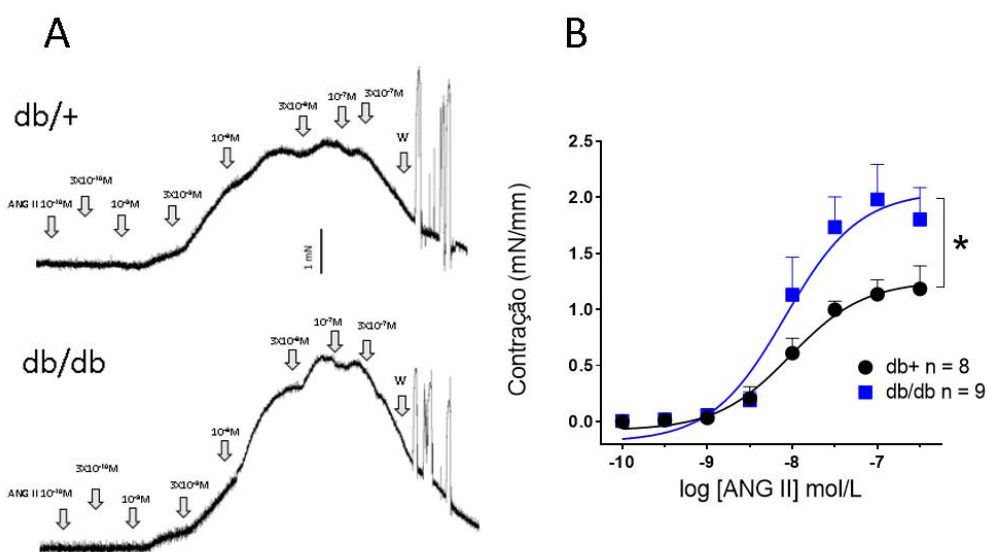


Figura 13. Registros representativos de curvas cumulativas concentração-resposta para angiotensina II em (A) artérias mesentéricas isoladas de animais db/+ (superior) ou db/db (inferior) e (B) gráfico expressando a eficácia da angiotensina II de acordo com os registros. (*) $p < 0,05$; teste t de Student; $n = 8-9$ experimentos independentes.

5.8 O recrutamento de beta-arrestina pelo TRV027 reduziu a resposta para Ang II em magnitude igual nos animais db/+ e db/db

Conforme explicitado anteriormente, a estratégia para reduzir a participação da beta-arrestina na ativação do AT1R foi introduzir 1 nM de TRV027 nas preparações de anéis de artéria mesentérica por 15 min. Como esperado, não houve mudança no tônus. Então, as preparações foram lavadas uma vez e após 5 min as curvas cumulativas concentração-resposta para Ang II foram produzidas.

Reproduzindo o fenômeno observado previamente e descrito na seção anterior, curvas cumulativas concentração-resposta para Ang II após lavagem (wo) se mostraram com aumento de eficácia nas artérias mesentéricas de animais db/db, sem aumento significativo da pEC_{50} . Conforme esperado, após primar as artérias com TRV027 (1 nM por 15 min), o R_{max} para Ang II diminuiu tanto nas artérias dos animais db/+ (respectivamente de $1,53 \pm 0,11$ mN/mm para $0,79 \pm 0,11$ mN/mm; $p < 0,05$; $n = 7$) quanto nas artérias dos animais db/db (de $1,8 \pm 0,19$ mN/mm para $0,77 \pm 0,28$ mN/mm; $p < 0,05$; $n = 7$; figura 13).

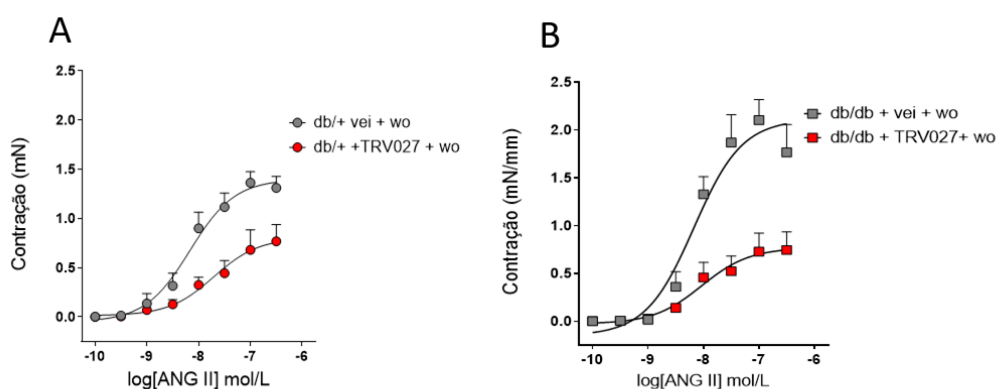


Figura 14. Contratilidade para angiotensina II após tratamento *in situ* das preparações com veículo ou TRV027 (1 μ M, 15 min) para recrutar a beta-arrestina 1/2 seguida de uma lavagem da preparação (washout - wo). (A) Gráfico das curvas cumulativas concentração-resposta em artérias isoladas de animais db/+ ou (B) de animais db/db; n = 7 animais.

Outro fato observado neste caso foi que a pEC_{50} da Ang II não caiu de forma significativa após o tratamento com TRV027 nas artérias de animais controle db/+ ou db/db, como descrito na tabela 2.

	db/+ + wo	db/db + wo	db/+ + TRV027 + wo	db/db + TRV027 + wo
Rmax (mN/mm)	1,4 \pm 0,08	2,12 \pm 0,15*	0,80 \pm 0,11	0,77 \pm 0,28
pEC_{50}	8,2 \pm 0,14	8,2 \pm 0,15	7,7 \pm 0,10*	8,0 \pm 0,20

Tabela 2. Parâmetros farmacológicos de eficácia (Rmax) e potência (pEC_{50}) extraídos das curvas concentração-resposta para angiotensina II após uma lavagem da preparação, seja na condição controle (wo = washout) ou após tratamento *in situ* com TRV027 por 15 minutos seguido de uma lavagem (TRV027 + wo) em segmentos de artérias mesentéricas de animais db/+ e db/db. Os valores expressos correspondem à média \pm erro padrão da média de resposta máxima em miliNewtons por milímetro de artéria (Rmax mN/mm) ou da pEC_{50} e analisadas pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey (*) $p < 0,05$; n = 7 experimentos independentes.

5.9 A dessensibilização da resposta contrátil para Ang II é maior em artérias de animais db/db, mas a resposta taquifilática é semelhante

Após estimular as preparações com Ang II na concentração necessária para alcançar a R_{max} (100 nM) observou-se uma contração tônica e, a partir desta resposta, foi contabilizado o tempo de decaimento. Em artérias dos animais controle (db/+) o tempo necessário para decaimento do R_{max} em 50% ($T_{1/2}$) foi de 139 ± 19 s e em artérias de animais db/db, mesmo com a maior contração (como demonstrado anteriormente nas curvas cumulativas), a perda de contratilidade foi mais rápida: 74 ± 12 s ($p < 0,05$; $n = 6$).

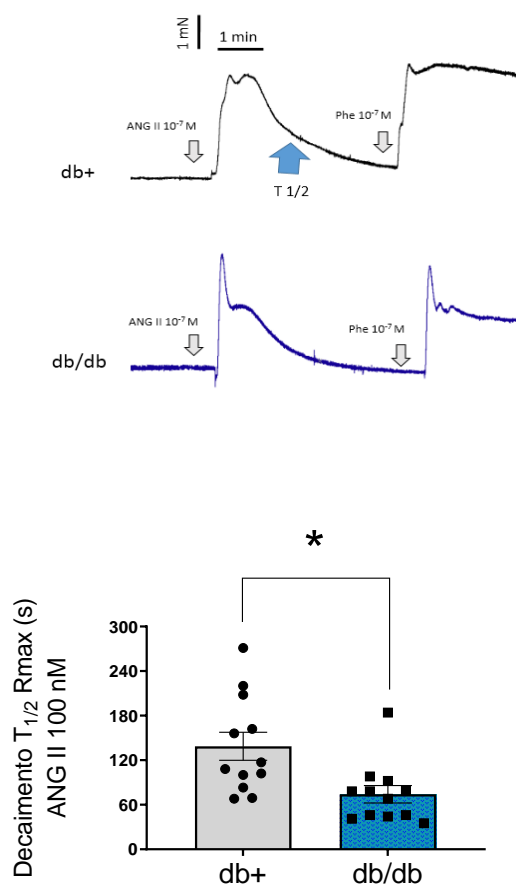


Figura 15. Dessensibilização de resposta contrátil para angiotensina II. Registro representativo do protocolo (superior) demonstrando o estímulo (Ang II), a resposta máxima (R_{max}) e o ponto representativo do decaimento médio da resposta contrátil (T_{1/2}). A viabilidade da preparação dessensibilizada foi testada acrescentando a mesma concentração de fenilefrina (100 nM). Representação gráfica (inferior) do valor de T_{1/2} para artérias dos animais db/+ e db/db. Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média do tempo de decaimento da resposta máxima (T_{1/2} R_{max}) em segundos (s). (*) $p < 0,05$; teste *t* de Student; $n = 6$ experimentos independentes.

O protocolo de taquifilaxia foi adaptado de trabalho publicado por Paiva e colaboradores (PAIVA et al., 1976). Foi explorada a perda de resposta contrátil decorrente de sucessivos estímulos com Ang II em uma concentração próxima a metade da R_{max} obtida nas curvas cumulativas (EC₅₀ na ordem de 10 nM). Neste caso, foi observada redução de resposta máxima (relativa ao primeiro estímulo) nas artérias mesentéricas de animais db/+ e db/db. Como apresentado na figura 15, as artérias dos animais db/+ e db/db demonstraram uma importante perda de resposta para Ang II a partir do segundo estímulo.

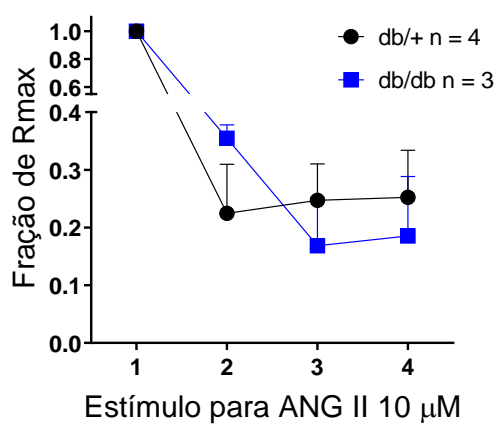
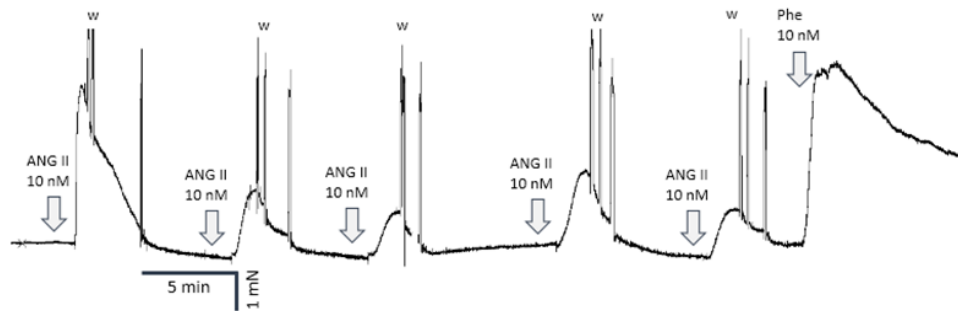


Figura 16. Resposta taquifilática para angiotensina II (Ang II) em artérias mesentéricas de animais db/+ e db/db. Registro representativo (superior) do protocolo com 5 estímulos sequenciais de Ang II e um para fenilefrina, para testar a viabilidade da preparação e representação gráfica (inferior) da fração de resposta máxima (Rmax) em relação ao primeiro estímulo (1,0). (w) = lavagem da preparação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média; n = 3-4 experimentos independentes.

