

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Daniel Campos Villela**

**Evidências De Uma Interação Direta Entre Os Receptores Mas e AT<sub>2</sub>**

Belo Horizonte

2013

**Daniel Campos Villela**

**Titulo: Evidências De Uma Interação Direta Entre Os Receptores Mas e AT<sub>2</sub>**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Robson Augusto Souza dos Santos

**Belo Horizonte**

**2013**

**Ao meu pai Marcelo**

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos que não pude agradecer pessoalmente, meu pai Marcelo, meu avô paterno Joaquim e aos meus avós maternos, Salvador e Francisca.**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo Geral: .....	17
2.2 Objetivos Específicos:.....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Amplificação de DNA por PCR.....	17
3.2. Purificação de DNA a partir de gel de agarose.....	18
3.3. Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	18
3.4. Vetor e clonagem dos fragmentos de DNA .....	19
3.5. Ligação dos fragmentos de DNA.....	19
3.6. Transformação de <i>Escherichia coli</i> .....	20
3.7. Extração dos Vetores .....	20
3.8. Sequenciamento de DNA .....	21
3.9. Transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET).....	21
- Desenvolvimento de vetores de expressão adequados para o estudo do FRET....	21
- Transfecção de células HEK293.....	24
- Aquisição do FRET por queima do acceptor .....	24
- Mutagenese in vitro: Seleção de Mutantes com DpnI .....	25
- FRET dinâmico .....	26
3.10. Animais.....	26
3.11. Canulação e infusão Intracerebroventricular em ratos.....	27
3.12. Canulação da artéria e veia femoral em ratos.....	28
3.13. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos.....	28
3.14. Estimulação dos barorreceptores arteriais e avaliação da sensibilidade do barorreflexo em ratos.....	29
3.15. Cultura e tratamento celular.....	30
3.16. Reatividade vascular em anéis aórticos de ratos .....	30
3.17. Avaliação da liberação de óxido nítrico (NO) em células CHO transfectadas.....	31
3.18. Genotipagem dos camundongos: .....	32
3.19. Canulação das artérias carótida e femoral em camundongos transgênicos. ....	33
3.20. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute Mas/AT <sub>2</sub> .....	34
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>35</b>
4.1. Avaliação de interação molecular envolvendo os receptores Mas e AT <sub>2</sub> via FRET por queima do acceptor. ....	35
Identificar a Heterodimerização Mas/AT <sub>2</sub> .....	35
Identificar a Homodimerização do receptor Mas .....	37
Identificar a Homodimerização do receptor AT <sub>2</sub> .....	38
4.2. Efeito da administração dos agonistas dos receptores Mas ou AT <sub>2</sub> na heterodimerização Mas/AT <sub>2</sub> via FRET dinâmico .....	41

4.3. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e da sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR após estimulação concomitante ou separada dos receptores Mas e AT <sub>2</sub> .....	41
4.4. Avaliação da interação funcional Mas/AT <sub>2</sub> em anéis de aorta de ratos Wistar.....	42
4.5. Avaliação da liberação de óxido nítrico (NO) em células CHO transfetadas.....	43
4.6. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute Mas/AT <sub>2</sub>	44
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
5.1. Avaliação da heterodimerização dos receptores Mas e AT <sub>2</sub> usando a FRET	45
5.2. Avaliação da homodimerização do receptor Mas usando a FRET.....	48
5.3. Avaliação da homodimerização do receptor AT <sub>2</sub> usando a FRET.....	49
5.4. Avaliação dinâmica da heterodimerização dos receptores AT <sub>2</sub> e Mas usando a FRET .....	51
5.5. Avaliação do efeito da infusão ICV da Ang-(1-7) sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.....	52
5.6. Avaliação do efeito da infusão ICV do Composto 21 sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.....	54
5.7. Avaliação do efeito da infusão ICV concomitante do C21 e da Ang-(1-7) sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.	56
5.8. Avaliação do efeito da infusão ICV de salina sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.....	58
5.9. Efeitos funcionais da interação MAS/AT <sub>2</sub> em anéis de aorta de ratos wistar.....	59
5.10. Análise da Liberação de Óxido Nítrico em células CHO transfetadas....	60
5.11. Genotipagem dos animais geneticamente modificados.....	62
5.12. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute para os receptores Mas e AT <sub>2</sub> com <i>background</i> C57BL/6 (B6) .....	63
5.13. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute para os receptores Mas e AT <sub>2</sub> com <i>background</i> FVB/N.....	65
<b>6. DISCUSSÃO:.....</b>	<b>67</b>
<b>7. CONCLUSÕES:.....</b>	<b>74</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>75</b>

## ABREVIATURAS

ACE: Enzima conversora de angiotensina

ACE2: Enzima conversora de angiotensina tipo II

Ang-(1-7): Angiotensina 1-7

Ang-(1-9): Angiotensina 1-9

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

AT<sub>1</sub>: Receptor para angiotensina II tipo 1

AT<sub>2</sub>: Receptor para angiotensina II tipo 2

AT<sub>2</sub>KO: Nocaute para o receptor para angiotensina II tipo 2

Cis<sup>35</sup>: Cisteína 35

CFP: Proteína fluorescente ciano

CHO: Células de ovário de hamster chinês

C21: Composte 21

DAF-FM: 4-amino-5-metilamino-2,7-diacetato de difluorofluorescência

DKO: Duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub>

E: Eficiência da FRET

FRET: Transferência de energia de ressonância de fluorescência

FC: Frequência cardíaca

HEK293: Células embrionárias de rim humano

ICV: Intra-cérebro ventricular

Mas: Receptor Mas

MaskO: Nocaute para o receptor Mas

NO: Óxido nítrico

PAM: Pressão arterial média

PEI: Polyethyleneimine

RAS: Sistema renina angiotensina

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

TRPC6: Receptor de potencial transitório catiônico tipo 6

WT: Tipo selvagem

YFP: Proteína fluorescente amarela



## RESUMO

O receptor para angiotensina II, subtipo 2 (AT<sub>2</sub>) e o receptor Mas para Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], possuem ações fisiológicas protetoras semelhantes. Estudos mostram interações funcionais entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>, no entanto um estudo específico focado na interação Mas/AT<sub>2</sub>, ainda não foi realizado. Este estudo demonstra uma interação molecular e funcional entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>. A interação molecular Mas/AT<sub>2</sub> foi avaliada por transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), realizada em células HEK-293 vivas utilizando vetores de expressão que codificam os receptores Mas e AT<sub>2</sub> fundidos à proteínas de fluorescência CFP ou YFP. A eficiência de FRET foi determinada usando o método de recuperação da fluorescência doadora (CFP) após fotodegradação da proteína aceptora (YFP). Interações funcionais entre os receptores AT<sub>2</sub> e Mas foram avaliadas comparando os efeitos produzidos pela excitação concomitante de ambos os receptores com os efeitos produzidos pela ativação do receptor Mas ou AT<sub>2</sub> separadamente. Avaliamos os efeitos da ativação concomitante Mas/AT<sub>2</sub> na sensibilidade do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), na preparação de anel aórtico de ratos Wistar e na liberação de Óxido Nítrico (NO) em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas. Desenvolvemos camundongos duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> em dois tipos de *background* diferentes, C57BL/6 (B6) ou FVB/N, e avaliamos a função endotelial dos mesmos. Nossos resultados mostram eficiência de FRET de  $10,8 \pm 0,8\%$  para a heterodimerização dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>. Eficiência de FRET para homodimerizações foram observadas,  $7,4 \pm 0,8\%$  para o homodímero do Mas e  $9,2 \pm 0,8\%$  para o homodímero do AT<sub>2</sub>. A Interação Mas/AT<sub>2</sub> é específica, uma vez que (i) nenhuma eficiência de FRET foi observada quando um outro receptor de membrana (TRPC6) foi testado para heterodimerização com o Mas ou AT<sub>2</sub>, (ii) a expressão do MAS e AT<sub>2</sub> não fluorescentes competiu com a eficiência da FRET na heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>. Adicionalmente, a mutação na Cisteína 35 (N terminal) do receptor AT<sub>2</sub> reduziu

significativamente a eficiência de FRET sugerindo que uma ligação dissulfeto envolvendo a C<sup>35</sup> do receptor AT<sub>2</sub>, pode ser responsável pela heterodimerização entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>. A infusão intracérebro ventricular (ICV) de Ang-(1-7) ou do agonista do receptor AT<sub>2</sub>, Composto 21 (C21), aumentaram a sensibilidade do barorreflexo ( $1,0 \pm 0,13$  batimentos/min/mmHg) e ( $0,93 \pm 0,12$  batimentos/min/mmHg) respectivamente quando comparado aos grupos controles ( $0,60 \pm 0,09$  batimentos/min/mmHg) e ( $0,60 \pm 0,08$  batimentos/min/mmHg,  $p < 0,05$ ), respectivamente. Curiosamente, não houve mudança significativa na sensibilidade do barorreflexo quando o C21 foi infundido concomitantemente com a Ang-(1-7) (antes,  $0,56 \pm 0,04$  e 3 horas após a infusão ICV  $0,52 \pm 0,1$  batimentos/min/mmHg). No ensaio em anel aórtico, o efeito vaso-relaxante de Ang-(1-7) foi bloqueado após a administração do C21 ( $10^{-6}$  M) 10 minutos antes de Ang-(1-7). Curiosamente, em células CHO que expressam estavelmente o receptor Mas, a liberação de óxido nítrico Mas-Ang-(1-7) mediado, não foi afetada pela pré-incubação, 10 minutos antes, com C21. É possível, que o efeito inibitório do C21 sob a resposta vasorelaxante produzida pela Ang-(1-7) não tenha sido observado no ensaio de liberação de óxido nítrico, em razão à ausência em CHO do receptor AT<sub>2</sub>. Nos camundongos Mas/AT<sub>2</sub> duplo nocaute com *background* FVB/N evidenciamos disfunção endotelial e vascular. A principal evidência fornecida neste estudo, é que os receptores Mas e AT<sub>2</sub> se heterodimerizam e esta interação mostra-se de relevância funcional, demonstrada por ensaios In vitro e In vivo.

## ABSTRACT

The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor (AT<sub>2</sub>R) and the MAS-receptor for angiotensin 1-7 [Ang-(1-7)] both belong to the protective arm of the Renin Angiotensin System (RAS). They behave in a very similar way in terms of their physiological (tissue-protective) actions. Studies show some functional MAS/AT<sub>2</sub> interactions, but a specific study focusing this interaction has not yet been done. In this study we show a molecular and functional interaction between these two receptors. The molecular interaction between MAS and AT<sub>2</sub>R was assessed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) performed in live HEK-293 cells using expression vectors encoding Mas or AT<sub>2</sub>R fused in the C-terminus with CFP or YFP. FRET efficiencies were determined by monitoring the increase in the CFP (FRET-donor) fluorescence emission during selective YFP (FRET-acceptor) photobleaching. Functional interactions of AT<sub>2</sub>R and Mas were assessed comparing the effects produced by concomitant excitation of both receptors with the well-known effects produced by activation of the Mas receptor alone. In this way, we evaluated the effects of a Mas/AT<sub>2</sub> concomitant activation in baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats (SHR), in wistar rats aortic ring preparation and in NO release from transfected chinese hamster ovary cell (CHO). Finally, we developed and evaluated the endothelial function of Mas/AT<sub>2</sub> double knockout mice with two different backgrounds, C57BL/6 (B6) and FVB/N. Our results show a significant FRET efficiency of 10.8±0.8% when AT<sub>2</sub>-YFP and MAS-CFP were co-expressed indicating heterodimerisation. Both, MAS and AT<sub>2</sub>R also formed homodimers as demonstrated by FRET efficiencies of 7.4±0.8% or 9.2±0.8%, respectively. Receptor interactions were specific as no FRET efficiency was observed with an unrelated transmembrane receptor, and expression of non-fluorescent MAS and AT<sub>2</sub>R competed with FRET efficiencies. Further more, a mutation in the Cys<sup>35</sup> of the AT<sub>2</sub> receptor reduced significantly the FRET efficiency suggesting that a disulfide bond in this site may be responsible for the heterodimerization between the receptors. Intra-cerebral ventricular (ICV) infusion of Ang-(1-7) or the AT<sub>2</sub> R agonist, Compound 21 (C21), baroreflex sensitivity (1.0 ± 0,13 beats/min/mmHg) and (0.93 ± 0,12 beats/min/mmHg) when compared with there controls (0.60 ±

0,09 beats/min/mmHg) ( $0,60 \pm 0,08$  beats/min/mmHg;  $p < 0.05$ ) respectively. Interestingly, there was no significant change in barorreflex sensitivity when C21 was infused concomitantly with Ang-(1-7) (before,  $0.56 \pm 0,04$  and 3h after ICV infusion  $0,52 \pm 0,1$  beats/min/mmHg). In the aortic ring assay, the vasorelaxant effect of Ang-(1-7) was blocked after a C21 ( $10^{-6}$  M) administration, 10 minutes before Ang-(1-7). Interestingly, in CHO cells that stably express the Mas receptor, the Ang-(1-7)-MasR mediated NO release was not affected by pre-incubation, 10 minutes before, with C21. Suggesting that the inhibition of C21 observed in the aortic ring assay, is  $AT_2$  mediated, once CHO cells do not express the  $AT_2$  receptor. The Mas/ $AT_2$  double knockout (DKO) mice in the background FVB/N have endothelial and vascular dysfunction. The main evidence provided in this study, is that Mas and  $AT_2$  receptors form heterodimers and that this heterodimerization has functional relevance that was observed in several *in vivo* and *in vitro* assays.

## 1. INTRODUÇÃO:

### O Sistema Renina Angiotensina

Em 1896 o finlandês Robert A. Tigerstedt (1853-1923), professor de fisiologia do Instituto Karolinska em Estocolmo, e Per Gustav Bergman, estudante de medicina, iniciaram um experimento crucial inspirados pelo fisiologista francês Charles-Édouard Brown-Séquard. Brown-Séquard introduziu uma tendência para descobrir a função das "secreções internas", avaliando o efeito produzido por injeção de extratos de órgãos de animais doadores em outros animais. Assim, Bergman e Tigerstedt injetaram extrato de rim de um coelho doador na veia jugular de outro coelho e observaram um aumento consistente da pressão sanguínea do animal. Eles concluíram que o rim continha uma substância pressora e a nominaram renina<sup>1</sup>. Em outras experiências, eles mostraram que a renina estava localizada no córtex renal e que a resposta pressora era independente de um sistema nervoso intacto<sup>1</sup>. Os estudos de Tigerstedt e Bergman deram início às pesquisas do que conhecemos hoje como o sistema renina angiotensina (RAS).

Pesquisas iniciais associaram o RAS, principalmente ao controle da pressão arterial e homeostasia cardiovascular. No início dos anos 1970, componentes do sistema foram identificados e posteriormente denominados membros do RAS "clássico". Na visão clássica, os peptídeos angiotensinérgicos são gerados a partir de uma única proteína precursora chamada angiotensinogênio, uma alfa-globulina sintetizada principalmente no

fígado. O angiotensinogênio, após ser clivado pela protease renina, forma o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), a Ang I é hidrolisada pela dicarboxipeptidase, enzima conversora de angiotensina (ACE), presente principalmente nos pulmões, e forma o octapeptídeo angiotensina II (Ang II)<sup>2</sup>. Dois subtipos de receptores para a Ang II foram identificados, os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> e inicialmente atribuíram apenas ao receptor AT<sub>1</sub> as funções fisiológicas e fisiopatológicas produzidas pela Ang II<sup>3</sup>. Assim, conforme a visão clássica do RAS, a Ang II é o principal peptídeo biologicamente ativo do sistema e age via receptor AT<sub>1</sub> (Figura 1).

As principais ações da Ang II estão ligadas à prevenção do risco de ameaça à vida por perda de volume sanguíneo (ações rápidas da Ang II, em combinação com o sistema nervoso simpático); contribui para a homeostase hidroeletrólítica do organismo; aumenta a eficiência da dinâmica cardiovascular através da promoção do crescimento do coração e vasos (ação lenta) e sensibiliza os vasos sanguíneos para agentes vasoconstritores. A ativação do RAS é portanto, uma resposta essencial para a manutenção da vida, no entanto um aumento prolongado da atividade do RAS, especialmente em combinação com outros fatores de risco cardiovasculares, pode conduzir a uma cascata de efeitos deletérios que culminam no surgimento de patologias, como por exemplo a hipertensão arterial.