5.10 Experimentos funcionais usando inibidores de quinases que participam da contratilidade induzida por Ang II

Foram usados dois inibidores de quinases objetivando aferir a participação da ERK 1/2 fosforilada e da PKC no aumento de eficácia da Ang II nas artérias dos animais db/db em relação as artérias dos db/+. Inicialmente, usou-se o inibidor de fosforilação de ERK, que na verdade atua inibindo a ação enzimática da MEK1 e MEK2, que são as quinases ativadoras da ERK 1 e 2, o PD98059 (KITOS; CHOI; CORNELL, 2006; FAHRENHOLZ et al., 2009; GIACHINI et al., 2010) a 10 μ M por 1 h antes de produzir a contração para Ang II. Em um outro conjunto de experimentos, o RO-31 8220 (BELTMAN; MCCORMICK; COOK, 1996; AMOBI; SUGDEN; SMITH, 1999) a 1 μ M por 30 min foi usado para inibir a PKC.

O resultado foi que, ao se comparar com as artérias tratadas com veículo, a inibição da fosforilação de ERK 1 e 2 não aumentou a contratilidade para Ang II em animais db/+ (figura 17, tabela 3) de $0,95 \pm 0,1$ mN/mm para $1,36 \pm 0,1$ mN/mm (respectivamente, veículo e PD98057; $p > 0,05$; $n = 4$) e manteve a eficácia da Ang II nas artérias de animais db/db maior que nas artérias dos animais db/+, sendo $1,6 \pm 0,1$ mN/mm no grupo db/db +veículo e $1,8 \pm 0,30$ no grupo db/db + PD98057 ($P < 0,05$; $n = 4$).

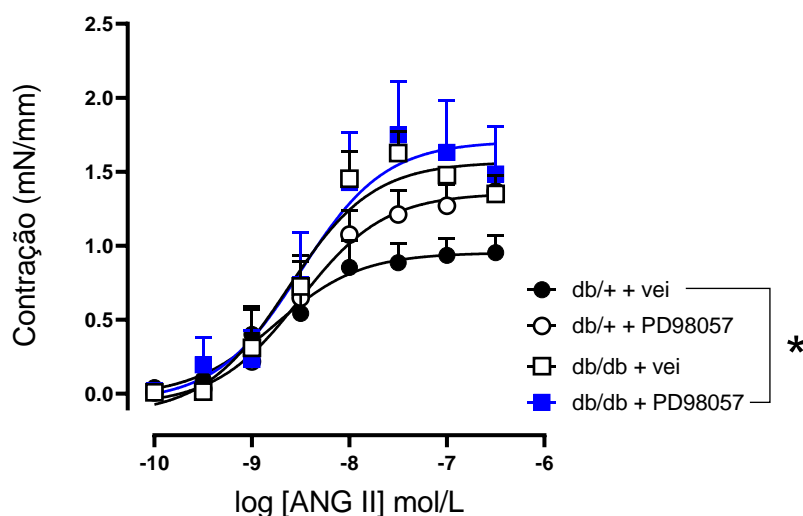


Figura 17. Gráfico de reatividade vascular para angiotensina II em animais db/+ e db/db. Participação da fosforilação de ERK 1/2 usando 10 μ M do inibidor PD98059. As comparações foram feitas entre db/db veículo e db/db tratado in situ pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($p > 0,05$), $n = 4$ experimentos independentes.

	db/+ + veí	db/db + veí	db/+ + PD98057	db/db + PD98057
Rmax (mN/mm)	0,95 \pm 0,11	1,6 \pm 0,15	1,36 \pm 0,12	1,75 \pm 0,30*
pEC ₅₀	8,7 \pm 1,3	8,6 \pm 0,6	8,5 \pm 0,70	8,5 \pm 0,1,1

Tabela 3. Descrição dos valores de eficácia (Rmax) e potência (pEC₅₀) da angiotensina II (Ang II) em artérias mesentéricas de camundongos db/+ e db/db previamente tratadas com veículo (veí; DMSO 0,001%) ou com 10 μ M do inibidor de fosforilação de ERK 1/2, PD98057. (*) $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, $n = 4$ experimentos independentes.

Desta vez, usando o inibidor da PKC (figura 18) não foi observada alteração na eficácia da Ang II nas artérias isoladas dos animais controle (db/+), sendo o Rmax igual a 1,0 \pm 0,1 mN/mm (veículo) e 1,0 \pm 0,2 mN/mm nas artérias tratadas com RO-31 8220 ($P > 0,05$; $n = 4$). Do mesmo modo, foi observado nas artérias dos animais db/db tratados com veículo o Rmax igual a 1,9 \pm 0,2 mN/mm ($p < 0,05$; tabela 4) e nas artérias de db/db tratadas com RO-31 8220 o valor de 1,34 \pm 0,4 mN/mm ($p > 0,05$; $n = 4$).

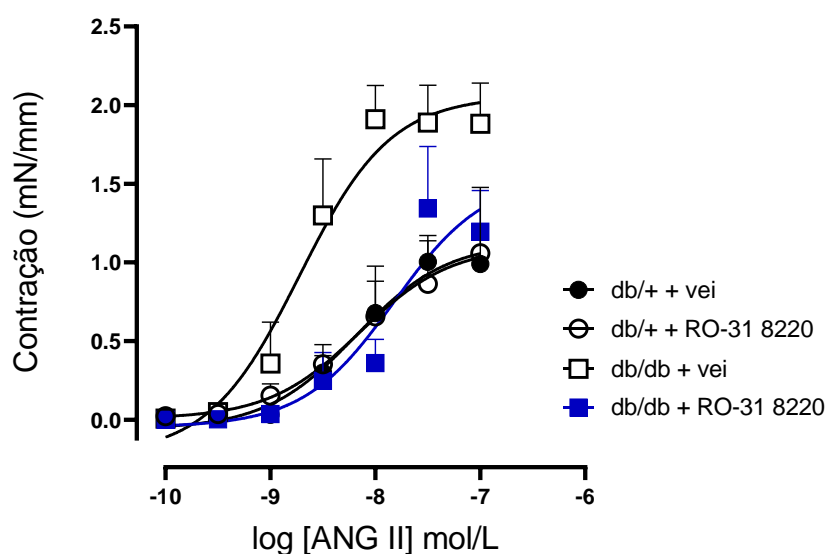


Figura 18. Participação da proteína quinase do tipo C (PKC) na eficácia da angiotensina II (Ang II) em artéria mesentérica de camundongos db/+ e db/db. Preparações tratadas *in situ* com 1 μ M de RO-31 8220. As comparações foram feitas pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 4$ experimentos independentes.

	db/+ + veí	db/db + veí	db/+ + RO-31 8220	db/db + RO-31 8220
Rmax (mN/mm)	1,4 \pm 0,08	2,12 \pm 0,15*	0,80 \pm 0,11	0,77 \pm 0,28
pEC_{50}	8,7 \pm 0,9	8,2 \pm 0,7	8,1 \pm 1,9	7,8 \pm 1,1

Tabela 4. Descrição dos valores de eficácia (Rmax) e potência (pEC_{50}) da angiotensina II (Ang II) em artérias mesentéricas de camundongos db/+ e db/db previamente tratadas com veículo (veí; DMSO 0,001%) ou com 1 μ M do inibidor da proteína quinase do tipo C (PKC), RO-31 8220. (*) $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, $n = 4$ experimentos independentes.

5.11 O quelante de cálcio intracelular reduziu a contratilidade de artérias de animais db/db

Para investigar a participação da $[Ca^{++}]_i$ no aumento de resposta contrátil para Ang II, foram realizados experimentos primando as preparações de artéria mesentérica com BAPTA-AM (10 μ M por 30 min), um quelante de íons cálcio permeável à membrana plasmática e dependente da ação de esterases citoplasmáticas. Após este tratamento, foram produzidas

curvas cumulativas concentração-resposta para Ang II (figura 17). Neste caso, foi observado que a R_{max} para Ang II foi reduzida apenas no grupo db/db, que passou de $1,70 \pm 0,3$ mN/mm (veículo) para $0,82 \pm 0,1$ mN/mm nas artérias primadas com BAPTA-AM ($p < 0,05$; $n = 4$). Os valores de pEC_{50} se mantiveram iguais nas artérias de animais db/+ e db/db (8,2 e 8,1, respectivamente).

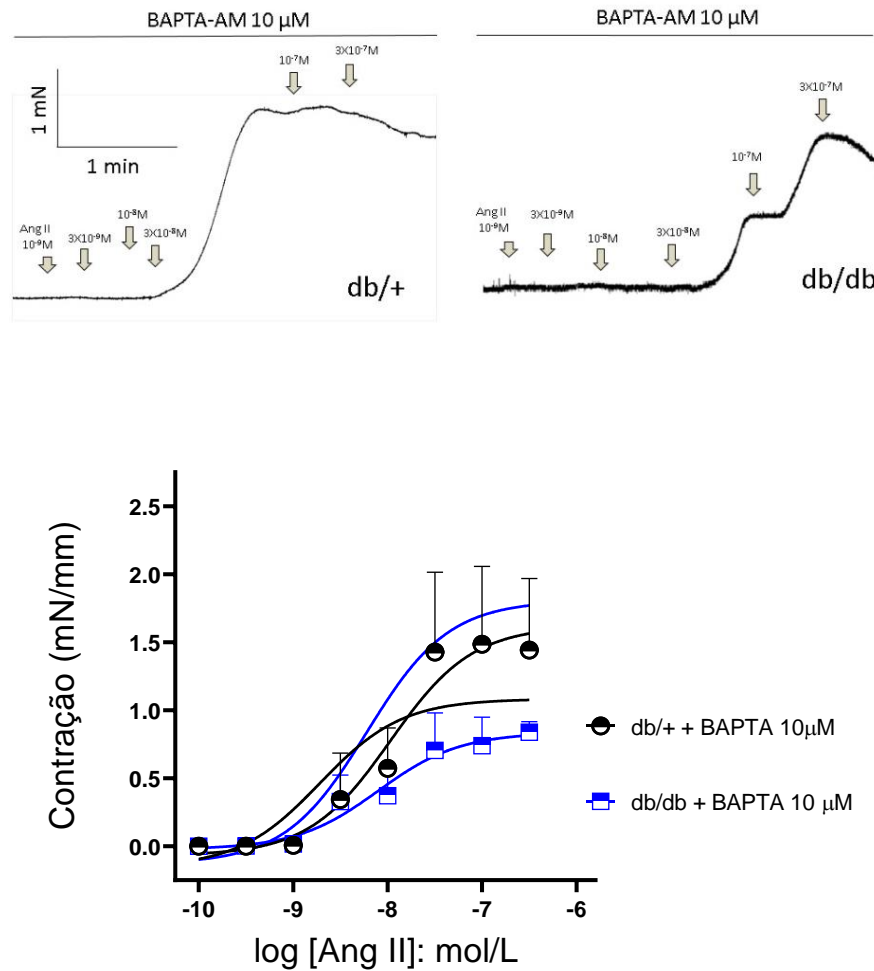


Figura 19. Curvas cumulativas concentração-resposta para angiotensina II (Ang II) na presença de BAPTA-AM ($10 \mu M$) ou veículo em artérias mesentéricas de camundongos db/+ e db/db. Registro representativo (superior) da contração de artérias de animais db/+ (esquerda) e db/db (direita), na presença deste quelante de cálcio citoplasmático e gráfico (inferior) expressando a média \pm erro padrão da média das contrações produzidas por Ang II em preparações tratadas com veículo ou BAPTA. ($P < 0,05$; $N = 4$).

6 DISCUSSÃO

6.1 A fosforilação promovida pelo AT1R é potencializada pelo aumento global de O-gluconacilação de proteínas intracelulares

O entendimento das repercussões decorrentes do aumento da O-gluconacilação de proteínas nos processos de sinalização celular é um tema emergente porque guarda relação com a fisiopatologia e o tratamento farmacológico de diversas doenças, principalmente hipertensão, *diabetes*, *Alzheimer* e inflamação (ZHU; HART, 2021). Então, como os GPCRs são estruturas bioquímicas capazes de regular diversas funções fisiológicas, principalmente no sistema cardiovascular, (CALEBIRO et al., 2020) uma relação entre os mecanismos de transdução de sinal do AT1R ativado em meio a alterações pós-traducionais de O-gluconacilação de proteínas traz informações relevantes sobre a eficácia de fármacos que atuam nestas condições ou, a elegibilidade de estratégias terapêuticas.

Tendo em mãos o conjunto de dados aqui apresentados, pode-se afirmar que há uma relação funcional entre o conteúdo aumentado de proteínas modificadas por O-GlcNAc e a sinalização promovida pelo AT1R, cujos principais fenômenos são o aumento da eficácia de dois agonistas deste receptor: Ang II e TRV027 para a ativação das quinases ERK 1 e 2 e o aumento da geração do principal mensageiro secundário da via do AT1R, o Ca^{++} . Todavia, outros fenômenos esperados não se comprovaram, como as alterações que resultariam em redução de fosforilação, mudanças nos padrões de recrutamento de beta-arrestina ou na cinética de dessensibilização do AT1R.

Inicialmente, construímos uma curva tempo-efeito de fosforilação de ERK para inferir o perfil temporal de sinalização do AT1R (AHN et al., 2004b; KITOS; CHOI; CORNELL, 2006), a fim de se obter uma visão geral acerca de efeitos fisiológicos relacionados ao AT1R, porque a ERK 1/2 fosforilada se relaciona com respostas metabólicas, genômicas (JANKNECHT et al., 1993) e contráteis do músculo liso de artérias (EPSTEIN et al., 1997; TOUYZ et al., 2018), dentre outros sinais gerados pelo AT1R (WIMMER; BACCARINI, 2010; BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014) incluindo a participação das proteínas G ou beta-arrestina na transdução de sinal intracelular (TOHGO et al., 2002; WEI et al., 2003; LUTTRELL et al., 2019). Porém, os nossos

primeiros experimentos contrariaram o que se imaginava, *à priori*. Considerava-se até então a lógica estequiométrica na qual o aumento de proteínas O-gluconaciladas diminuiria a magnitude de fosforilação da ERK 1/2 porque a molécula de N-acetil-glucosamina ocuparia resíduos de serina e treonina de diversas proteínas sinalizadoras, inclusive da ERK 1/2, reduzindo assim a eficiência catalítica das quinases que fosforilam a ERK 1/2 (MEK 1/2, PKC), conforme postulado por Hart e colaboradores (HOLT; HART, 1986; HOLT et al., 1987; WANG; GUCEK; HART, 2008; HART et al., 2011), reduzindo a eficácia da Ang II e do TRV027. Portanto, paradoxalmente, o contrário também tem sido observado por diversos laboratórios, isto é, há sistemas biológicos nos quais a O-gluconacilação pode não interferir negativamente na fosforilação ou, até mesmo, potencializar o processo catalítico de quinases (WANG; GUCEK; HART, 2008; LENEY et al., 2017). O que observamos neste estudo parece estar relacionado à aumento na exposição molecular de proteínas para ação de quinases, alterações no tráfego ou na capacidade catalítica destas enzimas, superativação de fosfatases, redução em mecanismos contra-regulatórios ou aumento do conteúdo de moléculas que contribuem com a sinalização intracelular como a $[Ca^{++}]_i$, o ATP e seus derivados.

Outra observação interessante é que o tratamento com TMG não alterou a razão entre o sinal de imunoblot da ERK fosforilada pela ERK total, previamente aos estímulos com os agonistas Ang II ou TRV027, permitindo compreender que a resposta alterada se observa na cascata de sinalização celular e não em uma condição basal. Pelo contrário, o grupo da Dra. Nishihara (Tokio) encontrou aumento de fosforilação de ERK em células tronco embrionárias murinas após deleção gênica transiente da OGT e consequente redução do conteúdo de proteínas O-gluconaciladas. Neste caso específico, além destas células embrionárias serem metabolicamente mais ativas que outros tipos celulares como a HEK293T ou células de músculo liso, a estratégia de reduzir ou aumentar (no nosso caso) o conteúdo global de O-GlcNAc não demonstrará fenômenos antagônicos para cada condição.

Do ponto de vista mecanístico, uma MAP quinase como a ERK 1/2 é ativada por uma sequência de interações proteína-proteína (PEARSON et al., 2001). No caso, a ERK 1/2 é fosforilada principalmente pela MEK1/2 (JANKNECHT et al., 1993; MURASAWA et al., 1998; CHANG et al., 2003; MOLINA; ADJEI, 2006) e de forma canônica, ativa o fator de transcrição Elk-1 para regular o funcionamento de células via transcrição de RNA mensageiro (MURASAWA et al., 1998) para traduzir proteínas, por exemplo, relacionadas ao

funcionamento neuronal (JANKNECHT et al., 1993), de citoesqueleto (PEARSON et al., 2001), de desenvolvimento embrionário (MIURA et al., 2018) e de patogênese tumoral (CHANG et al., 2003; MOLINA; ADJEI, 2006). Por isso a ERK fosforilada se relaciona a adaptações genômicas promovidas pelo AT1R. Mas outras quinases ativadoras da ERK, como a beta-arrestina (SHENOY et al., 2006) e outras funções da ERK são frequentemente descritas.

Na nossa observação, o aumento da magnitude de fosforilação de ERK em células tratadas com TMG representa uma exacerbação da sinalização do AT1R para gerar fatores adaptativos na célula sob condições de elevada taxa de O-GlcNAc, podendo até reduzir a potência de alguns antagonistas deste receptor; porém estas hipóteses devem ser exploradas em um outro estudo, construindo curvas concentração-efeito na presença de diferentes concentrações dos principais antagonistas do AT1R.

Por outro lado, ao esmiuçar o fenômeno da fosforilação de ERK 1/2 induzida por Ang II, diversos laboratórios observaram o mesmo padrão de resposta, ou seja, um aumento transiente de fosforilação em curso temporal (KITOS; CHOI; CORNELL, 2006). O grupo do Dr. Lefkowitz ao usar RNA de interferência (SiRNA para beta-arrestina) evidenciou que o AT1R ativado pela Ang II, produz uma primeira onda de fosforilação mediada pela proteína G, que ativará a via da RAF/MEK para fosforilar ERK 1/2 (HINES; FLUHARTY; YEE, 2003) e, posteriormente, gera uma segunda sinalização, pela qual a beta-arrestina ativada fosforilaria diretamente a ERK 1/2 (AHN et al., 2004a, 2004b; KIM et al., 2009). Outros trabalhos mostraram também que no signalossoma do AT1R, a beta-arrestina 2 tem maior eficiência catalítica que a beta-arrestina 1 (WEI et al., 2003; AHN et al., 2004b). Isto significa que o sinal de ERK fosforilada por TRV027 parece ser por ação da beta-arrestina 2, que é a isoforma mais propensa a formar o endossomo de internalização abaixo do AT1R ativado.

A maneira de inferir a sinalização promovida pelo AT1R quantificando a eficácia catalítica tem sido extensamente empregada. Murasawa e colaboradores mediram incorporação de fosfato radioativo na ERK em fibroblastos isolados de ratos neonatos estimulados por Ang II em análise tempo-efeito (MURASAWA et al., 1998). Observou-se então padrão de resposta parecido ao observado nos ensaios por imunoblot, ou seja, uma fosforilação inicial maior, uma redução transitória deste sinal seguida de uma manutenção em nível mais baixo até a minimização da razão ERK fosforilada/ERK total. Isso indica que este perfil de resposta é uma característica da ERK. Curiosamente, a ERK fosforilada pela beta-

arrestina, que é o sinal mais tardiamente observado no gráfico da cinética de fosforilação por *western blotting*, parece não ativar o fator transcricional EKL, provavelmente tendo preferências para ativações não-canônicas de proteínas no citosol (TOHGO et al., 2002). Então, se comparássemos os resultados dos experimentos ativando o AT1R com a Ang II e com o TRV027 seria possível explorar esses dois aspectos da sinalização, isto é, a ativação transcricional ou não-transcricional da ERK sob a condição de aumento de proteínas O-gluconaciladas. Outrossim, nas condições experimentais aqui empregadas, as diferentes maneiras de ativação do AT1R, usando a ANG II ou o TRV027, geraram uma imediata fosforilação de ERK 1/2 com fosforilação magnificada em células tratadas com TMG. Até aqui tem-se apenas um indício de que as vias de sinalização do AT1R estão potencializadas pelo O-GlcNAc, não podendo-se ainda desvendar se este resultado é proveniente da exacerbação da via da proteína $G_{\alpha q/11}$ ou da beta-arrestina 1/2. Ademais, com o aumento do conteúdo de proteínas O-gluconaciladas a transcrição de genes relacionados à ativação de ERK 1/2, que produzem os fenômenos de hipertrofia e hipercontratilidade descritos (PEARSON et al., 2001; IHARA et al., 2009; ROEST et al., 2021) podem também estar magnificados.

6.2 O aumento da eficácia da Ang II para gerar sinalização de cálcio demonstra que várias funções celulares podem ser indiretamente alteradas pelo aumento de O-gluconacilação

Foram produzidos experimentos de quantificação dos transientes de cálcio, de modo concentração-dependente por pelo menos duas razões: a primeira é que o aumento da $[Ca^{++}]_i$ induzida por Ang II é o principal responsável pelo tônus de artérias que, por sua vez, promove aumento da resistência vascular periférica e liberação de hormônios como a aldosterona. Ao mesmo passo, permite inferir a magnitude de sinalização da proteína $G_{\alpha q/11}$ que estaria maior no caso de inibição da beta-arrestina. Porém, mais uma vez observou-se que a eficácia da Ang II para elevar a $[Ca^{++}]_i$ foi maior em células com aumento de proteínas O-gluconaciladas por ação do TMG. A sonda de detecção de cálcio usada, o FLUO 4, tem alta permeabilidade, alcançando zonas mais profundas no citoplasma, mas não permite a quantificação de uma concentração basal de íons cálcio em condição não-estimulada. A este respeito, uma inferência indireta que se pode usar para justificar que esta resposta observada é dependente

da ativação do AT1R é a constatação de que nos dois grupos experimentais (CLT e TMG) o sinal promovido pelo ionóforo de cálcio (ionomicina) ocorreu em magnitude semelhante (figura 4B). Um experimento paralelo foi realizado usando outra sonda de cálcio análoga, o *FLIPR calcium assay-5* (Molecular Devices, dados não mostrados), que emite fluorescência em outro comprimento de onda, e os valores de eficácia aumentados no grupo TMG foram semelhantes aos obtidos com o FLUO-4, indicando que este fenômeno não é um artefato de alteração de sinal por excesso de proteínas O-gluconaciladas.

Ainda neste sentido, outras hipóteses mecanísticas que poderiam, porventura, contribuir com o incremento do sinal de Ca^{++} e de fosforilação pelo AT1R também foram refutadas. Primeiramente pensou-se em um possível aumento no número de mitocôndrias por célula neste aumento de transientes, porque mitocôndrias são reservatórios de cálcio (MEIS et al., 2006; BERS, 2008; PAN et al., 2013) e há um intenso processo de O-gluconacilação em proteínas mitocondriais (HU et al., 2009; NGOH et al., 2011; TRAPANONE et al., 2016). Porém, não houve aumento no sinal característico da sonda de membrana mitocondrial MitoTracker – red (Thermo Fisher M22425, Figura suplementar 1). Depois, considerando que as variações no conteúdo de proteínas modificadas por O-GlcNAc alteram o estado RedOx da célula e que o AT1R (trans) ativa a NADPH-oxidase do tipo 2 (NOX 2) e isso gera produção de radical superóxido que, de acordo com as investigações do laboratório do Dr Lederer, contribui para o processo de mobilização de Ca^{++} do retículo endoplasmático induzido pela Ang II (Zhang et al., 2015), investigou-se, usando a mesma sonda sensível a espécies reativas de oxigênio - o H_2DCFDA , potencial alteração do estado redox. Entretanto, não foi detectado aumento nesta via de sinalização em HEK293T tratadas com TMG (figura suplementar 2).

Então, pela combinação dos três achados principais até aqui: 1) aumento de fosforilação de ERK 1/2 por ação da Ang II, e também 2) por ação do TRV027, e 3) aumento da eficácia da Ang II para mobilizar cálcio em células tratadas com TMG, surgiu a ideia de que poderia haver uma maior quantidade de AT1R na membrana (densidade) de células tratadas com TMG em relação ao controle (não tratado) ou, ainda, que o tráfego de internalização dos AT1R ocorreria com mais lentidão em células com aumento de O-GlcNAc por TMG, aumentando a sinalização do AT1R.