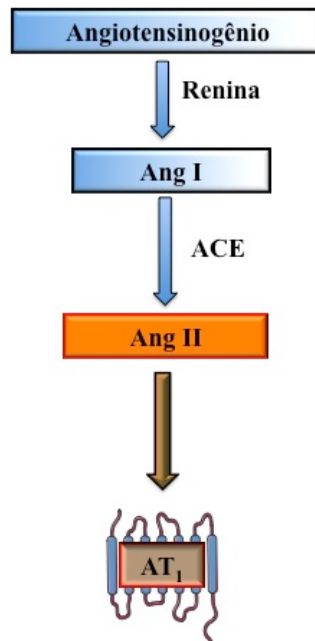


Figura 1. Ilustração do sistema renina-angiotensina mostrando a via “classica” de formação da angiotensina II e seu receptor. ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; AT<sub>1</sub>, Receptor de Angiotensina II.

Sequenciamentos genômicos mostram que genes desse sistema estão presentes em organismos que datam do início do período paleozoico. Os genes mais antigos podem ter surgido no início da era pré-cambriana e, possivelmente, foram adaptados evolutivamente e se tornaram do RAS. Acredita-se que o sistema renina-angiotensina, com todos os elementos que se conhece hoje, tenha aproximadamente 400 milhões de anos <sup>4</sup>. Levando em consideração a idade evolutiva e a importância fisiológica e fisiopatológica do sistema, uma perspectiva mais complexa do sistema foi questionada.

De fato, o espectro conceitual do RAS vem passando por inúmeros conceitos adicionais que contribuem para mudança da visão do sistema clássico unilinear. Diversas enzimas foram descobertas e são responsáveis pela formação de peptídeos menores, antes considerados escórias

metabólicas inativas que atualmente são aceitos com elementos ativos e fundamentais ao sistema (Figura 2). O RAS é atualmente aceito não só por seu papel endócrino, mas também por seus efeitos em diversos tecidos atuando como um modulador parácrino e autócrino de funções teciduais<sup>5,6</sup>. A figura 2 ilustra uma visão mais atualizada do sistema, onde duas vias enzimáticas distintas se destacam: uma vasoconstritora / hipertrófica / proliferativa, tendo como principal mediador a Ang II via AT<sub>1</sub>; a outra, vasodilatadora / anti-hipertrófica / anti-proliferativa, mediada, principalmente, pela ativação dos receptor Mas e do receptor AT<sub>2</sub><sup>7</sup>.

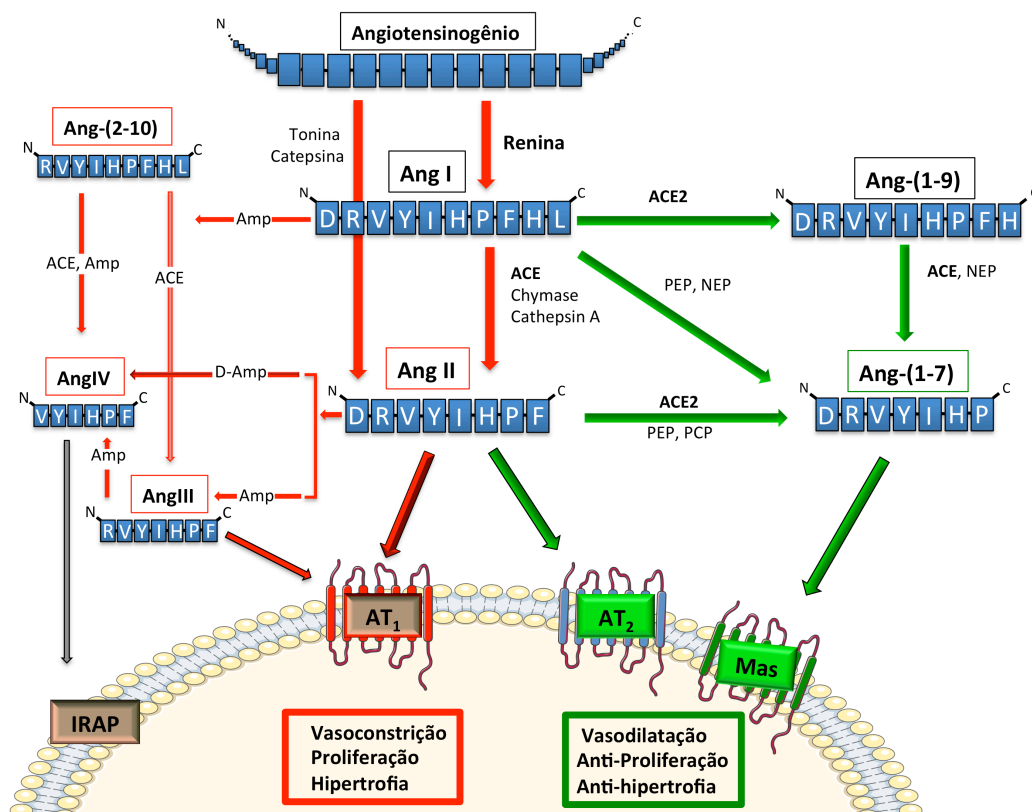


Figura 2. Ilustração mais atualizada do sistema renina-angiotensina. Em vermelho a via vasoconstritora / hipertrófica / proliferativa, tendo como principal



mediador a Ang II via AT<sub>1</sub>; em verde a via vasodilatadora / anti-hipertrofica / anti-proliferativa, mediada principalmente pela ativação dos receptores Mas ou AT<sub>2</sub>.

Neste trabalho, destacamos os receptores AT<sub>2</sub> para a Angiotensina II e o receptor Mas para o peptídeo, Angiotensina 1-7.

### A angiotensina 1-7 e o Receptor Mas

Em 1988, Santos e cols. identificaram a formação do heptapeptídeo, angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], por uma via independente da enzima conversora de angiotensina I<sup>8</sup>. No mesmo ano, demonstram que o peptídeo Ang-(1-7) possuía ação biológica *in vitro*<sup>9</sup> e posteriormente *in vivo*<sup>10</sup>. Os estudos que se seguiram levaram ao reconhecimento da Ang-(1-7) como um peptídeo biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina que se destaca com um importante papel contra-regulatório aos efeitos deletérios produzido pela angiotensina II<sup>11,12</sup>.

Esse conceito de contra-regulação tornou-se mais forte com a descoberta da enzima homóloga a ACE, uma monocarboxipeptidase denominada enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2)<sup>13,14</sup>. A ACE2 remove o aminoácido leucina do C terminal da Ang I e forma o octapeptídeo Ang-(1-9) que é subsequentemente clivado pela ACE ou endopeptidase neutra (NEP) gerando a Ang-(1-7)<sup>15</sup>. Ainda mais relevante, é a formação da Ang-(1-7) de forma direta via clivagem do aminoácido fenilalanina C-terminal da Ang II pela ACE2, pois sua afinidade catalítica para a Ang II é 400 vezes maior que para Ang I<sup>16</sup>. É importante salientar que outras enzimas como a prolilendopeptidase (PEP), prolilcarboxipeptidase (PCP) e a neprilisina ou

endopeptidase neutra (NEP) podem formar Ang-(1-7) a partir de Ang I ou da Ang II.

Estudos funcionais<sup>12</sup> e farmacológicos<sup>17,18</sup> indicavam a existência de um receptor específico para a Ang-(1-7)<sup>12</sup>.

O receptor de membrana Mas com 325 aminoácidos em humanos e 324 em ratos e camundongos possui sete domínios transmembrânicos e é acoplado a proteína G<sup>19,20</sup>. A sequência de aminoácidos do receptor Mas possui homologia de 97%, entre ratos e camundongo, e 91% de semelhança entre camundongos e humanos, mostrando ser um gene altamente conservado entre as espécies<sup>21</sup>. Adicionalmente, sua sequência de aminoácidos possui apenas 8 e 19% de homologia com os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, respectivamente<sup>22</sup>. A expressão do receptor Mas foi identificada em determinadas regiões encefálicas (hipocampo, córtex piriforme e bulbo olfatório), nos testículos (células Leydig e de Sertoli) e em menor quantidade nos rins, coração e vasos sanguíneos<sup>23</sup>.

Jackson et al. 1988 sugeriram que o proto-oncogene Mas codificava um receptor para a Angiotensina II<sup>24</sup>. No entanto, um estudo posterior sugeriu um outro ligante para o receptor Mas, uma vez que o efeito da Ang II somente era observado em células transfectadas com o receptor Mas que expressavam constitutivamente o receptor AT<sub>1</sub>, isto é, o efeito da Ang II era dependente do receptor AT<sub>1</sub> não do receptor Mas<sup>25</sup>.

Em 2003, Santos e cols. caracterizaram a Ang-(1-7) como o ligante endógeno do receptor Mas, eles observaram que não havia ligação de Ang-(1-7) marcada à células de rins de camundongos nocaute para o receptor Mas, assim como a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7), em anéis de aorta

desses camundongos, estava abolida. Adicionalmente, experimentos *in vitro* mostraram a especificidade da ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas para expressar o receptor Mas<sup>26</sup>.

Camundongos nocaute para o receptor Mas, além de não responderem aos efeitos da Ang-(1-7), apresentam fenótipos patogênicos que incluem disfunção cardíaca<sup>27</sup>, aumento da pressão sanguínea<sup>28</sup>, diminuição da função do barorreflexo<sup>29</sup>, disfunção endotelial<sup>28</sup>, função reprodutora reduzida e aumentada trombogênese<sup>30</sup>, além de marcantes mudanças no metabolismo de lipídios e glicose levando a uma síndrome metabólica com aumento da pressão sanguínea<sup>27</sup>. É importante destacar que dependendo do *background* genético (C57BL/6 ou FVB/N) do camundongo nocaute, alguns fenótipos são diferentes. Por exemplo, em camundongos FVB/N nocaute para o receptor Mas houve aumento da pressão arterial, dado que não foi observado em camundongos Mas nocaute com o *background* C57BL/6 (B6)<sup>28,27</sup>.

A via de sinalização do receptor Mas é ainda pouco conhecida, porém Sampaio et al. demonstraram que a ativação via Ang-(1-7) do receptor Mas induz liberação de óxido nítrico (NO) por uma via independente de cálcio, via PI3K-AKT, por estimulação da fosforilação do sítio (Ser1177) (ativador) e inibição do sítio (Thr495) (inibitório) da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

## O receptor AT<sub>2</sub>

Os receptores AT<sub>2</sub> foi descoberto junto com o AT<sub>1</sub>, primeiramente, de forma farmacológica, onde antagonistas não-peptídicos distintos (bifenilimidazol e carboxy benzamido-imidazol) bloqueavam totalmente a ligação da Ang II somente quando administrados em conjunto<sup>31</sup>. Posteriormente, os achados farmacológicos foram corroborados quando caracterizaram e clonaram os dois receptores<sup>32</sup>. Os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> possuem sete domínios transmembrânicos, são acoplados à proteína G e possuem 359 aminoácidos e 363 aminoácidos, respectivamente<sup>32</sup>.

Apesar dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> possuírem a mesma afinidade para a Ang II, eles têm apenas 32-34% de homologia entre seus aminoácidos<sup>33</sup>. Como dito anteriormente, o receptor AT<sub>1</sub> é responsável pelas principais ações “clássicas” da Ang II. De forma contrária ao receptor AT<sub>1</sub>, o papel fisiológico do receptor AT<sub>2</sub> tem se apresentado atípico e enigmático<sup>14</sup>. Mesmo atualmente, tem sido difícil a elucidação do papel do receptor AT<sub>2</sub> devido a sua baixa expressão em animais adultos. Por outro lado, sua expressão durante o desenvolvimento fetal está extremamente elevada e reduz de forma dramática após o nascimento, sugerindo uma participação do receptor AT<sub>2</sub> no desenvolvimento embrionário<sup>34,36</sup>. De fato, em células de origem neuronal, a ativação do receptor AT<sub>2</sub> produz o crescimento de axônios e dendritos, estimula a migração de cones de crescimento, modula a excitabilidade neuronal e promove a migração em células adultas<sup>34,36</sup>. É importante destacar que a concentração desse receptor pode aumentar em condições patológicas, como após uma lesão vascular cardíaca, lesão neural e durante o reparo de obstrução renal<sup>34</sup>.

Mesmo com as dificuldades que envolvem o estudo do receptor AT<sub>2</sub>, existe um certo consenso que a ativação do receptor AT<sub>2</sub> resulta em vasodilatação, inibição de proliferação celular, indução de apoptose, remodelamento da matriz extracelular e regeneração axonal<sup>34</sup>. Respostas estas que de forma interessante, são opostas aos efeitos muitas vezes patogênicos produzidos pela ativação prolongada do receptor AT<sub>1</sub><sup>37</sup>.

A via de sinalização intracelular ativada pela estimulação do receptor AT<sub>2</sub> é ainda muito controversa. Aparentemente, o receptor AT<sub>2</sub> não está acoplado a nenhum dos clássicos segundos mensageiros, como o cAMP, ou inositol fosfatase, assim como não há um consenso quanto ao tipo de proteína G a que ele é acoplado<sup>36,37</sup>.

Animais nocaute para o receptor AT<sub>2</sub> apresentam fenótipo pouco diferenciado aos animais selvagens, no entanto quando submetidos a modelo patológico, apresentam desfecho da doença mais agravado que animais selvagens controles<sup>38</sup>. Os animais AT<sub>2</sub>KO foram desenvolvidos em dois modelos de *background* diferentes, C57BL/6 e FVB/N, e assim como os animais MaskO, apresentam fenótipos diferentes conforme o background C57BL/6 ou FVB/N em que foram desenvolvidos. Por exemplo, animais C57BL/6 nocaute para o receptor AT<sub>2</sub> apresentam, em condições basais, aumento da pressão arterial, dado não constatado nos animais AT<sub>2</sub>KO com background FVB/N<sup>39</sup>.

A inconsistência de dados sobre as ações fisiológicas do receptor AT<sub>2</sub> pode existir em consequência à falta de ferramentas específicas para o estudo desse receptor. São poucos os agonistas seletivos para o receptor AT<sub>2</sub> e por serem todos peptídeos, são metabolicamente instáveis<sup>40,41</sup>. Assim,

um agonista do receptor  $AT_2$ , metabolicamente estável, se torna uma ferramenta desejável para o estudo mais coeso das ações produzidas pela ativação do receptor  $AT_2$ . Em 2004, um agonista não peptídico para o receptor  $AT_2$  foi sintetizado, o composto 21 (C21) <sup>41</sup>. Este composto está permitindo o estudo mais específico e seletivo da estimulação *in vitro* e *in vivo* do receptor  $AT_2$ . De forma interessante, os primeiros estudos realizados com o composto 21 apresentam resultados que reforçam a ideia que o receptor  $AT_2$  possui ações contra-regulatórias ao receptor  $AT_1$  <sup>40</sup>.

#### Interações Mas/ $AT_2$

A Ang-(1-7), via receptor Mas, desempenha um importante papel de proteção durante condições fisiopatológicas, atuando como um sistema de reparo <sup>42</sup>. De forma interessante, os efeitos protetores oriundos da ativação do receptor Mas via Ang-(1-7) são muito semelhantes aos observados pela estimulação do receptor  $AT_2$  <sup>43</sup>. De fato, estudos mostram que esses dois receptores produzem ações semelhante, como indução à liberação de Oxido Nítrico (NO) <sup>44,45</sup>, indução do remodelamento cardíaco após infarto <sup>37,46</sup> e efeito antiproliferativo. <sup>47,48</sup>

A Ang-(1-7) possui baixa afinidade para o receptor  $AT_2$  <sup>49</sup>, assim como diversos estudos mostram que efeitos da Ang-(1-7) não são influenciados por antagonistas do receptor  $AT_2$  <sup>7,12</sup>. Por outro lado, em certas condições e tecido, interações funcionais entre os receptores Mas e  $AT_2$  são observadas <sup>50-53</sup>. Os trabalhos sugerem uma participação do receptor  $AT_2$

nas ações mediadas pela Ang-(1-7), uma vez que o antagonista do receptor  $AT_2$ , PD123319, bloqueia os efeitos produzidos pela Ang-(1-7). No entanto, evidências mostram que esse antagonista, PD123319, não é específico para o receptor  $AT_2$ <sup>54,55</sup>. Recentemente, nosso grupo publicou dados que corroboram com esta ideia, observamos que o PD123319 bloqueou a ligação do novo peptídeo do RAS, Alamandina, ao receptor MrdD, assim como bloqueou o efeito vasorelaxante da Alamandina em animais nocaute para o receptor  $AT_2$ <sup>56</sup>.

Esses dados colocam em questionamento o uso do PD123319 como antagonista específico do receptor  $AT_2$ , tornando os dados de interação funcional entre os receptores Mas e  $AT_2$  pouco conclusivos. Desta forma, um estudo, sem o envolvimento do antagonista PD123319, com o objetivo claro de avaliar a interação Mas/ $AT_2$  torna-se necessário. Adicionalmente, como os receptores Mas e  $AT_2$  tem efeitos similares, avaliar por uma perspectiva sinérgica a interação dos receptores Mas e  $AT_2$  seria uma opção alternativa para abordar o estudo dessa possível interação sem usar o antagonista PD123319.