Ainda assim, a amplificação dos efeitos da Ang II após tratamento com TMG nos permite sugerir que os processos deletérios dependentes da via de sinalização do AT1R como

a apoptose induzida por Ang II (WANG et al., 2022) podem estar potencializados em condições de aumento de O-gluconacilação de proteínas.

O laboratório do Dr Chatham (Alabama), usando glucosamina ou pugnac *in situ* para aumentar a O-gluconacilação, tem demonstrado proteção de cardiomiócito isolado de ratos neonatos em modelos de isquemia e reperfusão celular, cujo mecanismo é a redução da fosforilação de ERK 1/2 (FU et al., 2022) e redução da sobrecarga de cálcio (CHAMPATTANACHAI; MARCHASE; CHATHAM, 2008; FU et al., 2022). A este respeito algumas considerações precisam ser feitas. Inicialmente as vias de sinalização em cardiomiócitos neonatos apresentam maior plasticidade que em animais adultos ou em seres humanos, principalmente pela variedade de fatores de transcrição ativados, comparando-se a animais adultos, cujos mecanismos de influxo de cálcio são mais abrangentes e relacionados a elevação de uma concentração basal e dos estoques deste íon. Isso significa que pode haver um aumento da $[Ca^{++}]_i$ no referido modelo experimental que foi rapidamente compensado pelos mecanismos de extrusão presentes no cardiomiócito de neonatos, ao passo que seria interessante a comparação deste fenômeno em animais adultos. Outra possibilidade é o predomínio da participação dos receptores de rianodina na liberação de Ca^{++} provenientes do estoque sarcoplasmático cardíaco, que por sua vez pode ter uma modulação negativa pela O-gluconacilação, ao passo que em células HEK293T e músculo liso arterial a participação do IP3R é mais pronunciada, podendo, neste caso, amplificar a liberação de Ca^{++} no citosol após os estímulos com Ang II ou TRV027 após aumento de O-GlcNAc. No nosso caso, a observação dos resultados obtidos tanto em HEK293T quanto em artérias mesentéricas isoladas de camundongos nos indicou uma análise complementar: o aumento da participação do Ca^{++} como mensageiro secundário é um fenômeno encontrado em células de portadores de diabetes e obesidade (LEVY; ZEMEL; SOWERS, 1989; ALEXIEWICZ et al., 1997) e hipertensão (JELICKS; GUPTA, 1990). Então, considerando que estas são as mesmas condições em que há aumento de O-gluconacilação, pode esta ser a responsável por contribuir com o risco cardiovascular, exacerbando a resposta fisiológica induzida por mediadores que contribuem com a contratilidade de vasos sanguíneos, especialmente a Ang II.

6.3 A densidade de receptores, a cinética de internalização e o recrutamento de beta-arrestina foram os marcadores usados para se investigar a presença do AT1R na membrana da célula

Alterações no tráfego de proteínas da membrana são descritas como potenciais efeitos da modificação por O-GlcNAc (OGAWA et al., 2020). Esta hipótese foi investigada usando duas ferramentas descritas pelo laboratório do Dr. Bouvier (ROCHDI et al., 2010): inicialmente, pelo protocolo de ELISA de ligação do anticorpo anti-FLAG em células inteiras (FLAG é uma *tag* sintetizada junto a cauda N-terminal extracelular dos AT1R recombinantes). Nenhum indício de aumento da densidade destes receptores foi observado. Na mesma perspectiva, não se comprovou uma lentificação no tráfego de internalização destes receptores usando a razão da bioluminescência AT1R-Rluc II/Kras-GFP recombinantes (que media o afastamento do receptor da membrana celular em tempo real). O que se conclui é que seja com montante basal ou elevado de O-GlcNAc em proteínas do citosol, o aumento de sinal observado se dá pela mesma densidade de AT1R na membrana. Sendo assim, as investigações se voltaram para mecanismos intracelulares nas vias de transdução de sinal.

Então, se há uma exacerbação da fosforilação de ERK 1/2 e dos transientes de Ca^{++} induzidos por Ang II após elevação do conteúdo de proteínas O-gluconaciladas, possivelmente haveria uma redução no recrutamento de beta-arrestina pelo AT1R, o que manteria por mais tempo a participação da proteína $G\alpha_q/11$, já que a aproximação da beta-arrestina ao AT1R impede a ação da proteína G (KIM et al., 2009; BONDE et al., 2010; WINGLER et al., 2019). Isso representaria uma preferência de sinalização (seletividade funcional ou *bias*) por uma via distinta de sinalização do GPCR: proteína G ou beta-arrestina, por exemplo. Para essa investigação, lançou-se mão de ferramentas de bioluminescência (BRET) para quantificar de maneira tempo e concentração-resposta o recrutamento de beta-arrestina em condições de alto ou baixo conteúdo de proteínas O-gluconaciladas. Neste caso, como esperado, observou-se para células HEK293T transfectadas com o AT1R, que a eficácia e a potência para Ang II promover recrutamento de beta arrestina são maiores que para o TRV027 mas não houve diferença nestes parâmetros em células tratadas com TMG, o que nos fez concluir que a exacerbação de resposta para Ang II sobre células com aumento de O-GlcNAc não é por indução de uma seletividade funcional de uma via distinta, subsequente à ativação do AT1R.

6.4 A inibição da proteína G α q manteve o aumento da eficácia da Ang II sobre o AT1R

O fato do aumento de O-GlcNAc potencializar os efeitos da Ang II relacionados à fosforilação e mobilização de Ca⁺⁺ reforça a ideia de que há uma contribuição desta modificação pós-traducional no risco cardiovascular em casos de diabetes e hipertensão, como previamente descrito (LIMA et al., 2011, 2014, 2016). Estão, postulou-se que o mediador molecular que poderia estar relacionado ao aumento de resposta do AT1R em condições de aumento de O-GlcNAc estaria na via da proteína G α q, e não na via da beta-arrestina como inicialmente proposto. Então, lançou-se mão do inibidor desta proteína, o YM-254890. Sobre este, a curva tempo-efeito de fosforilação de ERK 1/2 apareceu bem menor em células tratadas com TMG, o que nos faz sugerir que a via da proteína G parece ser o caminho mecanístico para justificar o aumento da resposta em células com aumento global de proteínas O-gluconaciladas. Por outro lado, se for observar toda a curva temporal, o sinal de fosforilação de ERK1/2 ainda assim permaneceu maior com o tratamento com TMG.

A proteína G é uma *transdutora* de sinal. Após ser provocada pelo AT1R ativado, a subunidade alfa fusionada a molécula de GTP desempenha elevado poder catalítico para ativar efetores no citosol. No caso do AT1R, o principal efector é a fosfolipase C (isoformas β 1 e β 4) que hidrolisa o PIP2 em dois outros mensageiros que já foram anteriormente descritos: 1) o IP3, que é penetrante no citosol para alcançar os respectivos receptores (IP3R) nos compartimentos intracelulares, principalmente na membrana do retículo endoplasmático e 2) o DAG que, ao contrário, é pouco solúvel no ambiente intracelular e enriquece os microdomínios citosólicos próximos a membrana, onde GRKs e, principalmente a PKC está posicionada. Neste sentido, os efeitos destes dois mensageiros secundários foram investigados. Inicialmente, os efeitos do IP3 foram indiretamente analisados nos experimentos de mobilização de cálcio anteriormente discutidos. O IP3 retira íons cálcio do retículo endoplasmático das células HEK293T-AT1 que, como descrito, mostrou-se aumentado para Ang II em células com elevado O-GlcNAc indicando que o conteúdo aumentado deste íon nos estoques parece principal contribuinte da amplificação de eficácia observada após o tratamento com TMG.

Paralelamente à sinalização de cálcio liberada por estoques via IP3, outro fenômeno que poderia contribuir com a magnificação de resposta de Ang II em elevada taxa de proteínas

O-gluconaciladas seria um aumento da atividade da PKC tanto na fosforilação de ERK 1 e 2 quanto no aumento dos transientes de cálcio. Por isso, foi realizado o experimento funcional de ativação de PKC β II pelo AT1R usando bioluminescência. Como descrito (NAMKUNG et al., 2018a), o sensor usado, o PKC-c1b se ativa com aumento de DAG no citosol, mas não foi encontrado aumento na sinalização de PKC pelo AT1R ativado em células com elevado O-GlcNAc, direcionando novamente que as repercussões farmacológicas geradas por aumento do conteúdo de proteínas O-gluconaciladas estaria no aumento da [Ca⁺⁺]_i.

6.5 Animais espontaneamente diabéticos apresentam aumento de O-GlcNAc e da eficácia da Ang II

Para reforçar este raciocínio, foram usadas artérias mesentéricas de resistência de animais espontaneamente diabéticos, que é um modelo experimental em que o AT1R é fisiologicamente relevante e há aumento de proteínas modificadas pelo O-GlcNAc. Outros laboratórios utilizam ratos (AKIMOTO et al., 2003, 2019) ou camundongos diabéticos (JIN et al., 2021) como modelo para investigações referentes a O-gluconacilação aumentada de proteínas. No nosso caso, foi detectado que aos 90 dias de vida a hiperglicemia e o aumento de O-gluconacilação de proteínas arteriais estão estabelecidas nos animais db/db, mas não nos respectivos correlatos db/+.

Seguindo o mesmo padrão do que foi observado em células HEK293T tratadas com TMG, e como anteriormente discutido, a eficácia para a Ang II também foi maior nas artérias dos animais db/db, sem uma alteração significativa da pEC_{50} , o que reforçou a ideia de que há um fenômeno intracelular que permite aumento de contratilidade em elevado conteúdo de proteínas O-gluconaciladas. Vale lembrar que a ativação de quinases, mobilização de cálcio e tráfego do receptor – eventos da sinalização em células HEK293T - também são fenômenos que regulam a fisiologia dessas artérias.

Inicialmente foram produzidas despolarizações para gerar contrações usando cloreto de potássio e a contração máxima foi de mesma proporção entre os animais controle (db/+) e os de elevado O-GlcNAc (db/db). Souza-Smith e colaboradores observaram que a relação entre estrutura muscular *versus* lúmen de artérias de animais db/db é maior que nos

respectivos controles heterozigotos (db/+). Então, mesmo com aumento estrutural, a contratilidade permaneceu constante. Paradoxalmente, dados do nosso laboratório (SILVA, 2014) que foram reproduzidos por nós (dados não mostrados), mostraram que para um outro agonista de GPCR, a endotelina, as artérias mesentéricas de animais db/db contraem menos que as dos heterozigotos db/+. Portanto, o aumento de eficácia para Ang II nestas artérias é um fenômeno particular e pode ser atribuído a possíveis fatores no âmbito celular como a maior densidade ou maior tempo de permanência do AT1R nestas artérias ou a potencialização de determinadas vias de transdução de sinal, mas não a uma maquinaria contrátil hiperativa, uma vez que a despolarização gerou contratilidade igual nas artérias dos dois grupos.

A maneira inicial de investigar esta hipótese foi testar a capacidade das artérias mesentéricas de animais db/db em dessensibilizar, recrutar a beta-arrestina e perder capacidade contrátil por taquifilaxia, pela plausibilidade destas funções serem as responsáveis pelo aumento de eficácia observada. Em um momento posterior investigou-se a participação de quinases e de $[Ca^{++}]_i$ no aumento de eficácia para Ang II.

Considerou-se primeiramente que outros laboratórios encontraram em modelos animais de diabetes um conteúdo aumentado de GRK2 (TAGUCHI et al., 2013, 2014; LAI et al., 2020), uma das principais quinases que participa da dessensibilização do receptor. Ao fosforilar o domínio carboxi-terminal do GPCR, a GRK2 dispara o recrutamento de beta-arrestina. No nosso caso específico, o excesso de proteínas O-gluconaciladas poderia reduzir a fosforilação do AT1R, ou ainda, mantê-lo em uma conformação de baixa afinidade pela beta-arrestina e, por isso, elevando a contratilidade para Ang II nessas artérias. Investigar a molécula do AT1R modificada por O-GlcNAc exigiria um projeto particular, envolvendo produção de AT1R recombinantes e ferramentas cromatográficas acopladas.