Interações dinâmicas entre proteínas são eventos comuns em sistemas biológicos<sup>57</sup>. Dimerizações, interações físicas entre proteínas, representam um importante subconjunto de interações proteína-proteína, sendo frequentemente responsáveis por transdução de sinais a partir da superfície da célula para o núcleo<sup>57</sup>.

Estudos recentes fornecem evidências da existência de homodímeros e heterodímeros entre os receptores acoplados a proteína G (GPCR) da superfamília de sete domínios (hélices) transmembrânicos (7TM)<sup>58</sup>. Os

GPCR são o tipo de receptor mais abundante no sistema cardiovascular<sup>58</sup> e heterodimerizações de importância fisiológica e patofisiológica são observadas dentre receptores do RAS. Um exemplo da importância fisiológica de dimerizações entre receptores do RAS foi demonstrado por Abdalla et al. 2001, onde a heterodimerização entre o receptor AT<sub>1</sub> e o receptor B2, para bradicinina, foi relacionada à pré-eclâmpsia. Eles demonstraram que há um aumento de heterodímeros AT<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia e que essa interação leva a um aumento da responsividade à angiotensina II<sup>59</sup>.

Interações envolvendo receptores do RAS e o receptor Mas ou o receptor AT<sub>2</sub> foram evidenciadas. Kostenis et al., demonstraram que o receptor Mas se heterodimeriza com o receptor AT<sub>1</sub>. A interação tem efeito antagônico sobre o receptor AT<sub>1</sub>, uma vez que os efeitos de produção de inositol-fosfato e liberação de cálcio intracelular mediados pela Ang II foram reduzidos a 50% após coexpressão com o receptor Mas. Em ensaio in vivo, camundongos nocaute para o receptor Mas (MaskO) possuem maior efeito vasoconstritor da Ang II em microvasos que os tipo selvagem (WT). A heterodimerização Mas/AT<sub>1</sub> não foi afetada pela estimulação ou inibição dos receptores<sup>60</sup>. Interações funcionais entre Ang-(1-7) e bradicinina são também observadas e sugerem uma interação entre o receptor Mas para Ang-(1-7) e o receptor B2 para bradicinina<sup>61,62</sup>.

Igualmente ao receptor Mas, o receptor AT<sub>2</sub> se heterodimeriza com o receptor AT<sub>1</sub>. O receptor AT<sub>2</sub> antagoniza, quando coexpresso ao AT<sub>1</sub>, os efeitos produzidos pela Ang II via AT<sub>1</sub><sup>63</sup>. A heterodimerização AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> está reduzida em biopsias de miométrio de mulheres grávidas. Adicionalmente, a



heterodimerização AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> não foi afetada pela administração de agonistas ou antagonistas dos receptores<sup>63</sup>. Outros estudos mostraram que o receptor AT<sub>2</sub> se heterodimeriza com o receptor B<sub>2</sub> para bradicinina<sup>64</sup>, assim como se homodimeriza<sup>65</sup>. Miura et al, demonstram que a homodimerização do receptor AT<sub>2</sub> é constitutiva e dependente de ligações dissulfeto na cisteína de posição 35 (N terminal) do receptor, visto que mutação específica nessa cisteína limita a homodimerização do receptor AT<sub>2</sub><sup>65</sup>. É possível que esse sítio de ligação dissulfeto esteja também envolvido em outras interações moleculares envolvendo o receptor AT<sub>2</sub>.

Levando em consideração as evidências de interações moleculares e funcionais envolvendo os receptores Mas ou AT<sub>2</sub> e que esses receptores possuem ações semelhantes que convergem para um papel protetor, uma possível interação molecular e funcional entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> mostra-se foco relevante de investigação. Deste modo, propomos estudar a interação entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> de forma molecular e funcional em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Uma técnica moderna e amplamente aceita para o estudo de interações moleculares entre receptores é a transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET)<sup>66</sup> também chamada de *Forster resonance energy transfer*. A técnica monitora à distância (até 10 nm) entre dois tipos de proteínas fluorescentes que devem ser acopladas às macromoléculas que se deseja estudar. O FRET envolve a transferência de energia, não-radiativa, da proteína fluorescente ciano (CFP) (doadora), em seu estado excitado, para proteína fluorescente amarela (YFP) (aceptora). A absorção de um fóton de luz pela fluorescência doadora induz um rearranjo da

estrutura electrónica da molécula, esta armazena uma parte da energia da luz absorvida tornando-se excitada e, após um curto período de tempo (picosegundos à milissegundos) a estrutura eletrônica da sonda relaxa e volta ao seu estado de equilíbrio. O relaxamento do estado excitado ao seu estado de equilíbrio ocorre com a emissão de um fóton de luz fluorescente a um comprimento de onda maior do que o comprimento originalmente absorvido. No entanto, a energia armazenada pelo doador em seu estado excitado pode ser transferida para outra sonda fluorescente (o "acceptor") sob certas condições; a energia liberada pelo doador deve sobrepor a energia de excitação do acceptor e a distância entre os dois não pode ultrapassar 10nm. Essencialmente, a distribuição de carga do doador excitado pode influenciar a estrutura eletrônica do acceptor e o excitar. Logo, durante o período de relaxamento do doador há a transferência "não-radioativa" de energia do doador para o acceptor, sem a emissão de um fóton pelo doador. A sonda acceptora, após excitada, irá prosseguir ao seu estado fundamental (relaxar), e assim emitir um fóton de luz. Logo, teoricamente a FRET é detectada quando uma amostra irradiada com luz de um comprimento de onda, que excita apenas o doador, emite o comprimento de onda específico do acceptor. É importante ressaltar que essas sondas fluorescentes são fundidas, no caso do nosso estudo, ao receptor Mas e AT<sub>2</sub>. Quando há FRET, os receptores fundidos às devidas fluorescências, estão a uma distância menor que 10nm (Figura 3), sugerindo assim, uma direta interação molecular entre eles .

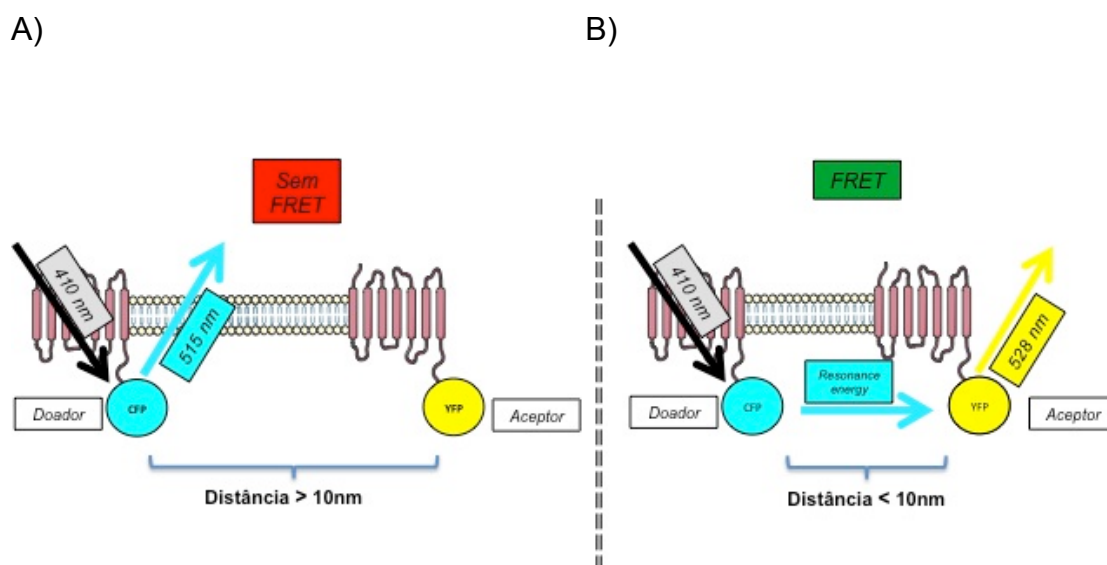


Figura 3. Ilustração esquemática do ensaio de FRET. Em (A) os complexos receptor mais proteína fluorescente, doadora e aceptor, estão a uma distancia maior que 10nm, neste caso não há FRET. Em (B) os complexos proteicos estão a uma distancia menor que 10nm, havendo então passagem de energia ressonante de fluorescência doadora para a aceptor, ocorrendo assim a FRET.

Para estudar a interação dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> de forma funcional, propomos usar como base efeitos observados pela estimulação do receptor Mas e AT<sub>2</sub>, separadamente, comparando-os com um possível efeito sinérgico da estimulação concomitante dos mesmos. Os ensaios escolhidos para estudo da interação funcional Mas/AT<sub>2</sub> foram a modulação do barorreflexo, a modulação do tônus vascular em anéis aórticos e a liberação de óxido nítrico em células de ovário de hamster chinês (CHO) que expressam, via transfecção estável, o receptor Mas. É importante destacar, que nos ensaios funcionais testados os resultados para ativação separada do receptor Mas são conhecidos. Silva e cols. 2001 demonstraram que a ativação central do receptor Mas via infusão intra-cérebro ventricular (ICV) de Ang-(1-7) não

modifica os níveis basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), porém, produz aumento do controle reflexo barorreceptor em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)<sup>67</sup>. Adicionalmente, em camundongos nocaute para o receptor Mas, o reflexo barorreceptor está significativamente reduzido<sup>68</sup>. A ativação do receptor Mas via Ang-(1-7) em anéis aórticos de camundongos e ratos produz um significativo efeito vasorelaxante que não é observado em camundongos nocaute para o receptor Mas. Células CHO que expressam estavelmente o receptor Mas têm maior liberação de óxido nítrico após a administração de Ang-(1-7).

Outra forma de estudar a interação funcional entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> é através de experimentos em animais transgênicos. Modelos animais geneticamente modificados tem proporcionado um novo e poderoso instrumento para estudar de forma *in vivo* o papel fisiológico de receptores. Esta técnica permite estudar a função do gene de interesse em um ambiente fisiológico, assim como evita os efeitos colaterais produzidos por inibidores farmacológicos. Separadamente, foram desenvolvidos camundongos nocaute para o receptor Mas<sup>27,28</sup> e para o AT<sub>2</sub><sup>69,70</sup>. Fato que viabilizou expandir o conhecimento sobre o funcionamento desses receptores, porém de forma separada. Assim, animais duplo nocaute (DKO) para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> serão instrumento chave para avaliar a importância da interação entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>. Porém, como descrito anteriormente, animais nocaute desenvolvidos em diferentes background C57BL/6 ou FVB/N apresentam fenótipos diferenciados. Assim, para obtermos um espectro amplo das possíveis alterações fenotípicas produzidas pelo duplo nocaute

dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>, camundongos duplo nocaute em dois diferentes background (C57BL/6 ou FVB/N ) deverão ser desenvolvidos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

- Avaliar a hipótese de interação entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>, de forma molecular e funcional.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

**a)** Avaliar a hipótese de interação em ensaios *in vitro* por:

- Transfecções em células embrionárias de rim (HEK) e em células de ovário de hamster chinês (CHO)
- Ensaio biológico em anéis de aorta de ratos normotensos.

**b)** Avaliar a hipótese de interação em ensaios *in vivo* por:

- Avaliação de respostas cardiovasculares em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e em camundongos geneticamente modificados.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Amplificação de DNA por PCR**

Os iniciadores (*primers*) utilizados neste trabalho (Tabelas 1 e 2) foram sintetizados pela companhia Tibmolbio (Berlim, Alemanha), diluídos em água deionizada e estocados a -20°C. A utilização de cada iniciador está indicada na Tabela 1. As amplificações de regiões específicas de DNA para clonagem em vetores foram feitas a partir de 100 ng dos vetores, em reações de 50 µL

contendo 10 pmol de iniciador senso, 10 pmol de iniciador antisenso, 100  $\mu$ M de cada dNTP, 10 x Tampão de amplificação pfx, 50 mM MgCl<sub>2</sub> e 2.5 U Platinum® *Pfx* DNA Polimerase (invitrogen).

O PCR foi realizado para a inserção das sequências das enzimas de restrição adequadas para a subclonagem dos produtos que codificam o receptor Mas ou AT<sub>2</sub>, nos vetores que possuem as sequências para o YFP ou CFP. Foi usado como molde os vetores que expressam o receptor MAS ou AT<sub>2</sub> da companhia (imagenes-bio, Alemanha).

### **3.2. Purificação de DNA a partir de gel de agarose**

Fragmentos amplificados por PCR ou produtos de digestão enzimática (enzima de restrição) foram purificados, após corrida em gel de agarose 1%, utilizando o kit Nucleo Spin Extract II. O DNA purificado foi quantificado usando o espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop(TM) 1000 UV/VIS).

### **3.3. Digestão de DNA com enzimas de restrição**

A digestão dos vetores foi realizada na proporção de 20 unidade da enzima de restrição para cada 1  $\mu$ g de DNA, na presença do tampão indicado pelo fabricante a 37°C por 4 horas ou durante a noite. Os fragmentos obtidos a partir da digestão dos vetores foram visualizados em gel de agarose 1% e purificados utilizando o sistema descrito no item anterior.

### 3.4. Vetor e clonagem dos fragmentos de DNA

Neste trabalho, subclonamos os produtos que codificam o gene para a expressão do receptor Mas ou AT<sub>2</sub>, no vetor pcDNA3.1, que contém a sequência para expressão da proteína fluorescente amarela (YFP) ou da proteína fluorescente ciano (CFP) (cedido pelo grupo do professor Gerd Multhaup da *Freie Universitat* de Berlin). Os produtos que codificam o gene para a expressão do receptor Mas ou AT<sub>2</sub> foram também subclonados em vetores pcDNA3.1 que não contém a sequência para CFP ou YFP.

Vetores pcDNA3.1 possuem gene de resistência à ampicilina, assim bactérias transformadas por esse vetor podem ser selecionadas, pois são resistentes à ampicilina. O vetor pcDNA3.1 possui sítio múltiplo de clonagem que viabiliza subclonagem de fragmentos de DNA em regiões específicas.

### 3.5. Ligação dos fragmentos de DNA

Após a digestão com as enzimas de restrição apropriadas e purificação em gel de agarose 1%, os fragmentos de DNA foram clonados nos vetores pcDNA3.1, que também passaram por digestão com as devidas enzimas de restrição. A reação de ligação foi realizada a 16°C durante a noite com 0.5 - 1µg de DNA de vetor na presença de 10 unidades de T4 DNA ligase (Invitrogen) e do tampão indicado pelo fabricante. A quantidade de DNA de inserto a ser usada na reação de ligação foi calculada através da fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto em Kb}}{\text{tamanho do vetor em Kb} \times \text{razão inserto:vetor}}$$

A razão inserto/vetor utilizada foi de 3:1 ou 5:1.

### **3.6. Transformação de *Escherichia coli***

Células de *E. coli* termocompetentes TOP10 (Invitrogen) foram transformadas pelo método de choque térmico<sup>71</sup>. O processo de transformação foi feito da seguinte forma: 2 µL do produto de ligação e 25-50 µL de células competentes foi adicionado em microtubo, misturado e incubado em gelo por 30 minutos. Em seguida, o microtubo foi incubado a 42°C em banho-maria por 45 segundos e, posteriormente, incubado no gelo por 2 minutos. Foi adicionado 450 µL de meio SOC à temperatura ambiente e incubado em seguida por 2-3 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (100 µg/mL). As células foram incubadas em estufa a 37°C por 12-16 horas para então seleção das colônias.

### **3.7. Extração dos Vetores**

As colônias foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas para falcons contendo 3-5 ml (miniprep) ou Erlenmeyer 300-500 ml (maxiprep) de meio LB com 100 µg/µl do antibiótico ampicilina. A mistura foi posteriormente incubada sob agitação orbital a 320 rpm, 37°C, por 12-16 horas. A extração dos vetores, para posterior utilização, foi realizada usando os kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ou a mesma versão para Maxipreps (Qiagen), seguindo orientações do fabricante.



### 3.8. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de produtos amplificados por PCR ou vetores foi realizado através do serviço de sequenciamento da Free Universidade de Berlin.

Usando o método descrito por Sanger <sup>72</sup>.

### 3.9. Transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET)

#### - Desenvolvimento de vetores de expressão adequados para o estudo do FRET

Desenvolvemos vetores (Tab 4) que expressam a proteína aceptora fluorescente, proteína fluorescente amarela, *yellow fluorescent protein* (YFP) ou a doadora, proteína fluorescente ciano, *cyano fluorescente protein* (CFP), fundidas aos receptores Mas ou AT<sub>2</sub> (Fig 4) . O vetor usado para as subclonagens foi o pcDNA3.1. Vetores contendo a sequência para a transcrição da YFP ou CFP foram cedidos pelo grupo do Prof. Gerd Multhaup da Freie Universität de Berlin.