Então, optou-se por inicialmente ativar o AT1R para a via da beta arrestina (a beta-arrestina 2, que é a isoforma de maior participação nos AT1R) usando o TRV027. Como esperado, este ligante tendencioso para a via da beta-arrestina não promoveu nenhuma resposta contrátil *per se*. Após lavar a preparação, foram produzidas curvas para Ang II. Retirar o TRV027 do perfusato serviu para descartar a atuação deste ligante como antagonista competitivo do AT1R. Como observado, a diminuição da eficácia da Ang II ocorreu nas artérias dos dois grupos animais. Curiosamente, não houve diferença estatística no valor da potência

(pEC_{50}) após primar as preparações com o TRV027, e podemos sugerir que nestas condições experimentais não houve redução significativa na densidade dos AT1R nos animais db/db por ação do TRV027. Por outro lado, nas artérias dos animais controle/heterozigotos houve um deslocamento à direita de meia casa decimal logarítmica e o uso de outras ferramentas mais sensíveis de investigação do AT1R ativado em artérias pode trazer alguma informação relevante sobre a ativação da beta-arrestina em animais não-diabéticos.

O TRV027 foi objeto de um estudo clínico para o controle da insuficiência cardíaca em humanos (VIOLIN et al., 2010a; BOERRIGTER et al., 2012; FELKER et al., 2015; COTTER et al., 2018) e os dados aqui apresentados reforçam a ideia de que esta estratégia de ativar a beta-arrestina por um ligante tendencioso do AT1R pode contribuir com a redução da resistência periférica, reduzindo os sinais e sintomas da insuficiência cardíaca e da hipertensão quando associadas a hiperglicemia e diabetes. Na mesma linha de raciocínio, foi descrito que o TRV027 administrado no ventrículo cerebral de ratos espontaneamente hipertensos resulta em aumento da função endotelial periférica e redução da resistência em artérias mesentéricas (CARVALHO-GALVAO et al., 2018). Outro laboratório demonstrou que o aumento da expressão gênica de beta-arrestina 2 (por vetor adenoviral em animais nocautes) reduz parâmetros de diabetes em camundongos (LUAN et al., 2009), indicando que diante de fatores de risco cardiovascular, o recrutamento de beta-arrestina pode contribuir com a redução da resistência vascular periférica em condições em que há aumento de proteínas O-gluconaciladas, como ocorre em diabetes experimental.

Esperava-se que, ao primar com o TRV027, as artérias mesentéricas dos animais db/db não respondessem com redução de contratilidade porque os animais diabéticos estavam apresentando aumento da eficácia para Ang II. Então, observou-se que o recrutamento de beta-arrestina reduziu em igual proporção a contratilidade das artérias dos db/db, comparado aos controles não-diabéticos, db/+. A beta-arrestina organiza o processo de dessensibilização, porém há diversas evidências de que também ocorre uma dessensibilização de forma independente de ação prévia de GRKs ou beta-arrestina em vários tipos de receptores farmacológicos (USUI et al., 2000; BOHN et al., 2004; MØLLER et al., 2020). De fato, como já foi descrito em células HEK293T tratadas com TMG ou veículo, o tempo de internalização e o recrutamento de beta-arrestina não foram modificados. Porém, as propriedades da farmacologia molecular podem ocorrer de maneira diferente entre as espécies; no caso, uma

linhagem de célula humana e uma artéria de roedor. Então, optou-se por avaliar a perda de resposta por sucessivos estímulos (taquifilaxia) e a relação tempo-efeito para um estímulo provocador de Rmax nos AT1R (dessensibilização) nos animais db/+ e db/db, uma vez que estes fenômenos, de forma complementar, contribuiriam com a elucidação do aumento da eficácia para Ang II via manutenção do receptor ou da resposta dele por mais tempo nas membranas dos miócitos arteriais.

O teste que buscou, por inferência indireta, aferir o tempo de dessensibilização do AT1R medindo a perda de resposta contrátil a partir de uma curva discreta de Ang II (estímulo único de 10 μ M) mostrou que a redução da Rmax para Ang II nas artérias dos animais db/db foi mais precoce que nos respectivos animais heterozigotos db/+. Este dado nos indica que a Rmax aumentada nas artérias de db/db observada das curvas cumulativas, não é por uma sustentação temporal da sinalização do AT1R, por outro lado, a dessensibilização aumentada nos db/db nos excluiu de inferir que quinases que atuam sustentando a contração como a *quinase associada a GTPase Rho* (RhoK), a calmodulina ou KCLM fossem as responsáveis pela resposta contrátil aumentada nestas artérias.

Optou-se a partir daqui pelo ensaio de taquifilaxia porque o aumento de Rmax nas artérias em que há maior conteúdo de proteínas O-gluconacinadas poderia estar relacionada a eficiência de ativação do AT1R. Porém, novamente, houve redução de resposta para sucessivos estímulos para ambos os animais.

No seguimento dessa investigação, duas questões foram consideradas. Inicialmente, a RhoK não poderia ser a responsável pelo aumento de contratilidade nas artérias dos animais db/db, já que no experimento de dessensibilização as artérias de animais db/db não mostraram sustentação de resposta quando comparadas as artérias dos animais db/+. Por outro lado, nos experimentos em células HEK293T a fosforilação de ERK 1/2 foi maior após aumento de O-gluconacilação. Aventou-se então a possibilidade da cascata de quinases MEK-ERK ser a responsável em, de forma não canônica, contribuir com a contratilidade por meio da fosforilação de elementos da cascata de transdução de sinal do AT1R ou da maquinaria contrátil do músculo liso arterial porque foi publicado por Roberts que a inibição desta via usando o PD98059 foi capaz de reduzir a contratilidade de artéria da pata de porco (ROBERTS, 2001). Contrariamente, ao usarmos o mesmo inibidor da atividade catalítica da MEK para reduzir a fosforilação da ERK 1/2, não foi observada redução da contratilidade para Ang II,

indicando que a fosforilação aumentada de ERK 1/2 em condições de elevado O-GlcNAc pode se relacionar com diversos fatores celulares, mas não com o aumento de contratilidade para Ang II.

Complementando este raciocínio, outra possibilidade de efetor intracelular capaz de ser influenciado por O-gluconacilação e promover hipercontratilidade é a PKC. Esta quinase desempenha múltiplas ações por meio de ajustes no influxo/efluxo de cargas através dos canais iônicos da célula muscular lisa, como também a inibição de fosfatases e alterações na recaptação/liberação de cálcio nos estoques endoplasmáticos (SCHRÖR; SCHRÖDER, 1994). O inibidor usado, o RO-31 8220 também é capaz de inibir MAP quinases (BELTMAN; MCCORMICK; COOK, 1996)

7 CONCLUSÃO

A observação do conjunto de resultados aqui apresentados e discutidos nos permite concluir que a principal contribuição do aumento de modificação por O-GlcNAc na via de sinalização do AT1R é promover aumento da participação dos íons cálcio como mensageiros secundários amentando a eficácia da Ang II para a contratilidade.

8 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

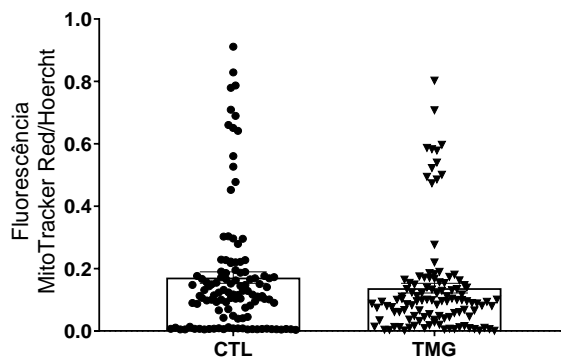


Figura suplementar 1. Densidade mitocondrial de células HEK293T tratadas ou não com thiamet G: razão entre as fluorescências características de membranas mitocondriais (Mitotracker Red) e de material nuclear (Hoechst) quantificadas na leitora de placas com células frescas cultivadas em placas de 96 poços. $P = 0,054$; Mann-Whitney; $n = 6$. Este protocolo foi previamente validado usando os interferentes mitocondriais como o ionóforo de prótons FCCP e vermelho de rutênio.

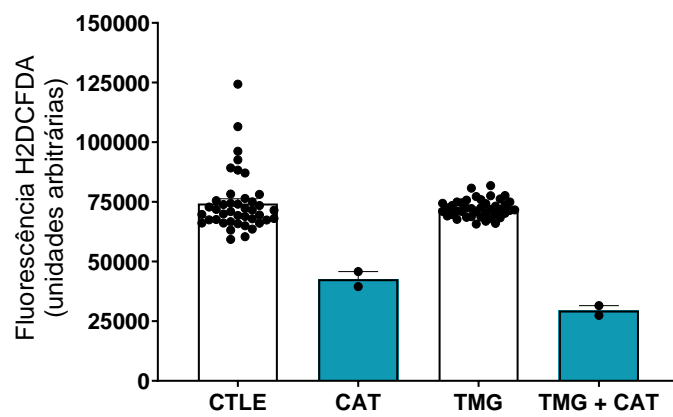


Figura suplementar 2. Quantificação de espécies oxidantes em células HEK293T tratadas ou não com thiamet G: fluorescência da sonda DCFDA.

9 REFERÊNCIAS

- ABOULAFIA, J. et al. Angiotensin II desensitization and Ca²⁺ and Na⁺ fluxes in vascular smooth muscle cells. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 415, n. 2, p. 230–234, 1989.
- AGUILERA, G.; CATT, K. J. Regulation of aldosterone secretion during altered sodium intake. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 19, n. 1 PART 2, p. 525–530, 1983.
- AHN, S. et al. Differential kinetic and spatial patterns of β -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35518–35525, 2004a.
- AHN, S. et al. Reciprocal Regulation of Angiotensin Receptor-Activated Extracellular Signal-Regulated Kinases by Beta-Arrestins 1 and 2. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 9, p. 7807–7811, fev. 2004b.
- AKIMOTO, Y. et al. Elevated expression of O-GlcNAc-modified proteins and O-GlcNAc transferase in corneas of diabetic Goto-Kakizaki rats. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 9, p. 3802–3809, 2003.
- AKIMOTO, Y. et al. O-GlcNAcylation and phosphorylation of β -actin Ser199 in diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 317, n. 5, p. F1359–F1374, 2019.
- ALESSI, D. R. et al. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74(raf-1). **EMBO Journal**, v. 13, n. 7, p. 1610–1619, 1994.
- ALEXIEWICZ, J. M. et al. Elevated cytosolic calcium and impaired proliferation of B lymphocytes in type III diabetes mellitus. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 30, n. 1, p. 98–104, 1997.
- AMOBI, N.; GUILLEBAUD, J.; SMITH, C. H. Comparative Effects of T-Type and L-Type Ca(2+)-Antagonists against Noradrenaline-Induced Contractions of Human Vas Deferens. **BJU international**, v. 106, n. 4, p. 578–585, ago. 2010.
- AMOBI, N. I. B.; CHUNG, I.-P.; SMITH, I. C. H. Attenuation of Contractility in Rat Epididymal Vas Deferens by Rho Kinase Inhibitors. **Autonomic & autacoid pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 169–181, abr. 2006.
- AMOBI, N. I.; SUGDEN, D.; SMITH, I. C. Pharmacomechanical Coupling in Rat Vas Deferens: Effects of Agents That Modulate Intracellular Release of Calcium and Protein Kinase C Activation. **Life sciences**, v. 65, n. 2, p. 145–156, 1999.
- ANDERSON, J. M.; GIMBRONE, M. A.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin II stimulates phosphorylation of the myosin light chain in cultured vascular smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 10, p. 4693–4696, 1981. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69303-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69303-8)>.
- ANG, C. et al. Getting more out of FLAG-Tag co-immunoprecipitation mass spectrometry experiments using FAIMS. **Journal of Proteomics**, v. 254, n. December 2021, p. 104473, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104473>>.
- ARMANDO, I. et al. Increased angiotensin II AT1 receptor expression in paraventricular nucleus and hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation in AT2 receptor gene disrupted mice. **Neuroendocrinology**, v. 76, n. 3, p. 137–147, 2002.
- AUDET, M.; BOUVIER, M. Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation. **Cell**, v. 151, n. 1, p. 14–23, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.003>>.
- AXELSSON, J. et al. Rapid, dynamic changes in glomerular permeability to macromolecules

during systemic angiotensin II (ANG II) infusion in rats. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 303, n. 6, p. 790–799, 2012.

BALAKUMAR, P.; JAGADEESH, G. A Century Old Renin-Angiotensin System Still Grows with Endless Possibilities: AT1 Receptor Signaling Cascades in Cardiovascular Physiopathology. **Cellular signalling**, v. 26, n. 10, p. 2147–2160, out. 2014.

BALBI, A. P. C. et al. Roles of mitogen-activated protein kinases and angiotensin II in renal development. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 1, p. 38–43, 2009.

BANERJEE, P. S.; MA, J.; HART, G. W. Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria. v. 112, n. 19, 2015.

BARAUNA, V. G. et al. Shear Stress-Induced Ang II AT1 Receptor Activation: G-Protein Dependent and Independent Mechanisms. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 434, n. 3, p. 647–652, maio 2013.

BEAUTRAIT, A. et al. A new inhibitor of the β -arrestin/AP2 endocytic complex reveals interplay between GPCR internalization and signalling. **Nature Communications**, v. 8, p. 15054, 18 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms15054>>.

BECARI, C. et al. Elastase-2, an angiotensin II-generating enzyme, contributes to increased angiotensin II in resistance arteries of mice with myocardial infarction. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 10, p. 1104–1115, 2017.

BELTMAN, J.; MCCORMICK, F.; COOK, S. J. The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 43, p. 27018–27024, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.43.27018>>.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular transduction. **Nature**, v. 312, p. 315–321, 1984. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/312315a0.pdf>>.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The Versatility and Universality of Calcium Signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 11–21, out. 2000.

BERS, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 23–49, 2008.

BOERRIGTER, G. et al. TRV120027, a novel β -arrestin biased ligand at the angiotensin II type I receptor, unloads the heart and maintains renal function when added to furosemide in experimental heart failure. **Circulation: Heart Failure**, v. 5, n. 5, p. 627–634, 2012.

BOHN, L. M. et al. Relative Opioid Efficacy Is Determined by the Complements of the G Protein-Coupled Receptor Desensitization Machinery. **Molecular pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 106–112, jul. 2004.

BONDE, M. M. et al. Biased signaling of the angiotensin II type 1 receptor can be mediated through distinct mechanisms. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

BOUVIER, M.; NAN, F. Le récepteur beta-2-adrénergique Un modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la désensibilisation. **Medicine Sciences**, v. 6, n. 11, p. 819–827, 1995.

BRAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 127, n. 3292, p. 242, jan. 1958.

BRAUN-MENENDEZ, E.; PALADINI, A. C. Pressor polypeptides formed in vivo and in vitro as mediators of renal. **Circulation**, v. 17, n. 4, Part 2, p. 668–671, 1958.

BROWN, G. L.; FELDBERG, W. The action of potassium on the superior cervical ganglion of the cat. **The Journal of Physiology**, v. 86, n. 3, p. 290–305, 1936.

CALEBIRO, D. et al. G Protein-Coupled Receptor-G Protein Interactions: A Single-Molecule Perspective. **Physiological reviews**, dez. 2020.

CAO, Y. et al. Angiotensin II Type 1 Receptor Variants Alter Endosomal Receptor- β -Arrestin Complex Stability and MAPK Activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 295, n. 38, p. 13169–13180, set. 2020.

CARRILLO-SEPULVEDA, M. A. et al. Role of Vascular Smooth Muscle PPAR γ in Regulating AT1 Receptor Signaling and Angiotensin II-Dependent Hypertension. **PLoS one**, v. 9, n. 8, p. e103786, 2014.

CARVALHO-GALVAO, A. et al. Central Administration of TRV027 Improves Baroreflex Sensitivity and Vascular Reactivity in Spontaneously Hypertensive Rats. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 132, n. 14, p. 1513–1527, jul. 2018.

CASARE, F. A. M. et al. Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 310, n. 11, p. F1295-307, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962104>>.

CATANZARO, D. F.; MULLINS, J. J.; MORRIS, B. J. The biosynthetic pathway of renin in mouse submandibular gland. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7364–7368, 1983. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32187-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32187-2)>.

CEPELUPE-SIMÕES, S. **Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por ligantes com diferentes perfis farmacológicos**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

CERAVOLO, G. S. et al. Enalapril and losartan restored blood pressure and vascular reactivity in intrauterine undernourished rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 8, p. 782–787, 2007.

CFMV - CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados**. [s.l.: s.n.].v. 1

CHAKIR, K. et al. Mechanisms of enhanced β -adrenergic reserve from cardiac resynchronization therapy. **Circulation**, v. 119, n. 9, p. 1231–1240, 2009.

CHAMPATTANACHAI, V.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Glucosamine Protects Neonatal Cardiomyocytes from Ischemia-Reperfusion Injury via Increased Protein O-GlcNAc and Increased Mitochondrial Bcl-2. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 294, n. 6, p. C1509-20, jun. 2008.

CHANG, F. et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: Potential targeting for therapeutic intervention. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p. 1263–1293, 2003.

CHEN, Y.; ZHAO, X.; WU, H. Metabolic Stress and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 10, p. 1911–1924, 2019.

CHIU, T.; SANTISKULVONG, C.; ROZENGURT, E. ANG II stimulates PKC-dependent ERK activation, DNA synthesis, and cell division in intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, n. 1 48-1, p. 1–11, 2003.

CORNISH, K. G.; JOYNER, W. L.; GILMORE, J. P. Direct evidence for the presence of a different converting enzyme in the hamster cheek pouch. **Circulation Research**, v. 44, n. 4, p. 540–544, 1979.

CORVOL, P. et al. Can we live without a functional renin-angiotensin system? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 4, p. 431–433, 2008.

COSTA-NETO, C. M.; PARREIRAS-E-SILVA, L. T.; BOUVIER, M. MINIREVIEW — A LATIN AMERICAN PERSPECTIVE ON G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS A Pluridimensional View of Biased Agonism. **Molecular pharmacology**, v. 90, n. November, p. 587–595, 2016.

COTTER, G. et al. Relationship between Baseline Systolic Blood Pressure and Long-Term

Outcomes in Acute Heart Failure Patients Treated with TRV027: An Exploratory Subgroup Analysis of BLAST-AHF. **Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society**, v. 107, n. 2, p. 170–181, fev. 2018.

COVIAN, M. R.; GENTIL, C. G.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Water and sodium chloride intake following microinjections of angiotensin II into the septal area of the rat brain. **Physiology and Behavior**, v. 9, n. 3, p. 373–377, 1972.

CURNOW, K. M.; PASCOE, L.; WHITE, P. C. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 7, p. 1113–1118, 1992.

CZAJKA, A. et al. Daily oral supplementation with collagen peptides combined with vitamins and other bioactive compounds improves skin elasticity and has a beneficial effect on joint and general wellbeing. **Nutrition Research**, v. 57, p. 97–108, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.001>>.

DA SILVA JUNIOR, E. D. et al. Factors Influencing Biased Agonism in Recombinant Cells Expressing the Human $\alpha(1A)$ -Adrenoceptor. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 14, p. 2318–2333, jul. 2017.

DAMRON, D. S. et al. Intracellular translocation of PKC isoforms in canine pulmonary artery smooth muscle cells by ANG II. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 274, n. 2 18-2, p. 278–288, 1998.

DECLUE, J. W. et al. Subpressor angiotensin infusion, renal sodium handling, and salt-induced hypertension in the dog. **Circulation Research**, v. 43, n. 4, p. 503–512, 1978.

DENNIS, M. D. et al. Hyperglycemia-induced O-GlcNAcylation and truncation of, 4E-BP1 protein in liver of a mouse model of type 1 diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 34286–34297, 2011.

DÉRIJARD, B. et al. Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. **Science**, v. 267, n. 5198, p. 682–685, 1995.

DEUCHARS, S. A.; LALL, V. K. Sympathetic preganglionic neurons: Properties and inputs. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 2, p. 829–869, 2015.

DEWIRE, S. M.; VIOLIN, J. D. Biased Ligands for Better Cardiovascular Drugs: Dissecting G-Protein-Coupled Receptor Pharmacology. **Circulation research**, v. 109, n. 2, p. 205–216, jul. 2011.

DI SALVO, J. et al. Intrarenal conversion of angiotensin I to angiotensin II in the dog. **Circulation research**, v. 29, n. 4, p. 398–406, 1971.

DIMITROPOULOU, C. et al. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT2 receptor and Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels. **Hypertension**, v. 37, n. 2 I, p. 301–307, 2001.

DUARTE, D. A. et al. Angiotensin ii type 1 receptor tachyphylaxis is defined by agonist residence time. **Hypertension**, v. 79, n. 1, p. 115–125, 2022.

DZAU, V. J. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. **The American Journal of Cardiology**, v. 59, n. 2, 1987.

EPSTEIN, D.; BROPHY, C. Mitogen-activated protein kinase activation : An alternate signaling pathway for sustained vascular smooth muscle contraction. **J Vascular Surgery**, 1997.

EVRON, T.; DAIGLE, T. L.; CARON, M. G. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 33, n. 3, p. 154–164, 2012.

FAHRENHOLZ, M. et al. Single low-dose administration of pharmacological inhibitor of mitogen-activated ERK kinase to the adventitia of the injured rat carotid artery suppresses neointima formation and inhibits nuclear ERK signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 617, n. 1–3, p. 90–96, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.040>>.

FELKER, G. M. et al. Heart Failure Therapeutics on the Basis of a Biased Ligand of the Angiotensin-2 Type 1 Receptor. Rationale and Design of the BLAST-AHF Study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure). **JACC. Heart failure**, v. 3, n. 3, p. 193–201, mar. 2015.

FERNANDEZ, S. F. et al. Mechanisms of angiotensin II-mediated decreases in intraneuronal Ca²⁺ in calcium-loaded stellate ganglion neurons. **Hypertension**, v. 45, n. 2, p. 276–282, 2005.

FORD, W. R. et al. Angiotensin II reduces infarct size and has no effect on post-ischaemic contractile dysfunction in isolated rat hearts. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 38–45, 2001.

FOREMAN, J.C.; JOHANSEN, T.; GIBB, A. **Textbook of Receptor Pharmacology**. 3a. ed. [s.l.] CRC Press - Taylor & Francis Group, 2011.

FORRESTER, S. J. et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1627–1738, 2018.

FREEDMAN, N. J.; LEFKOWITZ, R. J. Desensitization of G protein-coupled receptors. **Recent progress in hormone research**, v. 51, n. October, p. 319–51; discussion 352-3, 1996a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8701085>>.

FREEDMAN, N. J.; LEFKOWITZ, R. J. Desensitization of G Protein-Coupled Receptors. **Recent progress in hormone research**, v. 51, p. 313–319, 1996b.

FREESTONE, N. S. et al. Differential lusitropic responsiveness to β -adrenergic stimulation in rat atrial and ventricular cardiac myocytes. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 441, n. 1, p. 78–87, 2000.

FU, N. et al. Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. v. 0005, p. 2227–2236, 2022.

FUXE, K. et al. Immunohistochemical evidence for the existence of angiotensin II-containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 2, n. 4, p. 229–234, 1976.

GÁBORIK, Z. et al. The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2220–2228, 2003.

GIACHINI, F. R. C. et al. Erk1/2 Activation, Via Downregulation of Mkp-1, Mediates Sex-Differences in Doca-Salt Hypertension Vascular Reactivity. **Hypertension**, v. 130, n. 29, p. 9492–9499, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2801880/pdf/nihms161219.pdf>>.

GIBB, A. J. Structure and function of 7-tm G-protein coupled receptors. In: FOREMAN, J. C.; JOHANSEN, T.; GIBB, A. J. (Ed.). **Textbook of receptor pharmacology**. 3. ed. London: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2011. p. 291.

GIRI, L. et al. A G-protein subunit translocation embedded network motif underlies GPCR regulation of calcium oscillations. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 1, p. 242–254, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.020>>.

GOLDBLATT, B. Y. H. et al. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA * t (From the Institute of Pathology , Western Reserve University , Cleveland) PLATES 23 AND 24 . 1933.