A subclonagem foi realizada de forma que as proteínas fluorescentes fossem fundidas ao C terminal dos receptores MAS ou AT<sub>2</sub>, exemplo: YFP fundido ao C terminal do receptor MAS. Seguindo este principio, desenvolvemos os seguintes vetores: MAS+YFP; MAS+CFP; AT<sub>2</sub>+YFP; AT<sub>2</sub>+CFP; MAS sem fluorescência e AT<sub>2</sub> sem fluorescência. Adicionalmente, para avaliar o possível sitio de interação entre os receptores MAS e AT<sub>2</sub> fizemos um vetor com uma mutação pontual na cisteína 35 (N terminal) do receptor AT<sub>2</sub> fundido ao YFP. O vetor que leva a expressão do receptor de potencial

transitório catiónico tipo 6 (TRPC6), cedido pelo grupo do Prof. Gerd Multhaup da Freie Universität de Berlim, foi usado como controle.

Os iniciadores (*primers*) utilizados neste trabalho (tabela 1) foram desenhados de forma a parearem com as extremidades 3' do molde de interesse. Nas extremidades 5' dos iniciadores foram colocadas sequências reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição (sítios de restrição), de acordo com a estratégia de clonagem e vetor utilizado. Os iniciadores foram sintetizados pela companhia Tibmolbio (Berlim, Alemanha), diluídos em água deionizada e estocados a -20°C. A utilização de cada iniciador está indicada na tabela 2.

Tabela-1 Sequência dos indicadores usados no trabalho para clonagem e PCR em tempo real.

<b>Indicadores</b>	<b>Sequência (5'→3')</b>
MAS_NotI_senso	<u>GCGGCCGCGCCTCCTCATGGATGGGTCA</u>
AT2_NotI_senso	<u>GCGGCCGCATGAAGGGCAACTCCACCCT</u>
MAS_EcoRI_senso	<u>GAATTCGCCTCCTCATGGATGGGTCAAA</u>
MAS_EcoRV_anti-senso	<u>GATATCAAGGACGACAGTCTCAACTG</u>
AT2_EcoRI_senso	<u>GAATTCGCCACCATGAAGGGCAACTCCA</u>
AT2_EcoRV_anti-senso	<u>GATATCGTTAGACACAAAGGTCTCCATT</u>
MAS_XbaI_com codon stop	<u>TCTAGATTAGACGACAGTCTCAACTGTG</u>
AT2_XbaI_com codon stop	<u>TCTAGATTAAGACACAAAGGTCTCC</u>
AT2-YFP-C35-Mut-senso	AGTCTACCTTGAAC <b>GCCT</b> CACAGAAACCAT

AT2-YFP-C35-Mut- antisenso	ATGGTTTCTGTGAG <b>GGCGTT</b> CAAGGTAGACT
-------------------------------	--

Tabela 2. Fragmentos amplificados pelos diferentes pares de iniciadores utilizados

<b>Pares de indicadores</b>	<b>Fragmento amplificado</b>	<b>Utilização</b>
MAS_EcoRI_senso MAS_EcoRV_anti-senso	Gene para o mRNA do receptor Mas sem <i>stop</i> <i>códon</i> + sítios para enzimas de restrição	Subclonagem do receptor Mas no vetor pcDNA3.1 que contém YFP ou CFP.
AT2_EcoRI_senso AT2_EcoRV_anti-senso	Gene para o mRNA do receptor AT <sub>2</sub> sem <i>stop</i> <i>códon</i> + sítios para enzimas de restrição	Subclonagem do receptor AT <sub>2</sub> no vetor pcDNA3.1 que contém YFP ou CFP.
MAS_NotI_senso MAS_XbaI_anti-senso_com stop	Gene para o mRNA do receptor MAS com <i>stop</i> <i>códon</i> + sítios para enzimas de restrição	Clonagem do receptor Mas no vetor pcDNA3.1.
AT2_NotI_senso AT2_XbaI_com stop	Gene para o mRNA do receptor AT <sub>2</sub> com <i>stop</i> <i>códon</i> + sítios para enzimas de restrição	Clonagem do receptor AT <sub>2</sub> no vetor pcDNA3.1.
AT2-YFP-C35-Mut-	Foi amplificado todo o	Vetor AT2YFP com a

senso AT2-YFP-C35-Mut- antisenso	vetor AT2YFP inserção de uma mutação pontual.	cisteína 35 ( N term.) mutada para uma alanina
--	---	--

#### - Transfecção de células HEK293

Células HEK293 foram plaqueadas em lamínulas de vidro 72h, antes do experimento. 24 horas antes do experimento, as células foram transfectadas em meio sem FBS, usando para cada transfecção: 6ug do reagente de transfecção Polyethyleneimine (PEI) e 3ug DNA plasmidiano total. Após 12-24h de transfecção, as lamínulas foram retiradas e colocadas numa câmara própria para microscopia em células vivas com o Hapes buffer: 128mM NaCl / 6mM KCl / 1mM MgCl<sub>2</sub> / 5,5mM Glucose / 10mM Hapes / 1mM CaCl<sub>2</sub> / BSA 0,2% / pH 7,4 a 37°C.

#### - Aquisição do FRET por queima do acceptor

Para a aquisição da eficiência do FRET usamos um microscópio epifluorescente (Leica Microsystems, Alemanha) com uma objetiva 63x/1.4 e o programa *Laica application suite advanced Fluorescence (LAS AF)* foi usado para as mensurações, após 12-16 horas de transfecção das células HEK293. Uma luz monocromática, derivada de uma lâmpada de Xenônio, foi passada por um espelho dicrômico, de dupla reflexão, para excitação das proteínas fluorescentes. Os sinais fluorescentes passaram por filtros 475-

505-nm (CFP) ou 535-565-nm (YFP) e foram detectados por uma câmera digital *charge-coupled device* (CCD). As eficiências do FRET foram determinadas usando o método de queima do aceptor. A eficiência  $E$  foi calculada usando a equação  $E = 1 - (FDA/FD)$ , onde FDA representa a mensuração da flúor foi escência CFP, antes da queima do YFP, e FD representa a fluorescência do CFP após a queima do aceptor YFP. FD foi obtido por uma regressão linear do aumento da fluorescência do CFP com a diminuição do YFP e extrapolação para zero de fluorescência do YFP, i.e queima completa do YFP. CFP e YFP foram excitados a 410 e 515 nm, respectivamente.

#### - Mutagenese in vitro: Seleção de Mutantes com DpnI

A PCR foi realizada usando o vetor AT<sub>2</sub>YFP como molde, a platinum taq DNA polymerase (Invitrogen) e os iniciadores indicados na tabela 1 e 2 (ambos contendo a sequência para a mutação desejada de forma complementar). Os produtos da reação de amplificação linear foram tratados com a enzima de restrição DpnI. A DpnI digere o DNA metilado, utilizado como molde que foi gerado após transformação em bactérias, mas não digere o DNA sintetizado durante o curso da reação de PCR (não metilado). O DNA mutado, contido no vetor que possui a sequência para resistência à ampicilina, foi selecionado após transformação em bactérias termo-competentes E.coli Top10 plaqueadas em placas de ágar contendo ampicilina.

### - FRET dinâmico

Os experimentos de FRET dinâmico foram realizados em um microscópio epifluorescente ( Leica Microsystems, Alemanha). As mensurações de FRET foram realizadas usando o método *FRET emission*<sup>73</sup>, onde é mensurado um *shift* da emissão do CFP para o espectro de emissão do YFP. Para isso, são utilizados para calcular o valor da FRET os valores de intensidade de três imagens, gravados em um mesmo tempo de exposição: CFP (CFP excitação / CFP emissão ); FRET (CFP excitação / YFP emissão) e YFP (YFP excitação / YFP emissão).

Os valores de FRET foram calculados utilizando o programa LAS AF application suite (Leica Microsystems, Germany).

### **3.10. Animais**

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 250g a 350g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram usados para os experimentos de infusão ICV. Para o estudo em vasos usamos ratos Wistar machos normotensos.

Para o desenvolvimento dos camundongos transgênicos duplo nocaute (DKO) para o receptores Mas/AT<sub>2</sub> em dois *backgrounds* diferentes, cruzamos camundongos C57BL6 nocaute para o receptor Mas com camundongos C57BL6 nocaute para o receptor AT<sub>2</sub>, mantidos no *Animal House da universidade de medicina Charité de Berlim*. O cruzamento desses

animais nos forneceu não só os animais duplo nocaute MAS/AT<sub>2</sub>, mas também os que utilizamos como controle, o animal tipo selvagem (WT) e os animais MaskO e AT<sub>2</sub>KO. Da mesma forma que foi realizada para os animais C57BL6, desenvolvemos animais duplo nocaute Mas/AT<sub>2</sub> em camundongos FVB/N, no biotério de animais transgênicos do laboratório de Hipertensão-ICB-UFMG. Após desenvolvidos, os animais foram utilizados com idade entre 4 e 6 meses.

### **3.11. Canulação e infusão Intracerebroventricular em ratos**

Os ratos SHR foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg i.p., suplementados quando necessário) para implante de cânulas-guia (agulha 25G, 16mm) unilateralmente em um dos ventrículos laterais. Para realização do procedimento de implante das cânulas guia, os ratos foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, IL, USA) com a barra incisora fixada a -3.3mm da linha interaural. A cânula-guia foi posicionada usando o bregma como ponto de referência, de acordo com as coordenadas determinadas pelo atlas de Paxinos e Watson,<sup>58</sup> ventrículo lateral: -1,0 mm posterior, -1,5 mm lateral e -3,0 mm ventral. A cânula-guia foi fixada usando acrílico dental autopolimerizável, o qual foi ancorado por dois parafusos fixados na calota craniana do rato. Em seguida, os animais foram colocados em caixas coletivas, com água e ração à vontade, por um período de 5 a 7 dias, para recuperação da cirurgia.

A infusão intracerebroventricular (ICV) foi realizada com auxílio de uma microseringa Hamilton de volume 10ul, acoplada a uma bomba de infusão

(modelo Pump11 da Harvard Apparatus). A velocidade de infusão foi mantida em 7.5ul/hora. Imediatamente antes da infusão foi injetado lentamente (~1 min) um volume de 3ul pela cânula ICV da droga para o preenchimento do espaço morto.

### **3.12. Canulação da artéria e veia femoral em ratos**

As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno (PE-10) (4cm para a artéria e 2cm para veia) soldado a outro tubo de polietileno (PE-50) (15 cm). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/Kg) e as cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, através da artéria femoral. A veia femoral foi também canulada para infusão de drogas. Uma vez implantadas, com auxílio de um trocater, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca, e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas.

### **3.13. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos**

Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados no dia seguinte ao da canulação, em animais não-anestesiados e



com livre movimentação. A cânula arterial, previamente heparinizada, foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital (Biopac Systems, Inc.). Foi utilizado o programa de computador Acqknowledge (Biopac Systems, Inc.), após prévia calibração do equipamento, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). PAM e a FC foram calculadas, pelo programa, a partir dos valores de PAP.

### **3.14. Estimulação dos barorreceptores arteriais e avaliação da sensibilidade do barorreflexo em ratos**

Para a estimulação dos barorreceptores arteriais foram realizadas injeções intravenosas em bôlus (0,1ml) de soluções de fenilefrina (0.5-5 µg/ml) ou nitroprussiato de sódio (NPS, 5-40µg/ml), através de seringa 1ml conectada ao cateter venoso. A sensibilidade do barorreflexo (Fig 4) foi avaliada pela razão entre as alterações reflexas de FC, convertidas em intervalo de pulso ( $IP = 60.000/FC$ ), induzidas por alterações transitórias da PAM ( $\Delta IP/\Delta PAM$ , ms/mmHg)<sup>74</sup>. A infusão de fenilefrina induz a bradicardia barorreflexa e a infusão do nitroprussiato de sódio a taquicardia barorreflexa.

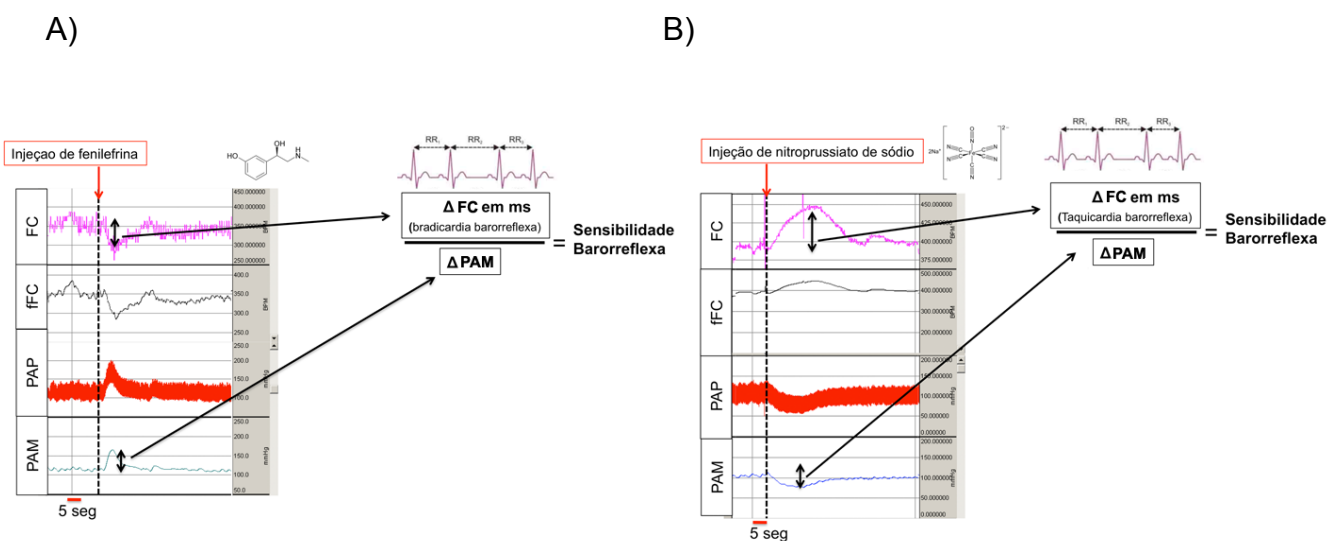


Figura 4. Avaliação da sensibilidade barorreflexa em traçado de registro da frequência cardíaca, FC; frequência cardíaca filtrada, fFC; Pressão arterial de pulso, PAP e pressão arterial média, PAM. A) Sensibilidade barorreflexa induzida pela administração intravenosa (i.v) de fenilefrina. B) Sensibilidade barorreflexa induzida pela administração i.v de nitroprussiato de sódio em rato wistar. Seta vermelha indica o momento da injeção das drogas.

### 3.15. Cultura e tratamento celular

Células HEK293 e CHO cresceram em meio DMEM-F12 (Sigma, Steinheim, Alemanha) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e 100 unidades/ml de estreptomicina em incubador com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar ambiente.

### 3.16. Reatividade vascular em anéis aórticos de ratos

Anéis da aorta torácica descendente (2 mm) de ratos Wistar, livres de tecido

adiposo e conjuntivo, foram montados e incubados com 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> em solução de Krebs-Henseleit, sob uma tensão de 0,5 g. Foi dado um período de 1 h para estabilização. A presença de endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina [ACh] (10 µM) em induzir mais de 70% de relaxamento de vasos pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µM). Os anéis (4mm) foram estabilizados com 1,0 g de tensão. A atividade mecânica foi registada isometricamente por um transdutor de força (Precision Instruments Mundo, Inc., Sarasota, FL, EUA) alimentado a um amplificador gravador (modelo TMB-4; Precision Instruments Mundo, Inc.) e a um computador equipado com um conversor analógico-digital conversor placa (AD16JR; Mundial Precision Instruments, Inc.), utilizando software de aquisição de dados CVMs / gravação (Precision Mundial Instruments, Inc.).

Os vasos foram pré-contraídos com concentrações submáximas de fenilefrina (0,1 µM). As drogas testadas foram adicionadas em concentrações crescentes cumulativas, uma vez que a resposta à fenilefrina se estabilizou.

### **3.17. Avaliação da liberação de óxido nítrico (NO) em células**

#### **CHO transfectedas**

Células de ovário de Hamster chinês (CHO) que expressam estavelmente o receptor Mas foram confeccionadas usando o método de transfecção estável por seleção via resistência à neomicina<sup>71</sup>. As células foram cultivadas em meio D-MEM-F12 e cresceram em lamínulas de vidro até 80-90% de confluência. Para a quantificação da liberação de óxido nítrico (NO), foi usado o reagente 4-amino-5-metilamino-2,7-diacetato de

difluorofluorescein (DAF-FM). O DAF-FM, após reagir com o NO, forma um benzotriazol fluorescente com excitação/emissão máxima de 495/515nm. Imagens fluorescentes foram obtidas utilizando um microscópio confocal, laser Zeiss LSM 510 META com frequência de excitação de 488 nm, utilizando o laser de ion árgon (lente da objectiva de imersão em óleo: x63). O nível de fluorescência emitido pela célula foi avaliado através do programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java; NIH-USA).