GRIENDLING, K. K. et al. Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 13,

p. 5901–5906, 1986.

GUREVICH, V. V.; GUREVICH, E. V. Molecular mechanisms of GPCR signaling: A structural perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1–17, 2017.

HANOVER, J. A. A Versatile Sugar Transferase Makes the Cut. **Cell**, v. 144, n. 3, p. 321–323, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.025>>.

HART, G. W. et al. O-linked N-acetylglucosamine: The “Yin-Yang” of Ser/Thr phosphorylation?: Nuclear and cytoplasmic glycosylation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 376, n. 205, p. 115–123, 1995.

HART, G. W. et al. Cross Talk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 825–858, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21391816>>.

HARVEY, A. P. et al. Vascular dysfunction and fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: The aldosterone-mineralocorticoid receptor-Nox1 axis. **Life Sciences**, v. 179, p. 110–119, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.05.002>>.

HEGYI, B. et al. Hyperglycemia regulates cardiac K⁺ channels via O-GlcNAc-CaMKII and NOX2-ROS-PKC pathways. **Basic Research in Cardiology**, v. 115, n. 6, p. 1–19, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00395-020-00834-8>>.

HELMER, O. M. Differentiation between two forms of angiotensin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. **The American journal of physiology**, v. 188, n. 3, p. 571–577, 1957.

HICKLER, B. R. B.; LAULER, D. P.; THORN, G. W. PLASMA ANGIOTENSINASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH. v. 42, n. 5, p. 635–648, 1963.

HINES, J.; FLUHARTY, S. J.; YEE, D. K. Structural determinants for the activation mechanism of the angiotensin II type 1 receptor differ for phosphoinositide hydrolysis and mitogen-activated protein kinase pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 251–262, 2003.

HO, C. Y. et al. Valsartan in Early-Stage Hypertrophic Cardiomyopathy: A Randomized Phase 2 Trial. **Nature medicine**, v. 27, n. 10, p. 1818–1824, out. 2021.

HOLT, G. D. et al. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on band 4.1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 31, p. 14847–14850, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48100-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48100-8)>.

HOLT, G. D.; HART, G. W. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharidic linkage, O-linked GlcNAc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 17, p. 8049–8057, 1986.

HU, Y. et al. Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose *. v. 284, n. 1, p. 547–555, 2009.

HUGHES, A. D. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Angiotensin II (AT1) Receptors in Vascular Smooth Muscle. **Journal of human hypertension**, v. 12, n. 5, p. 275–281, maio 1998.

HULLMANN, J. et al. The expanding GRK interactome: Implications in cardiovascular disease and potential for therapeutic development. **Pharmacological Research**, v. 110, p. 52–64, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.008>>.

HUNYADY, L.; CATT, K. J. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. August, p. 953–970, 2006.

HWANG, J.-S. et al. Glucosamine Improves Survival in a Mouse Model of Sepsis and Attenuates Sepsis-Induced Lung Injury and Inflammation. **The Journal of biological chemistry**, v. 294, n. 2, p. 608–622, jan. 2019.

IHARA, E. et al. Mitogen-activated protein kinase pathways contribute to hypercontractility and increased Ca²⁺ sensitization in murine experimental colitis. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 5, p. 1031–1040, 2009.

JANKNECHT, R. et al. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. **EMBO Journal**, v. 12, n. 13, p. 5097–5104, 1993.

JELICKS, L. A.; GUPTA, R. K. NMR measurement of cytosolic free calcium, free magnesium, and intracellular sodium in the aorta of the normal and spontaneously hypertensive rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 3, p. 1394–1400, 1990.

JIMENEZ-VARGAS, N. N. et al. Endosomal signaling of delta opioid receptors is an endogenous mechanism and therapeutic target for relief from inflammatory pain. v. 117, n. 26, p. 15281–15292, 2020.

JIN, L. et al. Hyper-O-GlcNAcylation impairs insulin response against reperfusion-induced myocardial injury and arrhythmias in obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 558, p. 126–133, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.066>>.

KANWAL, S. et al. O-GlcNAcylation-Inducing Treatments Inhibit Estrogen Receptor α Expression and Confer Resistance to 4-OH-Tamoxifen in Human Breast Cancer-Derived MCF-7 Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–17, 2013.

KENAKIN, T. Efficacy At G-Protein-Coupled Receptors. v. 1, n. February, p. 3–10, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com.ezp.lib.unimelb.edu.au/nrd/journal/v1/n2/pdf/nrd722.pdf>>.

KENAKIN, T. Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 336, n. 2, p. 296–302, fev. 2011.

KENAKIN, T. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR Review 2. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 554–575, 2013.

KENAKIN, T. P. A pharmacology primer: theory, applications, and methods. **A Pharmacology Primer**, v. 00000, p. 61–79, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123745859000049>>.

KHAIRALLAH, P. A. et al. Angiotensin tachyphylaxis and its reversal. **Circulation research**, v. 19, n. 2, p. 247–254, 1966a.

KHAIRALLAH, P. A. et al. Angiotensin tachyphylaxis and its reversal. **Circulation research**, v. 19, n. 2, p. 247–254, 1966b.

KHALIL, R. A. **Protein kinase C inhibitors as modulators of vascular function and their application in vascular disease.** [s.l: s.n.]v. 6

KILKENNY, C. et al. Improving Bioscience Research Reporting : The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. v. 8, n. 6, p. 6–10, 2010.

KIM, J. et al. Independent β -arrestin2 and Gq/protein kinase C ξ pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 11953–11962, 2009.

KIM, K.-S. et al. β -Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 303, n. 8, p. H1001-10, 2012. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/content/303/8/H1001%5Cnhttp://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.00475.2012%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3469643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KITOS, T. E.; CHOI, C. M. Y.; CORNELL, R. B. Angiotensin stimulates phosphatidylcholine synthesis via a pathway involving diacylglycerol, protein kinase C, ERK1/2, and CTP:phosphocholine cytidyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 2, p. 272–279, 2006.

KURDI, M.; BOOZ, G. W. Carvedilol protects the infarcted heart by upregulating miR-133: First evidence that disease state affects β -adrenergic arrestin-biased signaling? **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 76, p. 12–14, 2014.

KWOH, C. K. et al. Effect of Oral Glucosamine on Joint Structure in Individuals with Chronic Knee Pain: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 66, n. 4, p. 930–939, abr. 2014.

LAI, S. et al. G protein-coupled receptor kinase-2: A potential biomarker for early diabetic cardiomyopathy. **Journal of Diabetes**, v. 12, n. 3, p. 247–258, 2020.

LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of Receptor Signals by Beta-Arrestins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5721, p. 512–517, abr. 2005.

LENEY, A. C. et al. Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 35, p. E7255–E7261, 2017.

LEVY, J.; ZEMEL, M. B.; SOWERS, J. R. Role of cellular calcium metabolism in abnormal glucose metabolism and diabetic hypertension. **The American Journal of Medicine**, v. 87, n. 6 SUPPL. 1, 1989.

LIMA, V. V et al. O-GlcNAcylation: A Novel Post-Translational Mechanism to Alter Vascular Cellular Signaling in Health and Disease: Focus on Hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension : JASH**, v. 3, n. 6, p. 374–387, 2009.

LIMA, V. V et al. NIH Public Access. v. 53, n. 2, p. 166–174, 2010.

LIMA, V. V et al. O-GlcNAcylation Contributes to the Vascular Effects of ET-1 via Activation of the RhoA/Rho-Kinase Pathway. **Cardiovascular research**, v. 89, n. 3, p. 614–622, fev. 2011.

LIMA, V. V et al. Vascular O-GlcNAcylation Augments Reactivity to Constrictor Stimuli by Prolonging Phosphorylated Levels of the Myosin Light Chain. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 47, n. 10, p. 826–833, out. 2014.

LIMA, V. V et al. High-Fat Diet Increases O-GlcNAc Levels in Cerebral Arteries: A Link to Vascular Dysfunction Associated with Hyperlipidaemia/Obesity? **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 130, n. 11, p. 871–880, jun. 2016.

LOHMEIER, T. E.; COWLEY, A. W. Hypertensive and renal effects of chronic low level intrarenal angiotensin infusion in the dog. **Circulation Research**, v. 44, n. 2, p. 154–160, 1979.

LOHSE, M. J. et al. I-Arrestin : A Protein That Regulates [I-Adrenergic. **Science**, n. 7, p. 1–4, 1984.

LUAN, B. et al. Deficiency of a β -arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance. **Nature**, v. 457, n. 7233, p. 1146–1149, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature07617>>.

LUKASHEVA, V. et al. Signal profiling of the β 1AR reveals coupling to novel signalling pathways and distinct phenotypic responses mediated by β 1AR and β 2AR. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.

LUO, J. et al. Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3. **Journal of Visualized Experiments**, n. 54, p. 1–6, 2011.

LUTTRELL, L. M. et al. HHS Public Access. v. 11, n. 549, 2019.

MARIN, E. C. S. et al. Postnatal renal abnormalities in rats exposed to losartan during lactation. **Nephron - Experimental Nephrology**, v. 119, n. 3, p. 49–58, 2011.

MARKS, L. S.; MAXWELL, M. H. Tigerstedt and the discovery of renin: An historical note. **Hypertension**, v. 1, n. 4, p. 384–388, 1979.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 707–719, 1991.

MCKNIGHT, G. L. et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine: Fructose-6-phosphate amidotransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 35, p. 25208–25212, 1992.

MEIS, L. De et al. Identification of a Ca²⁺-ATPase in Brown Adipose Tissue Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 24, p. 16384–16390, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M600678200>>.

MELONI, A. R. et al. Smoothed Signal Transduction Is Promoted by G Protein-Coupled Receptor Kinase 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 20, p. 7550–7560, 2006.

MENDELSON, F. A. O. et al. Characteristics and regulation of angiotensin II receptors in pituitary, circumventricular organs and kidney. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. A5, n. 7–8, p. 1081–1097, 1983.

MILCENT, M. D. et al. Overexpression of wild-type and catalytically inactive forms of GRK2 and GRK6 fails to alter the agonist-induced phosphorylation of the C5a receptor (CD88): evidence that GRK6 is autophosphorylated in COS-7 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 259, n. 1, p. 224–229, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10334944>.

MIURA, T. et al. O-GlcNAc on PKC ζ Inhibits the FGF4-PKC ζ -MEK-ERK1/2 Pathway via Inhibition of PKC ζ Phosphorylation in Mouse Embryonic Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 10, n. 1, p. 272–286, 2018.

MOLIN, J. C.; SGUILLA, F. S.; BENDHACK, L. M. Decreased contraction to phenylephrine by ouabain in 2K-1C rat aorta is modulated by the endothelium. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, n. 1–3, p. 94–99, 2005.

MOLINA, J. R.; ADJEI, A. A. The Ras/Raf/MAPK Pathway. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 1, n. 1, p. 7–9, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)31506-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31506-9)>.

MØLLER, T. C. et al. Dissecting the roles of GRK2 and GRK3 in μ -opioid receptor internalization and β -arrestin2 recruitment using CRISPR/Cas9-edited HEK293 cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

MONASKY, M. M. et al. The Beta-Arrestin-Biased Ligand TRV120023 Inhibits Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy While Preserving Enhanced Myofilament Response to Calcium. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 305, n. 6, p. H856-66, set. 2013.

MONTEIRO DE RESENDE, M.; MILL, J. G. Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, n. 4, p. 425–438, 2002.

MOORE, A.; KHAIRALLAH, P. A. Further Studies on Angiotensin Tachyphylaxis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 197, n. 3, p. 575–581, jun. 1976.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. [s.d.]

MURASAWA, S. et al. Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated

protein kinase activation is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. **Circulation Research**, v. 82, n. 12, p. 1338–1348, 1998.

NAMKUNG, Y. et al. Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. **Science Signaling**, v. 11, n. 559, p. 1–21, 2018a.

NAMKUNG, Y. et al. Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. **Science Signaling**, v. 11, n. 559, 2018b.

NGOH, G. A. et al. Augmented O-GlcNAc Signaling Attenuates Oxidative Stress and Calcium Overload in Cardiomyocytes. **Amino acids**, v. 40, n. 3, p. 895–911, mar. 2011.