### **3.18. Genotipagem dos camundongos:**

Todos os animais, procedentes do cruzamento entre os animais MaskO e AT<sub>2</sub>KO, foram genotipados. Uma pequena amostra da calda de cada camundongo foi misturada a 70ul de TAE (1x) e 10ul de Proteinase K para extração do DNA genômico. Para cada animal foram necessárias quatro reações de PCR, uma para cada genótipo pesquisado, MaskO, MasWT, AT<sub>2</sub>KO ou AT<sub>2</sub>WT. A PCR foi realizada com 2 ul do DNA genômico (DNAg) de cada animal, 10 pmol dos primers apropriados (tabela 3), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq polimerase, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5ul de 10x PCR Buffer (Invitrogen) em uma solução final de 50ul. Após a reação de PCR, 20ul de cada amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE 1x acrescido de brometo de etídio.

**Tabela 3.** Sequência dos indicadores usados para genotipar os animais duplo nocaute.

<b>Indicadores</b>	<b>Sequência (5'→3')</b>	<b>Temp. De Anelamento</b>	<b>Utilização</b>
MAS10	gtacagcttcgaagaatgggaggccc	63°C	Identificar o MASWT
MAS14	cctaactgagccaccctcacc		
<b>MAS12</b>	<b>gccgttgccctcctggcgcctggg</b>	60°C	Identificar o MASKO
<b>NeoPVU</b>	<b>ggcagcgcggctatcgtgg</b>		
AT23	gaactacataagatgcttgccagg	53°C	Identificar o AT2WT
AT25	ccaccagcagaaacattacc		
<b>AT23</b>	<b>gaactacataagatgcttgccagg</b>	65°C	Identificar o AT2KO
<b>NeoPVU</b>	<b>ggcagcgcggctatcgtgg</b>		

### **3.19. Canulação das artérias carótida e femoral em camundongos transgênicos.**

Camundongos foram anestesiados por ketamina IP (100 mg / kg) e xilazina (10 mg/kg). Para o cateter da artéria carótida usamos um tubo de silicone, Micro-Renathane MRE-025 (Braintree Scientific Inc., Braintree, MA, USA) (25mm) soldado a um tubo de polietileno (PE-50) (Portex, Hythe, UK) (15 mm). O cateter da artéria femoral foi feito a partir de tubo de silicone (MRE-025) (35 mm) ligado a um tubo de polietileno (PE-50) de 50 mm. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Uma vez implantadas, com auxílio de um trocater, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula da artéria femoral foi utilizada para registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca, e a da artéria

carótida foi utilizada para administração de acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio (SNP).

### **3.20. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute Mas/AT<sub>2</sub>**

Dois dias após o implante das cânulas, em animais acordados, a função endotelial foi avaliada por medição das alterações na pressão arterial média (PAM), em resposta à administração, em bolus (1ul/10g de peso corporal), de acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio (SNP) via artéria aorta torácica. As substâncias foram administradas nas seguintes doses: ACh (Sigma-Aldrich) 25, 50, 100, e ng/kg de peso corporal, e 1, 3, e 10 ug / kg para o SNP (Sigma-Aldrich). Para avaliar a função da musculatura lisa vascular, como também corrigir as diferenças na reatividade do músculo liso vascular a resposta à ACh foi normalizada pela resposta ao SNP (10ug / kg) de acordo com a fórmula,  $\Delta\text{MAP (ACh)} / \Delta\text{MAP (SNP)}$ .

## 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 4.1. Avaliação de interação molecular envolvendo os receptores

#### Mas e AT<sub>2</sub> via FRET por queima do acceptor.

Para todos os experimentos de aquisição do FRET por queima do acceptor, o seguinte protocolo foi realizado: primeiramente, as células transfectadas foram submetidas a 15 ciclos de aquisição dos sinais fluorescentes controles para CFP e YFP com 40 e 8 ms de iluminação, respectivamente. Após isso, foram realizadas, a 512 nm de iluminação, 43 sessões de queima do YFP, com duração de 1.8 segundos por sessão. Após cada ciclo de queima do YFP, foram avaliados os sinais fluorescentes do CFP e YFP, da mesma forma que na fase controle. Para assegurar medida de FRET padronizada, a intensidade relativa de fluorescência emitida durante a coexpressão (YFP:CFP) de  $(3 \pm 0.5)$  foi estabelecida para todos os grupos testados. O máximo de três campos por lâmina foi avaliado em, no mínimo, três transfecções independentes.

A tabela 4 mostra os vetores transfectados e a utilização destes nos diversos protocolos de FRET realizados. Abaixo, descreve-se cada protocolo usado no ensaio de FRET por queima do acceptor:

#### Identificar a Heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>

##### *Heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>*

Para identificar a heterodimerização entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>, avaliamos em células HEK293, a eficiência da FRET após expressão concomitantemente do receptor Mas e do receptor AT<sub>2</sub>, fundidos às proteínas

fluorescente CFP e YFP, respectivamente. A quantidade final de DNA usada para transfecção foi sempre 3ug.

#### *Competição da heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>*

Com a finalidade de avaliar a especificidade da interação Mas/AT<sub>2</sub>, expressamos os receptores fluorescentes, necessários para a média de FRET, juntos com os receptores Mas e AT<sub>2</sub> sem fluorescência, incompatíveis para a medida de FRET. Usamos metade da quantidade total dos vetores (1.5ug) para expressar os receptores fluorescentes e a outra metade (1.5ug) com os receptores sem fluorescência. Sendo a heterodimerização específica, os receptores não fluorescentes devem competir com os fluorescentes, reduzindo assim a FRET medida.

#### *Heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> com menor concentração de Vetor transfectado*

Para avaliar se, no protocolo de competição acima, a redução da quantidade dos vetores usados para expressar os receptores fluorescentes pode alterar a medida da FRET, 1.5ug dos vetores que levam a expressão dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> fluorescentes, foram transfectados juntamente com 1.5ug do vetor vazio, pcDNA3.1.

#### *Heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> com mutação no receptor AT<sub>2</sub>.*

Para avaliar se a mutação na cisteína 35 do receptor AT<sub>2</sub> interfere na heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>, avaliamos a eficiência da FRET após expressão concomitantemente dos receptores fluorescentes Mas e AT<sub>2</sub> (mutado).



## Identificar a Homodimerização do receptor Mas

### *Homodimerização do receptor Mas*

Para identificar a homodimerização do receptor Mas, expressamos, em células HEK293, o receptor Mas fluorescente MasYFP e MasCFP, necessário para a medida de FRET. A quantidade final de DNA usado para transfecção foi sempre 3ug.

### *Competição da homodimerização do receptor Mas*

Com a finalidade de avaliar a especificidade da homodimerização do receptor Mas, expressamos o receptor Mas fluorescente MasYFP e MasCFP, necessários para a medida de FRET, junto com o receptor Mas sem fluorescência, incompatível para a medida de FRET. Usamos metade da quantidade total dos vetores (1.5ug) para expressar o receptor fluorescente e a outra metade (1.5ug) com o receptor sem fluorescência. Sendo a homodimerização específica, o receptor não fluorescente deverá competir com os fluorescente, reduzindo assim a FRET medida.

### *Homodimerização do receptor Mas com menor concentração de vetor transfectado*

Para avaliar se no protocolo de competição acima a redução da quantidade dos vetores usados para expressar o receptor fluorescente pode alterar a medida da FRET, 1.5ug dos vetores que levam a expressão do receptor Mas fluorescente (MasCFP e MasYFP), foram transfectados juntamente com 1.5ug do vetor vazio, pcDNA3.1.

*Avaliar heterodimerização entre receptor Mas e o receptor de potencial transitório catiônico tipo 6 (TRPC6)*

Para confirmar especificidade de dimerização envolvendo o receptor Mas, avaliamos a heterodimerização entre os receptores Mas e um outro receptor de membrana, o receptor de potencial transitório catiônico tipo 6 (TRPC6). A eficiência da FRET, após expressão concomitantemente do receptor Mas e do TRP6, fundidos às proteínas fluorescente CFP e YFP respectivamente, foi medida.

Identificar a Homodimerização do receptor AT<sub>2</sub>

*Homodimerização do receptor AT<sub>2</sub>*

Para identificar a homodimerização do receptor AT<sub>2</sub>, expressamos em células HEK293, o receptor AT<sub>2</sub> fluorescente AT<sub>2</sub>YFP e AT<sub>2</sub>CFP, necessário para a medida de FRET. A quantidade final de DNA usado para transfecção foi sempre 3ug.

*Competição da homodimerização do receptor AT<sub>2</sub>*

Com a finalidade de avaliar a especificidade da homodimerização do receptor AT<sub>2</sub>, expressamos o receptor AT<sub>2</sub> fluorescente AT<sub>2</sub>YFP e AT<sub>2</sub>CFP, necessários para a medida de FRET, junto com o receptor Mas sem fluorescência, incompatível para a medida de FRET. Usamos metade da quantidade total dos vetores (1.5ug) para expressar o receptor fluorescente e a outra metade (1.5ug) com o receptor sem fluorescência. Sendo a

homodimerização específica, o receptor não-fluorescente deverá competir com os fluorescente, reduzindo assim a FRET medida.

*Homodimerização do receptor AT<sub>2</sub> com menor concentração de vetor transfectado*

Para avaliar se no protocolo de competição acima a redução da quantidade dos vetores usados para expressar o receptor fluorescente pode alterar a medida da FRET, 1.5ug dos vetores que levam a expressão do receptor AT<sub>2</sub> fluorescente (AT<sub>2</sub>CFP e AT<sub>2</sub>YFP) foram transfetados juntamente com 1.5ug do vetor vazio, pcDNA3.1.

*Homodimerização do receptor AT<sub>2</sub> mutado.*

Para avaliar se a mutação na cisteína 35 do receptor AT<sub>2</sub> interfere em sua homodimerização, avaliamos a eficiência da FRET após expressão concomitantemente do receptor AT<sub>2</sub> (mutado) com o AT<sub>2</sub> não mutado, ambos fundidos com as devidas fluorescências.

*Avaliar heterodimerização entre receptor AT<sub>2</sub> e o receptor de potencial transitório catiônico tipo 6 (TRPC6)*

Para confirmar especificidade de dimerização envolvendo o receptor AT<sub>2</sub>, avaliamos a heterodimerização entre os receptores AT<sub>2</sub> e um outro receptor de membrana, o receptor de potencial transitório catiônico tipo 6 (TRPC6). Foi mensurada a eficiência da FRET, após expressão

concomitantemente do receptor AT<sub>2</sub> e do TRPC6, fundidos às proteínas fluorescente CFP e YFP, respectivamente.

Tabela 4. Combinação dos diferentes vetores transfectados em HEK e sua finalidade no ensaio de FRET

<b>Vetores Transfectados</b>	<b>Dna total</b>	<b>Utilização</b>
MasCFP + AT <sub>2</sub> YFP	3ug	Identificar a Heterodimerização MAS/AT <sub>2</sub>
MasYFP + MasCFP	3ug	Identificar Homodimerização do MAS
AT <sub>2</sub> YFP + AT <sub>2</sub> CFP	3ug	Identificar Homodimerização do AT <sub>2</sub>
MasCFP + AT <sub>2</sub> YFP Mas-0 + AT <sub>2</sub> -0	3ug	Competição: Avaliar especificidade da Heterodimerização
MasCFP + AT <sub>2</sub> YFP PcDNA3.1	3ug	Identifica a Heterodimerização Mas/AT <sub>2</sub> usando a mesma concentração dos vetores fluorescentes realizada na competição
MasCFP + MasYFP Mas-0	3ug	Competição: Identificar especificidade da Homodimerização do MAS
MasCFP + MasYFP PcDNA3.1	3ug	Identifica a Homodimerização do Mas usando a mesma concentração dos vetores fluorescentes realizada na competição
AT <sub>2</sub> CFP + AT <sub>2</sub> YFP AT <sub>2</sub> -0	3ug	Competição: Identificar especificidade da Homodimerização do AT <sub>2</sub>
AT <sub>2</sub> CFP + AT <sub>2</sub> YFP PcDNA3.1	3ug	Identifica a Homodimerização do Mas usando a mesma concentração dos vetores fluorescentes realizada na competição
MasCFP + AT <sub>2</sub> (Mut)YFP	3ug	Influencia da mutação da cisteína 35' do AT <sub>2</sub> na Heterod.
AT <sub>2</sub> CFP + AT <sub>2</sub> (Mut)YFP	3ug	Influencia da mutação da cisteína 35' do AT <sub>2</sub> na Homodimerização do AT <sub>2</sub>
MasCFP + TRP6YFP	3ug	Avaliar a heterodimerização do MAS a um outro receptor co-expresso
AT <sub>2</sub> CFP + TRP6YFP	3ug	Avaliar a heterodimerização do AT <sub>2</sub> a um outro receptor co-expresso

#### **4.2. Efeito da administração dos agonistas dos receptores Mas ou AT<sub>2</sub> na heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> via FRET dinâmico**

Para avaliar se a heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> pode ser afetada pela ativação dos receptores Mas ou AT<sub>2</sub>. Células HEK293, foram co-transfectadas para expressar os receptores MasCFP e AT<sub>2</sub>YFP. As medidas de FRET dinâmico foram realizadas uma por segundo. Um período controle de 50 segundos foi primeiramente realizado e, após isso, os agonistas Ang-(1-7) (10<sup>-6</sup>M) ou C21(10<sup>-6</sup>M), foram administrados e a FRET foi medida por mais 400 segundos.

#### **4.3. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e da sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR após estimulação concomitante ou separada dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>.**

Com o objetivo de investigar *in vivo* a interação Mas/AT<sub>2</sub>, avaliamos se a estimulação concomitante dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> se difere da ativação separada de cada receptor. Após um período de 30-60 minutos para estabilização dos níveis basais de PAM e FC, ratos SHR acordados foram submetidos à avaliação controle da sensibilidade barorreflexa, via sucessivas doses de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Após isso, iniciou-se a infusão ICV dos agonistas em três ensaios separados: 1º) Ang-(1-7) (4ug/7.5ul/hora); 2º) C21 (1ug/7.5ul/hora) e 3º) Ang-(1-7) + C21 ( 4ug e 1ug/7.5ul/hora,

respectivamente). A sensibilidade barorreflexa foi avaliada depois de uma hora e três horas de infusão ICV, respectivamente. Os parâmetros de PAM e FC foram registrados durante todo período do experimento.

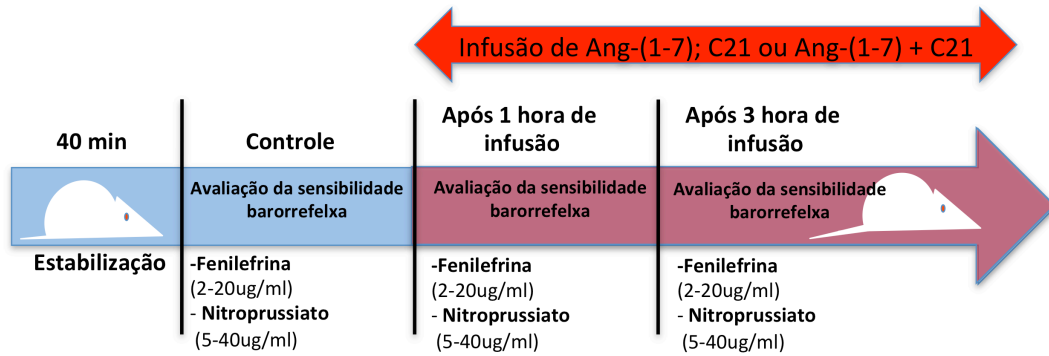


Figura 5. Figura representativa do protocolo experimental para avaliação da sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.

#### 4.4. Avaliação da interação funcional Mas/AT<sub>2</sub> em anéis de aorta de ratos Wistar.

Primeiramente, avaliamos o efeito vasoativo do composto 21 em anéis de aorta de ratos Wistar, para isso vasos contendo endotélio funcional foram pré-contraídos com fenilefrina ( $10^{-7}$  M). Após o platô de contração, foram construídas curvas concentração-resposta com o composto 21 ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M). Um segundo ensaio, em um outro anel aórtico, foi realizado para avaliar se a administração concomitante do C21 poderia interferir no efeito vasorelaxante da Ang-(1-7). Onde, após o platô de contração da fenilefrina, foi administrado o C21 ( $10^{-6}$  M) e, logo após, foi realizada a curva concentração-resposta com a Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M). Por ultimo, avaliamos se a administração, 10 minutos antes, do C21 poderia interferir no efeito vasorelaxante, produzido pela administração de Ang-(1-7).