NISHIMURA, Y. et al. Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT1 receptor antagonist Candesartan blocks brain AT1 receptors. **Brain Research**, v. 871, n. 1, p. 29–38, 2000.

OGAWA, M. et al. Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 526, n. 1, p. 184–190, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.066>>.

OIKAWA, Y. et al. Attenuation of angiotensin II-mediated coronary vasoconstriction and vasodilatory action of angiotensin-converting enzyme inhibitor in pacing-induced heart failure in dogs. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 38, n. 4, p. 1188–1194, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109701014942>>.

OKUNISHI, H. et al. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 149, n. 3, p. 1186–1192, 1987.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 1, p. 67–80, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/EP085390>>.

OLIVEIRA, L. et al. The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 565–592, 2007.

OPARIL, S.; SANDERS, C. A.; HABER, E. In-Vivo and In-Vitro Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II in Dog Blood. **Circulation Research**, v. 26, n. 5, p. 591–599, 1970.

PAIVA, T. B. et al. Tachyphylaxis and angiotensin receptors. **General Pharmacology**, v. 7, n. 2–3, p. 185–188, 1976.

PAN, X. et al. The Physiological Role of Mitochondrial Calcium Revealed by Mice Lacking the Mitochondrial Calcium Uniporter. **Nature cell biology**, v. 15, n. 12, p. 1464–1472, dez. 2013.

PAVEL, J. et al. Expression and transport of Angiotensin II AT1 receptors in spinal cord, dorsal root ganglia and sciatic nerve of the rat. **Brain Research**, v. 1246, p. 111–122, 2008.

PEARSON, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, 2001.

PEREIRA, L. M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Myocardial changes after spironolactone in spontaneous hypertensive rats. A laser scanning confocal microscopy study. **J Cell Mol Med**, v. 6, n. 1, p. 49–57, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12003668>.

PHIE, E. et al. O-GlcNAc cycling mediates energy balance by regulating caloric memory. v. 165, n. April 2020, 2021.

PICARELLI, Z. P. et al. Assay of renin and hypertension with the isolated guineapig ileum. **Circulation research**, v. 2, n. 4, p. 354–358, 1954.

PINET, F. et al. Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 3, p. 724–731, 1987.

PUPPO, A. S. Functional Change of the Balance Adrenoceptor between. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 193–195, 2006.

revisão receptores de angiotensina Smith & Timmermans.pdf, [s.d.].

RICHARD, D. E. et al. Desensitization of AT1 receptor-mediated cellular responses requires long term receptor down-regulation in bovine adrenal glomerulosa cells. **Endocrinology**, v. 138, n. 9, p. 3828–3835, 1997.

ROBERTS, R. E. Role of the extracellular signal-regulated kinase (Erk) signal transduction cascade in $\alpha 2$ adrenoceptor-mediated vasoconstriction in porcine palmar lateral vein. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 6, p. 859–866, 2001.

ROCHDI, M. D. et al. Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: Implications for treatments. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 5, p. 836–845, 2010.

ROEST, A. S. Vander et al. Hypertrophic cardiomyopathy β -cardiac myosin mutation (P710R) leads to hypercontractility by disrupting super relaxed state. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 24, 2021.

ROHSE, W. G.; KAYE, M.; RANDALL, W. C. Prolonged Pressor Effects of Selective Stimulation of the Stellate Ganglion. **Circulation research**, v. 5, n. 2, p. 144–148, mar. 1957.

ROSS, E. M.; GILMAN, A. G. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interaction of solubilized components with receptor-replete membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 9, p. 3715–3719, 1977.

S., F. E. et al. Explaining the Decrease in U.S. Deaths from Coronary Disease, 1980–2000. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 23, p. 2388–2398, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMsa053935>>.

sachinidis1993.pdf, [s.d.].

SALDANHA, C. Calmodulina e ATP-ase do Cálcio. **Actas Bioq**, v. 1, p. 15–25, 1989.

SANTOS, G. A. et al. Comparative analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT $\langle inf \rangle 1 \langle / inf \rangle$ receptor by two β -arrestin-biased agonists. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. JUL, 2015.

SASAMURA, H. et al. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 185, n. 1, p. 253–259, 1992.

SASAMURA, H.; DZAU, V. J.; PRATT, R. E. Desensitization of angiotensin receptor function. **Kidney International**, v. 46, n. 6, p. 1499–1501, 1994.

SAWADA, H. et al. Twenty Years of Studying AngII (Angiotensin II)-Induced Abdominal Aortic Pathologies in Mice: Continuing Questions and Challenges to Provide Insight into the Human Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 42, n. 3, p. 277–288, 2022.

SAWADA, N. et al. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 3, p. 798–805, 2001.

SCHLEICHER, E. D.; WEIGERT, C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. **Kidney International, Supplement**, v. 58, n. 77, 2000.

SCHRÖR, K.; SCHRÖDER, H. Eicosanoids and smooth muscle function. In: SZEKERS, L.; PAPP, J. (Ed.). **Pharmacology of smooth muscle**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 536.

SCHUIJT, M. P. et al. Vasoconstriction is determined by interstitial rather than circulating angiotensin II. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 275–283, 2002.

SHENOY, S. K. et al. β -arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β 2 adrenergic receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 1261–1273, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506576200>>.

SILVA-AGUIAR, R. P. et al. O-GlcNAcylation reduces proximal tubule protein reabsorption and promotes proteinuria in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 33, p. 12749–12758, 2018.

SILVA, M. A. **Caracterização da contribuição da aldosterona para a disfunção vascular em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2**. 2014. Universidade de São Paulo, 2014.

SIMONNET, É.; BRUNET, I. The functions of arterial sympathetic innervation: From development to pathology. **Medecine/Sciences**, v. 35, n. 8–9, p. 643–650, 2019.

SINGH, A. et al. Novel therapeutic concepts: Agents with vasodilator properties in acute heart failure. **European Heart Journal**, v. 38, n. 5, p. 317–325, 2017a.

SINGH, V. et al. Phosphorylation: Implications in Cancer. **Protein Journal**, v. 36, n. 1, p. 0, 2017b.

SLAWSON, C. et al. Perturbations in O-linked β -N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis * \square . **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 38, p. 32944–32956, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M503396200>>.

SOERGEL, D. G. et al. First clinical experience with TRV027: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 9, p. 892–899, 2013.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal Transduction and Regulation in Smooth Muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231–236, nov. 1994.

SOMLYO, V. AND. 1968.

SOMLYO, A. V et al. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. v. 82, n. August, p. 5231–5235, 1985.

STRIPPOLI, G. F. M. et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists for preventing the progression of diabetic kidney disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2006.

STROTMANN, R. et al. Evolution of GPCR: Change and continuity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 331, n. 2, p. 170–178, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.012>>.

TAGUCHI, K. et al. Suppressed G-protein-coupled receptor kinase 2 activity protects female diabetic-mouse aorta against endothelial dysfunction. **Acta Physiologica**, v. 207, n. 1, p. 142–155, 2013.

TAGUCHI, K. et al. 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.**, v. 349, n. 2, p. 199–208, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24570070>>.

TEIXEIRA, L. B. et al. Ang-(1-7) is an endogenous β -arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

TENG, J. et al. Inhibitory Effect of a Novel Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist RNH-6270 on Growth of Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats: Different Anti-Proliferative Effect to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. **Journal of cardiovascular**

pharmacology, v. 39, n. 2, p. 161–171, fev. 2002.

THOMSEN, A. R. B. et al. GPCR-G Protein-??-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 907–919, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>>.

TIGERSTEDT, R.; BERGMAN, P. Niere und Kreislauf. 1. **Scandinavian Archives of Physiology**, v. 8, n. 223, 1898.

TOHGO, A. et al. β -arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9429–9436, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M106457200>>.

TORRES, C. R.; HART, G. W. Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. Evidence for O-Linked GlcNAc. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 5, p. 3308–3317, mar. 1984.

TOUYZ, R. M. et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Angiotensin II Regulates Vascular Smooth Muscle Cell PH, Contraction, and Growth via Tyrosine Kinase-Dependent Signaling Pathways. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 30, n. 2 Pt 1, p. 222–229, ago. 1997.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 639–672, dez. 2000.

TRAPANONE, R. et al. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 12, p. 1693–1702, 2016.

USUI, H. et al. RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits Gq-mediated signaling. **International journal of molecular medicine**, v. 5, n. 4, p. 335–340, 2000.

VANDERHEYDEN, P. M. L. et al. Distinction between surmountable and insurmountable selective AT1 receptor antagonists by use of CHO-K1 cells expressing human angiotensin II AT1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 4, p. 1057–1065, 1999.

VELASQUEZ, M. T.; KIMMEL, P. L.; MICHAELIS, O. E. 4th. Animal Models of Spontaneous Diabetic Kidney Disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, n. 11, p. 2850–2859, ago. 1990.

VIOLIN, J. D. et al. Selectively engaging β -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 572–579, 2010a.

VIOLIN, J. D. et al. Selectively Engaging B-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. **Pharmacology & therapeutics**, v. 335, p. 572–579, 2010b.

VIOLIN, J. D.; LEFKOWITZ, R. J. Beta-Arrestin-Biased Ligands at Seven-Transmembrane Receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 8, p. 416–422, ago. 2007.

VSEVOLOD, V, G.; EUGENIA V, G. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein coupled receptors. **Pharmacol Ther.**, v. 110, n. 3, p. 465–502, 2008.

WALLENFELS, B. Developmental and mutational changes of glycoproteins. v. 76, n. 7, p. 3223–3227, 1979.

WALTER, P.; BASSENGE, E. Effect of angiotensin on vascular smooth muscles. **Pflügers Archiv**

European Journal of Physiology, v. 307, n. 1, p. 70–82, 1969.

WANG, R. et al. rapid communication. n. 18, p. 885–889, 2022.

WANG, Z.; GUCEK, M.; HART, G. W. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: Site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 37, p. 13793–13798, 2008.

WEI, H. et al. Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10782–10787, 2003.

WILSON, J. X. The renin-angiotensin system in nonmammalian vertebrates. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 45–61, 1984.

WIMMER, R.; BACCARINI, M. Partner exchange: Protein-protein interactions in the Raf pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 12, p. 660–668, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.06.001>>.

WINGLER, L. M. et al. Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 479–490.e12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.006>>.

WRIGHT, S. C. et al. BRET-based effector membrane translocation assay monitors GPCR-promoted and endocytosis-mediated Gq activation at early endosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 20, p. 1–10, 2021.

XIE, S. et al. O-GlcNAcylation of protein kinase A catalytic subunits enhances its activity: A mechanism linked to learning and memory deficits in Alzheimer's disease. **Aging Cell**, v. 15, n. 3, p. 455–464, 2016.

XU, N. et al. A mutant α subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6741–6745, 1993.

XUE, B. et al. Central interactions of aldosterone and angiotensin II in aldosterone- and angiotensin II-induced hypertension. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 2, p. 555–565, 2011.

YUZWA, S. A. et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 8, p. 483–490, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nchembio.96>>.

ZACHARA, N. E. The roles of O-linked β -N-acetylglucosamine in cardiovascular physiology and disease. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 10, p. 1–27, 2012.

ZACHARA, N. E. Critical observations that shaped our understanding of the function(s) of Intracellular Glycosylation (O-GlcNAc). **FEBS Letters**, v. 592, p. 3950–3975, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.13286>>.

ZHANG, D.-M. et al. Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 5, p. 971–90, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277866>>.

ZHANG, M. et al. Contractile Function during Angiotensin-II Activation: Increased Nox2 Activity Modulates Cardiac Calcium Handling via Phospholamban Phosphorylation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 66, n. 3, p. 261–272, 2015.

ZHENG, H. et al. β -Arrestin-biased agonism as the central mechanism of action for insulin-like

growth factor 1 receptor-targeting antibodies in Ewing's sarcoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 50, p. 20620–5, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3528604&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ZHU, W. Z.; LEDEE, D.; OLSON, A. K. Temporal regulation of protein O-GlcNAc levels during pressure-overload cardiac hypertrophy. **Physiological Reports**, v. 9, n. 15, p. 1–17, 2021.

ZHU, Y.; HART, G. W. Targeting O-GlcNAcylation to develop novel therapeutics. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 79, n. July, p. 100885, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100885>>.