#### 4.5. Avaliação da liberação de óxido nítrico (NO) em células CHO transfectadas

Com a finalidade de avaliar se o agonista C21 poderia influir na atividade do receptor Mas, na ausência do receptor AT<sub>2</sub>, células CHO que expressam estavelmente o receptor Mas foram pré-incubadas em meio isento de soro contendo o indicador de NO, 4-amino-5-metilamino-2,7-diacetato de difluorofluorescein (DAF-FM)(1umol/L), durante 30 min. As células foram lavadas com solução de Hanck's Balanced Salt (HBS) e incubadas por 10 minutos com o Composto 21 (1uM) ou salina, após isso, foi administrado a Ang-(1-7) (0,01uM) em temperatura ambiente. Após incubação as lamínulas foram posicionadas em placas de vidro e levadas ao microscópio confocal para avaliação da liberação de NO.

Figura 6

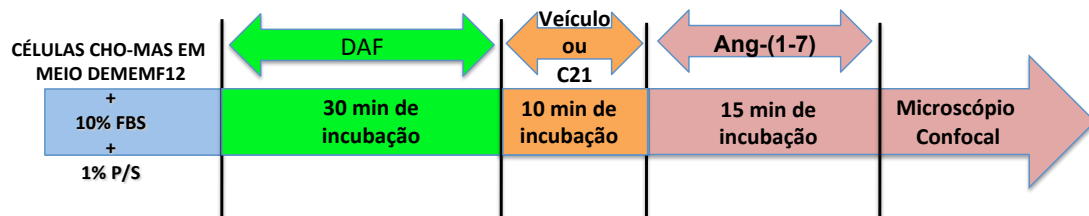


Figura 6. Figura representativa do protocolo experimental para avaliação da liberação de óxido nítrico em CHO que expressam o receptor Mas.

#### 4.6. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute Mas/AT<sub>2</sub>

Com o objetivo de investigar se camundongos duplo nocaute Mas/AT<sub>2</sub> possuem maior alteração da função endotelial que os animais separadamente nocaute para o Mas ou AT<sub>2</sub>, avaliamos as alterações na pressão arterial média (PAM) em resposta à administração em bolus intra-aórtico de acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP). A cânula da arterial femoral foi conectada ao transdutor de pressão, sendo iniciado o registro. Após um período de 30-60 minutos para estabilização dos níveis basais de PAM e FC, administramos, via cânula inserida na aorta torácica, diferentes concentrações de ACh (25, 50, 100, e 200 ng/kg de peso corporal) com intervalo de 3-5 minutos entre cada concentração. Após o teste com ACh, a cânula foi lavada com salina e a dose única de SNP (10 ug / kg de peso corporal) foi administrada. O mesmo protocolo foi usado para testar as duas linhagens de animais DKO desenvolvidos, com *background* B6 ou com *background* FVB/N.

Figura 7

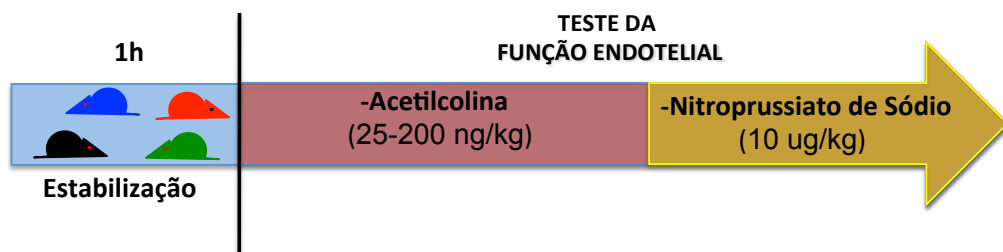


Figura 7 . Figura representativa do protocolo experimental para avaliação da função endotelial em camundongos geneticamente modificados.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da heterodimerização dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> usando a FRET

Para viabilizar as medidas da FRET, desenvolvemos vetores que levam à expressão, na membrana celular, dos receptores Mas ou AT<sub>2</sub> fundidos a proteínas fluorescentes. A figura 8 ilustra células HEK293 co-transfectadas com os vetores AT<sub>2</sub>YFP e MasCFP.

A eficiência de FRET foi determinada por mensurações da recuperação da fluorescência doadora durante a queima da fluorescência aceptora (Fig 9 A,B). Observamos uma eficiência de FRET significativa de  $10,8 \pm 0,8\%$  entre o receptor AT<sub>2</sub> e o MAS. Quando competimos a heterodimerização, a eficiência de FRET foi reduzida para  $6,0 \pm 0,6\%$ . A redução da quantidade dos vetores fluorescentes no ensaio de competição não foi o fator responsável pela redução da FRET, pois observamos uma eficiência de FRET de  $9,6 \pm 0,6\%$  quando expressamos os receptores MAS e AT<sub>2</sub> fluorescentes usando metade do DNA total (1,5ug) junto com 1,5ug do vetor PcDNA3.1 vazio. A eficiência de FRET, para heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>, foi reduzida para  $3,9 \pm 1,2 \%$  com a mutação na cisteína 35' no receptor AT<sub>2</sub> (Fig 9 C).

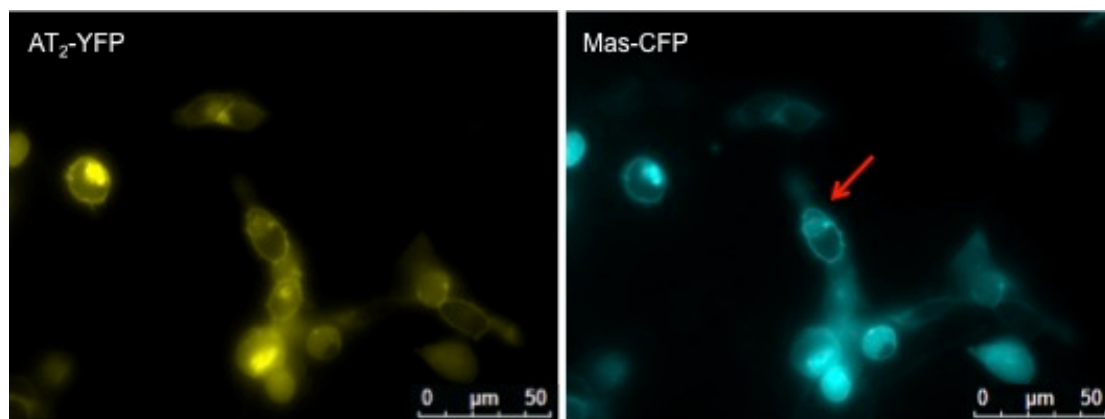


Figura 8. Co-expressão em células HEK dos receptores AT<sub>2</sub> e Mas humanos, fundidos na porção C-terminal com o YFP (AT<sub>2</sub>-YFP) e CFP (Mas-CFP). A seta mostra uma célula viável para a medida da FRET.

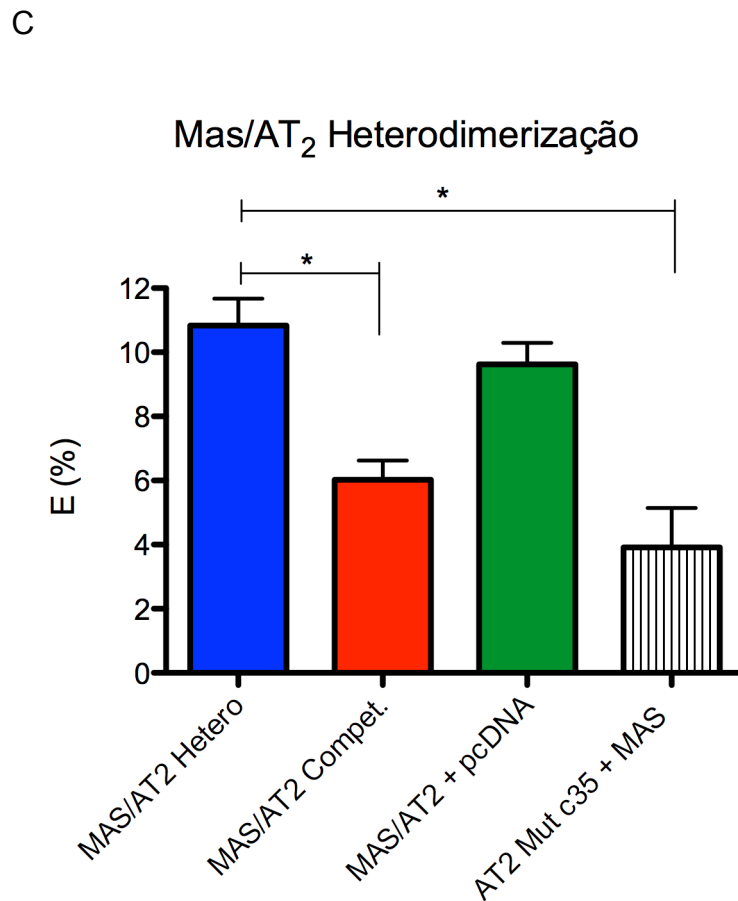
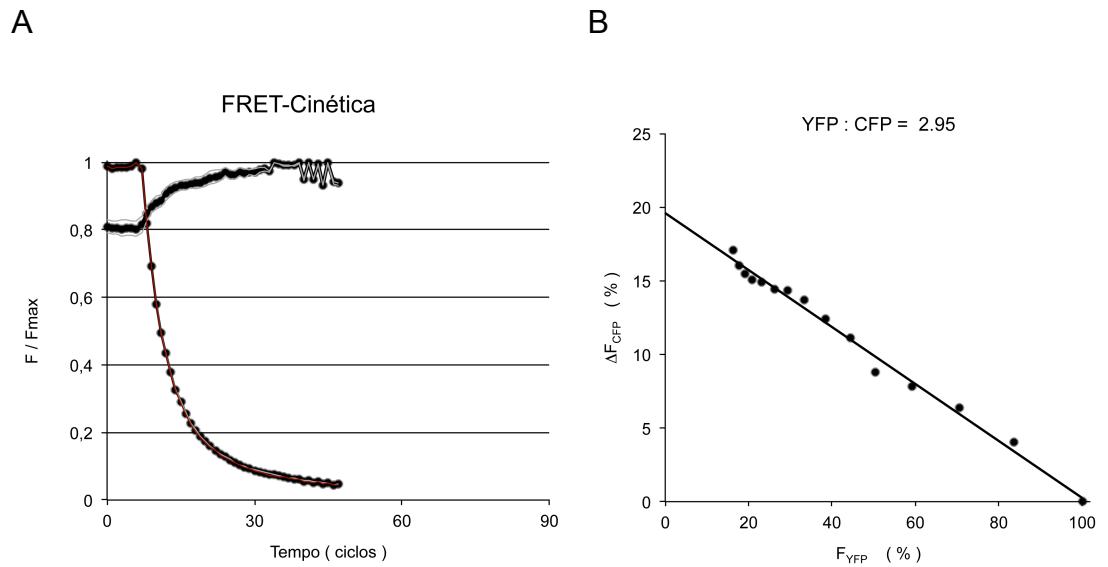


Figura 9. Eficiência da FRET E (%) medida pela recuperação da CFP após queima da YFP em células HEK293 transfectadas de forma transiente. Heterodimerização dos receptores MAS e AT<sub>2</sub>. (A) Curso do tempo da recuperação da fluorescência doadora Mas-CFP (curva ascendente) durante queima seletiva do aceptor AT<sub>2</sub>-YFP

(curva descendente).  $F/F_{max}$  é a fluorescência dividida pela fluorescência máxima. A Figura representa um experimento. (B) Análise de regressão linear do doador durante queima do acceptor, descrito é a média do experimento mostrado em A. (C) Barra azul indica a eficiências de FRET entre AT<sub>2</sub>-YFP e Mas-CFP (3ug de DNA total usado) (n=29). Barra vermelha indica o ensaio de competição entre AT<sub>2</sub>-YFP e Mas-CFP (1.5ug de DNA) coexpressos com os receptores MAS e AT<sub>2</sub> sem fluorescência (1.5ug de DNA) (n=23). Barra verde indica a eficiências de FRET entre AT<sub>2</sub>-YFP e Mas-CFP (1.5ug de DNA) com 1.5ug de PcDNA3.1 vazio (n=19). Barra tracejada representa a eficiência de FRET entre o MAS-CFP e o AT<sub>2</sub>-YFP mutado na cisteína 35, sítio dirigido (n=15). (\* $p < 0.05$ , One-Way ANOVA).

## **5.2. Avaliação da homodimerização do receptor Mas usando a FRET**

Para a homodimerização do receptor MAS, houve uma eficiência de FRET de  $7,4 \pm 0,8\%$ , que foi reduzida a  $4,2 \pm 0,7\%$  no ensaio de competição. Não houve alteração na medida da FRET após a redução da quantidade de vetores fluorescentes transfectados ( $7,2 \pm 0,9\%$ ). Nenhuma eficiência de FRET foi observada ( $0,44 \pm 1,44\%$ ) quando o receptor MAS foi coexpresso com o receptor TRPC6 (Fig 10).

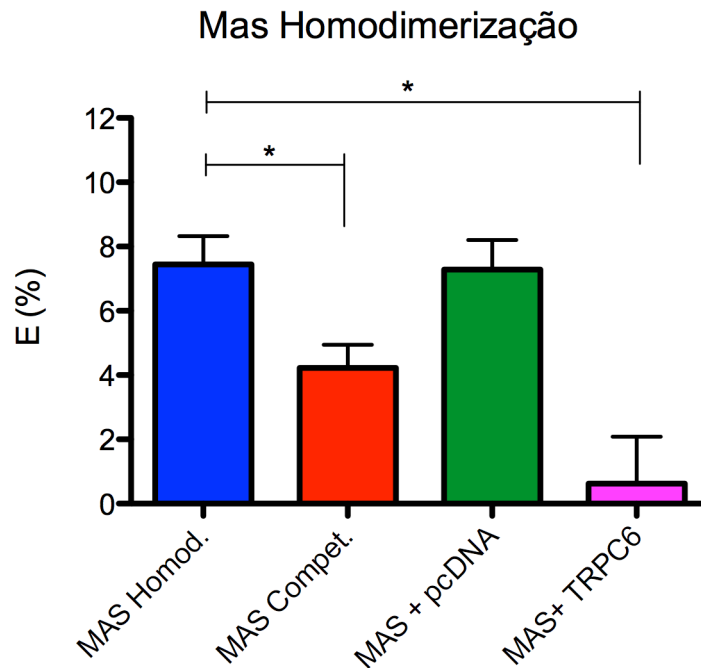


Figura 10. Homodimerização do receptor MAS. A barra azul indica a eficiência de FRET entre MasYFP e MasCFP com o total de 3ug de DNA (n=11). A barra vermelha representa o ensaio de competição, indicando a eficiência de FRET entre Mas-YFP e Mas-CFP (1.5ug de DNA) com a coexpressão do receptor MAS não fluorescente (1.5ug de DNA) (n=16). A barra verde indica a eficiência de FRET entre MasYFP e MasCFP (1.5ug de DNA) com 1.5ug de PcDNA3.1 vazio (n=25). A barra rosa representa a eficiência de FRET entre o MAS-CFP e um receptor não relacionado ao RAS, o TRPC6-YFP (n=17). (\*p<0.05, One-Way ANOVA).

### 5.3. Avaliação da homodimerização do receptor AT<sub>2</sub> usando a FRET

Para a homodimerização do receptor AT<sub>2</sub>, observamos uma eficiência de FRET de  $9,2 \pm 0,8\%$  que foi reduzida, após competição, para  $4,5 \pm 0,7\%$ . Não houve alteração na medida da FRET após a redução da quantidade de vetores fluorescentes transfectados ( $8,9 \pm 0,9\%$ ). A eficiência de FRET, para homodimerização do AT<sub>2</sub>, foi reduzida para  $3,9 \pm 1,2\%$  com a mutação na cisteína 35' em um dos vetores que expressam o receptor AT<sub>2</sub>. Assim como

para o receptor MAS, nenhuma eficiência de FRET foi observada ( $0.62 \pm 1.4\%$ ), quando o receptor  $AT_2$  foi coexpresso com o receptor TRPC6 (Fig 11).

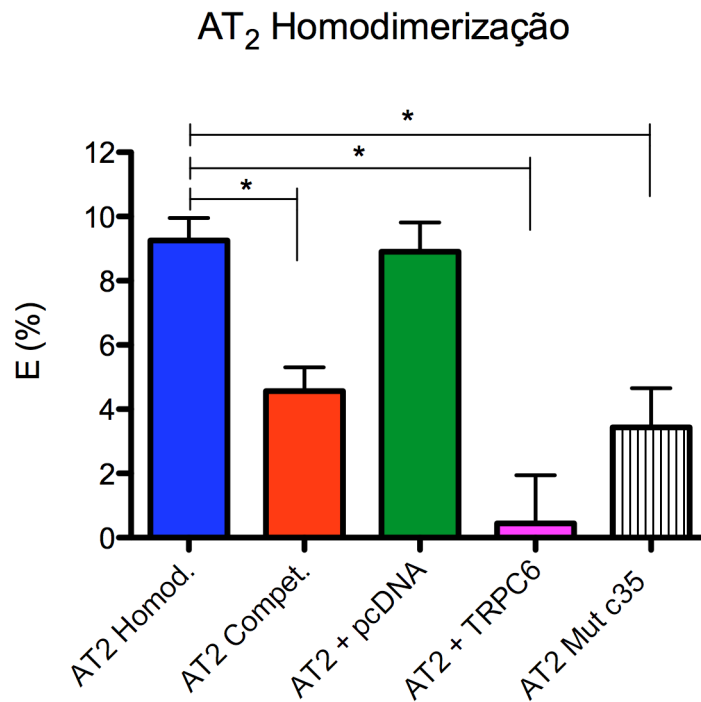


Figura 11. Homodimerização do receptor  $AT_2$ . A barra azul indica a eficiências de FRET entre  $AT_2$ YFP e  $AT_2$ CFP com o total de 3 $\mu$ g de DNA (n=20). A barra vermelha indica o ensaio de competição, indicando a eficiência de FRET entre  $AT_2$ YFP e  $AT_2$ CFP (1,5 $\mu$ g de DNA) com a coexpressão do receptor  $AT_2$  não fluorescente (1,5 $\mu$ g de DNA) (n=19). A barra verde indica a eficiências de FRET entre  $AT_2$ -YFP e  $AT_2$ -CFP (1,5 $\mu$ g de DNA) completada com 1,5 $\mu$ g de PcDNA3.1 vazio (n=20). A barra rosa representa a eficiência de FRET entre o  $AT_2$ -CFP e um receptor não relacionado ao RAS, o TRPC6-YFP (n=23). A barra tracejada representa a eficiência de FRET entre o  $AT_2$ CFP e o  $AT_2$ YFP mutado na cisteína 35 (n=17). (\* $p < 0,05$ , One-Way ANOVA).

#### 5.4. Avaliação dinâmica da heterodimerização dos receptores AT<sub>2</sub> e Mas usando a FRET

Não houve alteração na eficiência de FRET dinâmico para a heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> após a administração do agonista do receptor MAS, Ang-(1-7) (10<sup>-6</sup>M) (Fig 12 A) ou do agonista do receptor AT<sub>2</sub>, o composto 21 (10<sup>-6</sup>M) (Fig 12 B).

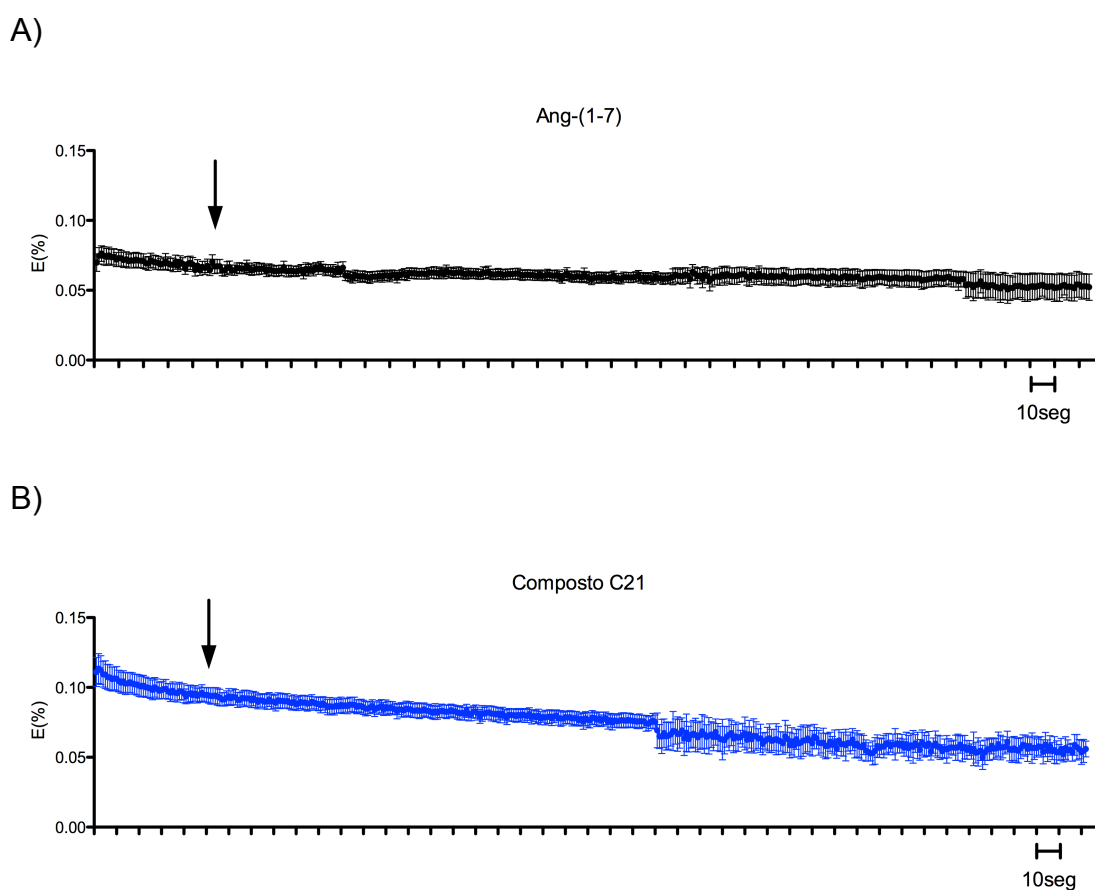


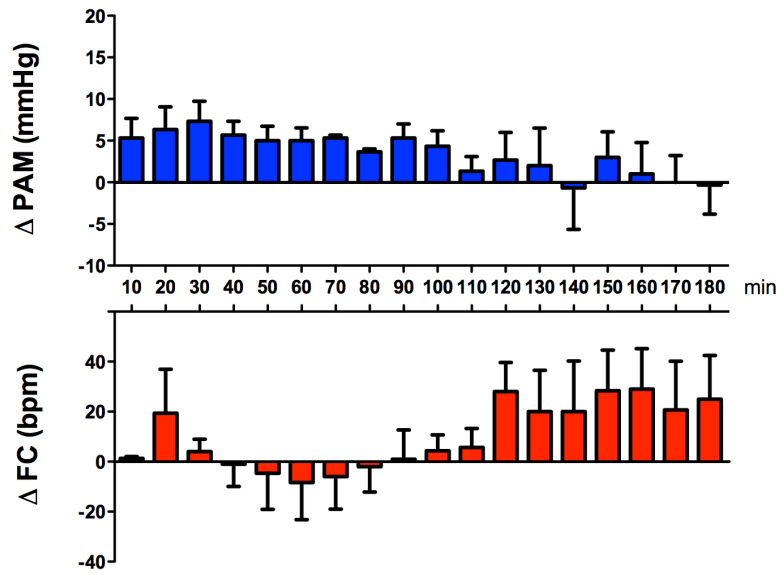
Figura 12. Heterodimerização dos receptores MAS e AT<sub>2</sub>. Avaliação dinâmica da eficiência de FRET após a administração de A) Ang-(1-7) (10<sup>-6</sup>M) (n=8) ou B) Composto C21 (10<sup>-6</sup>M) (n=5). A seta indica o momento (50 segundos) onde os agonistas foram administrados.

### **5.5. Avaliação do efeito da infusão ICV da Ang-(1-7) sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.**

Avaliamos o efeito da infusão ICV da Ang-(1-7) sobre os parâmetros cardiovasculares basais e sobre os reflexos cardiovasculares produzidos pelo barorreflexo em ratos SHR. Não observamos alterações nos parâmetros cardiovasculares de PAM e FC após infusão ICV da Ang-(1-7) (4ug/7,5ul/hora) (Fig 13 A). A infusão ICV de Ang-(1-7) (4ug/7,5ul/hora) aumentou a sensibilidade barorreflexa, induzida pela fenilefrina, de ( $0,6 \pm 0,09$  batimentos/min/mmHg) antes para ( $1,0 \pm 0,13$  batimentos/min/mmHg) após 3 horas de infusão de Ang-(1-7),  $p < 0.05$  (Figura 13 B, esquerda). Não houve alteração da sensibilidade barorreflexa induzida pelo nitroprussiato de sódio após a infusão ICV do C21 (Fig 13 B, direita).



A)



B)

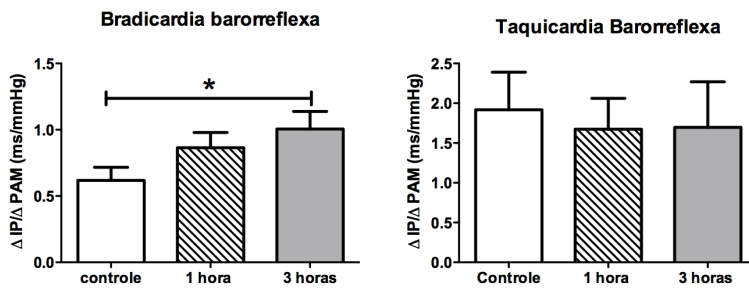
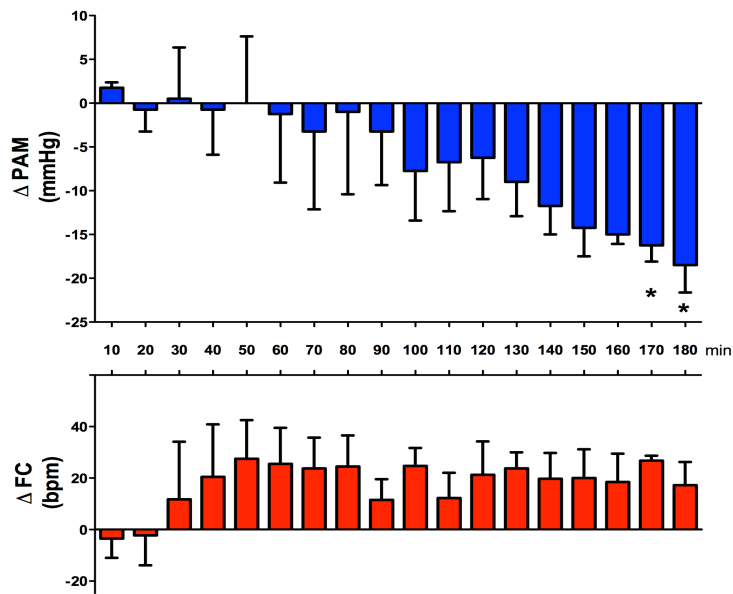


Figura 13. Alterações na (A) PAM (mmHg) , FC (bpm) e (B) sensibilidade barorreflexa ( $\Delta$ IP/ $\Delta$ PAM, ms/mmHg) avaliada pela bradicardia barorreflexa induzida pela fenilefrina (esquerda) ou taquicardia barorreflexa induzida pelo nitroprussiato de sódio (direita), após infusão ICV da Ang-(1-7) em SHR (n=5). Diferença significativa entre antes e após 3 horas de infusão (\*p<0,05, One-Way ANOVA).

### **5.6. Avaliação do efeito da infusão ICV do Composto 21 sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.**

Avaliamos o efeito da infusão ICV do composto 21 sobre os parâmetros cardiovasculares basais e sobre os reflexos cardiovasculares produzidos pelo barorreflexo em ratos SHR (Fig 14). Os níveis basais de PAM ( $140 \pm 2$  mmHg) diminuíram significativamente ( $126 \pm 3$  mmHg), após três horas de infusão ICV de C21 ( $1\mu\text{g}/7,5\mu\text{l}/\text{hora}$ ),  $p < 0,05$  (Fig 14A). Nenhuma alteração significativa foi observada na frequência cardíaca basal após a infusão ICV do C21. A infusão ICV do C21 ( $1\mu\text{g}/7,5\mu\text{l}/\text{hora}$ ) aumentou a sensibilidade barorreflexa, induzida pela fenilefrina, de ( $0,55 \pm 0,08$  batimentos/min/mmHg) antes para ( $0,98 \pm 0,14$  batimentos/min/mmHg) após 3 horas de infusão do C21,  $p < 0,05$  (Fig 14 B, esquerda). Não houve alteração da sensibilidade barorreflexa induzida pelo nitroprussiato de sódio após a infusão ICV do C21 (Fig 14 B, direita).

A)



B)

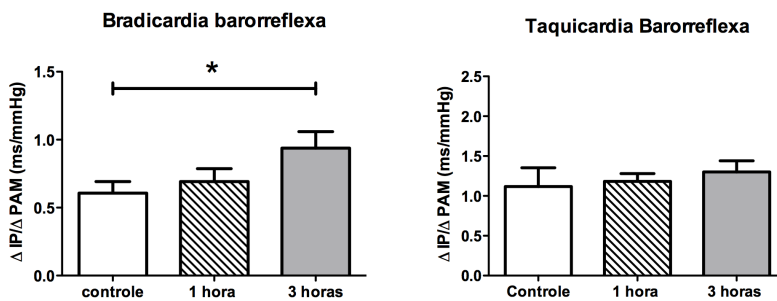
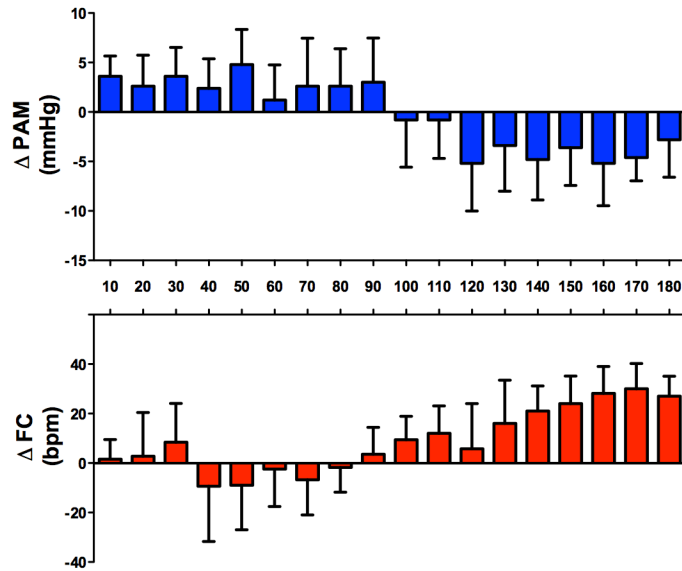


Figura 14. Alterações na (A) PAM (mmHg) , FC (bpm) e (B) sensibilidade barorreflexa ( $\Delta IP/\Delta PAM$ , ms/mmHg) avaliada pela bradicardia barorreflexa induzida pela fenilefrina (esquerda) ou taquicardia barorreflexa induzida pelo nitroprussiato de sódio (direita), após infusão ICV do Composto 21 em SHR (n=5). (\*) Diferença significativa entre antes e após 3 horas de infusão (\* $p < 0,05$ , One-Way ANOVA).

**5.7. Avaliação do efeito da infusão ICV concomitante do C21 e da Ang-(1-7) sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.**

Nenhuma alteração significativa nos parâmetros de PAM e FC foi observada durante a infusão ICV concomitante do C21 (1ug/7,5ul/hora) e da Ang-(1-7) (4ug/7,5ul/hora) (Fig 15 A). A sensibilidade barorreflexa induzida pela administração de fenilefrina não foi alterada neste grupo (Fig 15 B, esquerda), no entanto, houve redução significativa da sensibilidade barorreflexa induzida pela administração de nitroprussiato de sódio (Fig 15 B, direita).

A)



B)

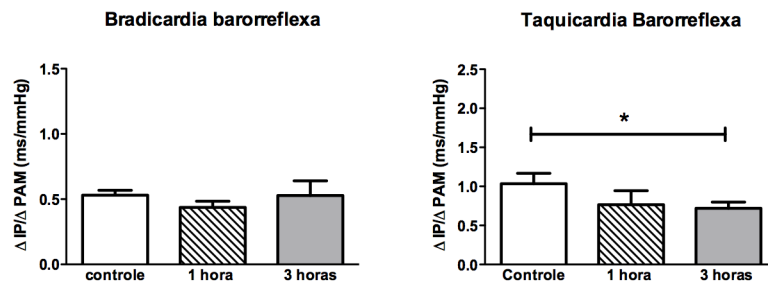
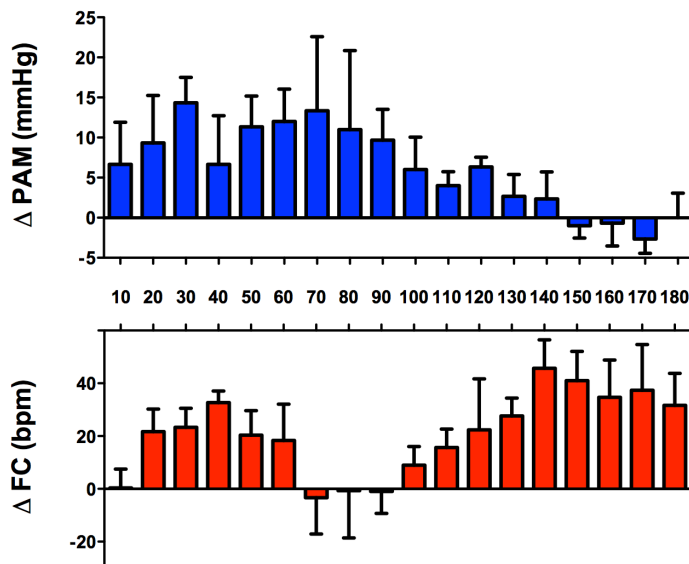


Figura 15. Alterações na (A) PAM (mmHg) , FC (bpm) e (B) sensibilidade barorreflexa ( $\Delta IP/\Delta PAM$ , ms/mmHg) avaliada pela bradicardia barorreflexa induzida pela fenilefrina (esquerda) ou taquicardia barorreflexa induzida pelo nitroprussiato de sódio (direita), após infusão ICV do Composto 21 e da Ang-(1-7) de forma concomitante em SHR (n=5). (\*) Diferença significativa entre antes e após 3 horas de infusão (\*p<0.05, One-Way ANOVA).

**5.8. Avaliação do efeito da infusão ICV de salina sobre os parâmetros de PAM, FC e sobre a sensibilidade barorreflexa em ratos SHR.**

Nenhuma alteração significativa nos parâmetros de PAM e FC (Fig 16 A) e na sensibilidade barorreflexa (Fig 16 B, esq. e dir.) foram observadas durante a infusão ICV de salina em SHR.

A)



B)

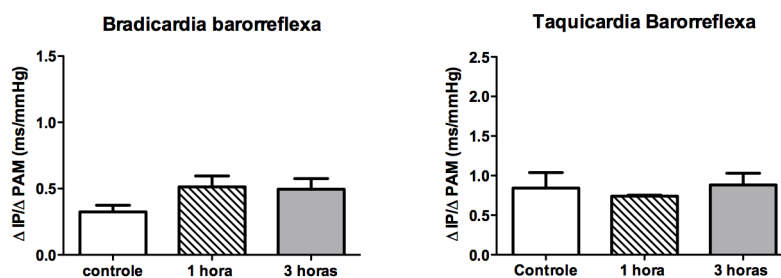


Figura 16. Alterações na (A) PAM (mmHg) , FC (bpm) e (B) sensibilidade barorreflexa ( $\Delta IP/\Delta PAM$ , ms/mmHg) avaliada pela bradicardia barorreflexa induzida pela fenilefrina (esquerda) ou taquicardia barorreflexa induzida pelo nitroprussiato de sódio (direita), após infusão ICV de salina 0,9% (veículo) em SHR (n=3).

## 5.9. Efeitos funcionais da interação MAS/AT<sub>2</sub> em anéis de aorta de ratos wistar

Primeiramente, avaliamos o efeito do composto 21 em anéis de aorta de ratos wistar, pre-contraidas por fenilefrina. O C21 não produziu efeito vasorelaxante em nenhuma das concentrações testadas (Fig 17 A).

Avaliamos, em seguida, a participação da ativação do receptor AT<sub>2</sub> na resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-7) em aorta de ratos wistar. A administração do C21 (10<sup>-6</sup>M), segundos antes da Ang-(1-7), não alterou a resposta vasorelaxante produzida pela Ang-(1-7) (Fig 17 B). De forma interessante, observamos um bloqueio total da resposta relaxante induzida pela Ang-(1-7) quando o C21 (10<sup>-6</sup>M) foi administrado 10 min antes da Ang-(1-7) (Fig 17 C).

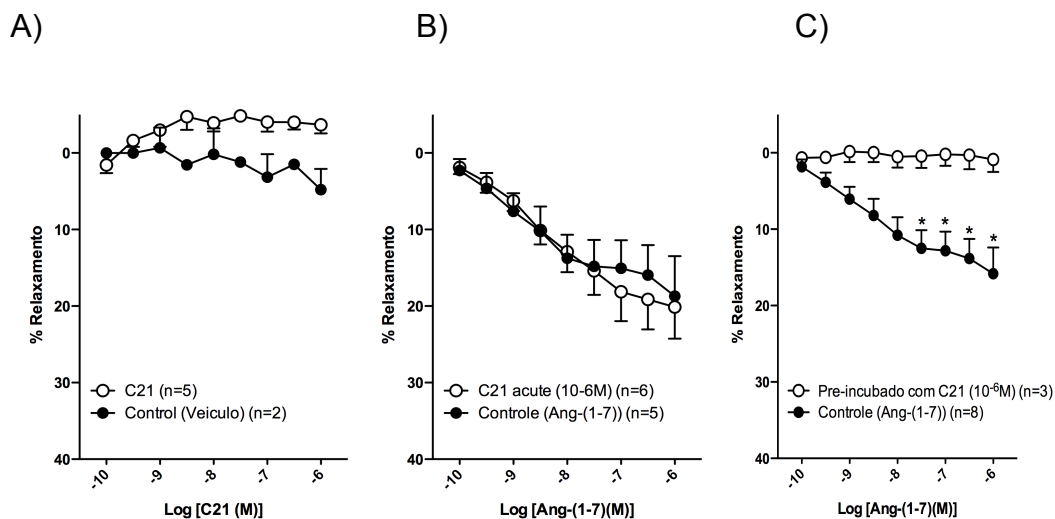


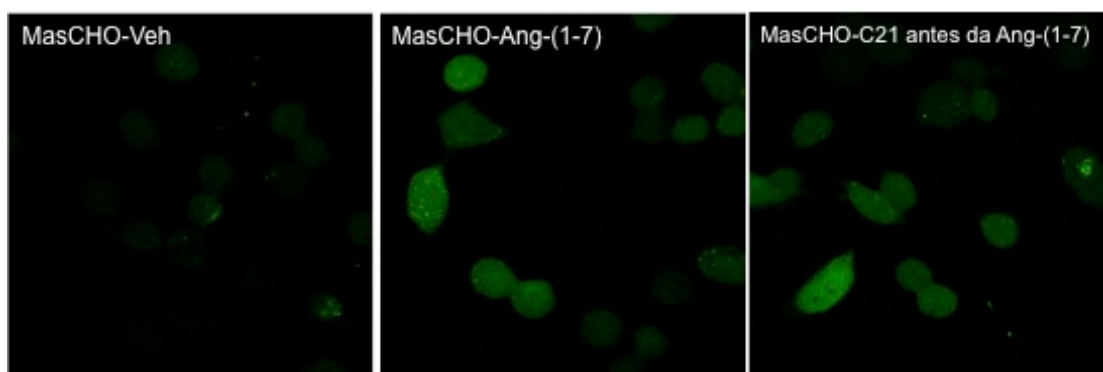
Figura 17. A) Efeito da administração do Composto 21 em anéis de aorta de ratos Wistar normotensos com endotélio funcional. B-C) Efeito induzido pela Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos Wistar com endotélio funcional segundos (B) ou 10 minutos depois (C) da administração do C21 (10<sup>-6</sup>M). (\*p<0,05, Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

### **5.10. Análise da Liberação de Óxido Nítrico em células CHO transfectadas**

Mensurações de NO foram realizadas através do método, 4-amino-5-metilamino-2, 7-diacetato de difluorofluorescein (DAF-FM). A Ang-(1-7) estimulou a liberação de NO em células CHO que expressam estavelmente o receptor Mas ( $24,6 \pm 3,9$  UA), quando comparado ao grupo controle, onde as células foram administradas com veículo ( $3,7 \pm 0,6$  UA) (Fig 18 A,B). A liberação de NO mediada pela Ang-(1-7) não foi alterada pela pré-incubação, 10 minutos antes, do composto 21 ( $10^{-6}$ M) ( $21,6 \pm 3,0$ ) (Fig 18 A,B).



A)



B)

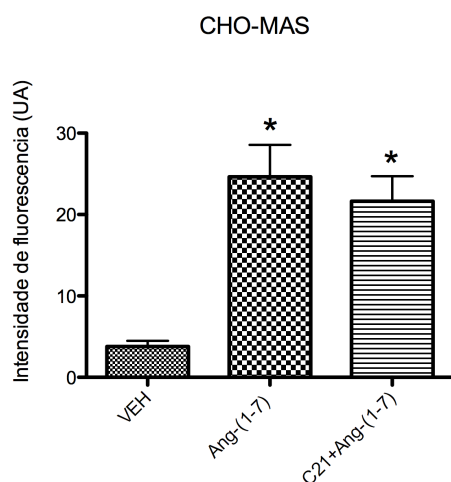


Figura 18. Efeito do composto 21 sobre a liberação de óxido nítrico (NO) induzida pela Ang-(1-7) em células CHO que expressam o receptor Mas. A, Imagem microfotográfica confocal representativa da produção de NO induzida após tratamento com salina 0.9% (n=18), Ang-(1-7) ( $10^{-7}$ M) (n=16) ou Composto 21 ( $10^{-6}$ M) 10 minutos antes da administração da Ang-(1-7) ( $10^{-7}$ M) (n=19) em células CHO que expressam o receptor Mas (Mas-CHO). B, Quantificação da liberação de NO dos experimentos representados em A. As colunas representam a média  $\pm$  EPM de fluorescência relativa. (\*) Diferença significativa comparada com o veículo (\* $p < 0,05$ , One-Way ANOVA). \*  $P < 0,0001$  sendo o item de comparação o veículo. (One-way Anova seguido pelo teste de Bonferroni. U.A., unidades arbitrárias).

### 5.11. Genotipagem dos animais geneticamente modificados

Todos os camundongos procedentes do cruzamento entre os animais MasKO e AT<sub>2</sub>KO (B6 ou FVB/N) foram genotipados por PCR. Não houve cruzamento entre irmãos. A Figura 19 mostra os géis oriundos da genotipagem dos animais. Foram usados para o estudo camundongos macho duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> (DKO), nocaute para o receptor Mas, (MasKO), nocaute para o receptor AT<sub>2</sub> (AT<sub>2</sub>KO) e os animais tipo selvagem (WT).

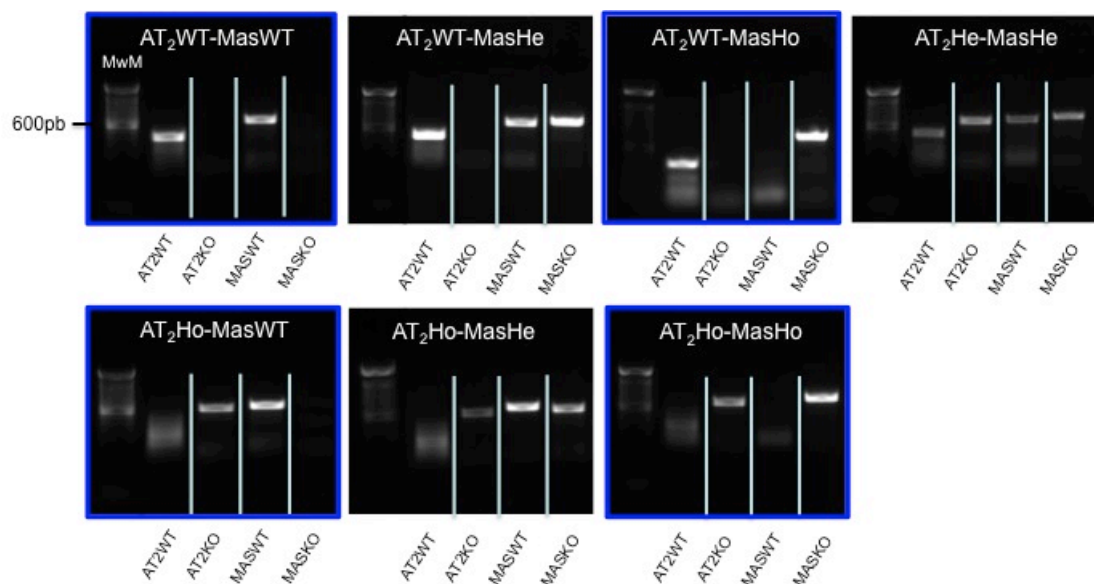


Figura 19. Foto ilustrativa de géis demonstrando o resultado da genotipagem dos camundongos. Com borda azul, os animais utilizados no estudo.

### **5.12. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> com *background* C57BL/6 (B6)**

Para estender a avaliação das consequências funcionais da deleção simultânea dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>, estudamos a reatividade vascular em camundongos duplo nocaute Mas/AT<sub>2</sub> com *background* C57BL/6 (B6). Avaliamos a função endotelial, em camundongos acordados, pelo efeito vasorelaxante da administração intra-aorta, em bolus, de acetilcolina (ACh). A resposta vasodilatadora à ACh está reduzida nos animais MasKO e DKO, quando comparada ao grupo WT (Fig 20 A). O grupo AT<sub>2</sub>KO não diferiu do grupo controle, WT (Fig 20 A).

A resposta endotélio-independente, mensurada pela administração de nitroprussiato de sódio (SNP) (10ug/Kg), está aumentada nos animais MasKO, AT<sub>2</sub>KO e DKO, quando comparada ao grupo WT (Fig 20 B).

Quando normalizamos a resposta à ACh com SNP, evidenciamos disfunção endotelial nos grupos MasKO e DKO quando comparado ao grupo controle WT, sendo o grupo DKO o que apresentou maior diferença (  $p < 0,001$ ). Observamos uma tendência de disfunção endotelial no grupo AT<sub>2</sub>KO quando comparado ao controle WT, porém não houve diferença estatística entre estes grupos (Fig 20 C).

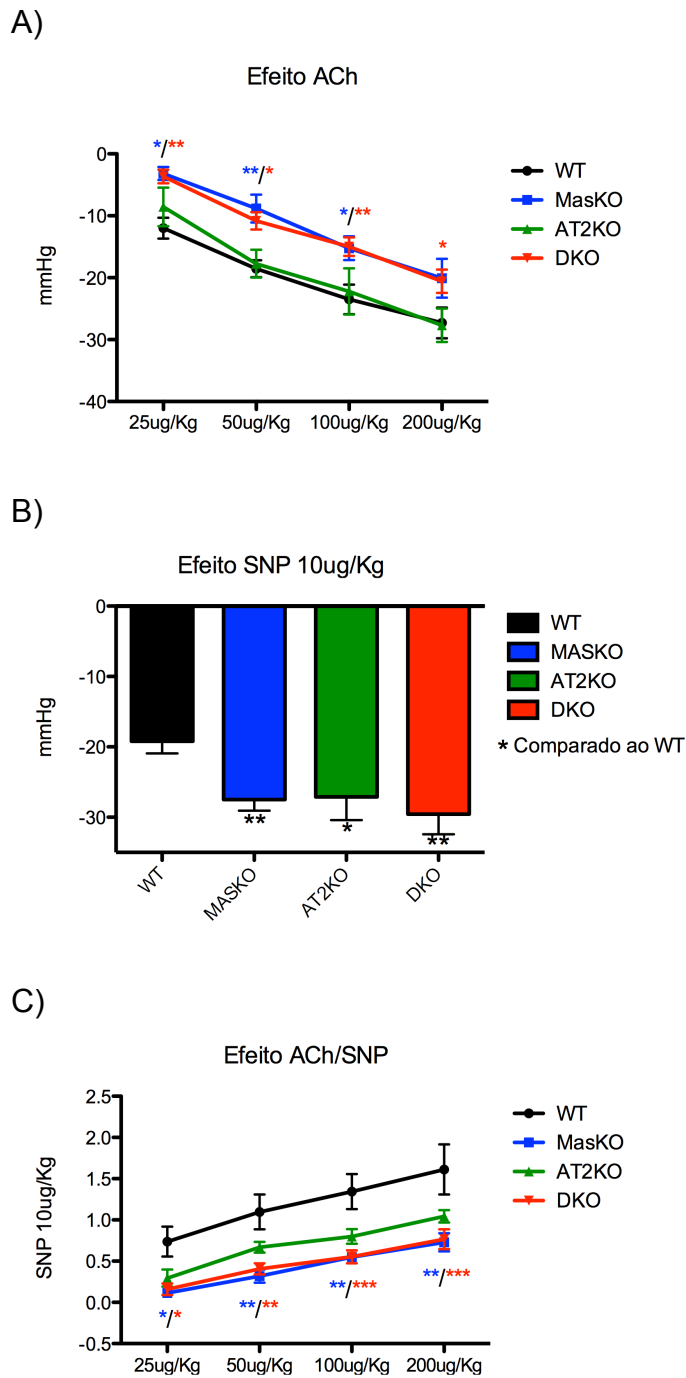
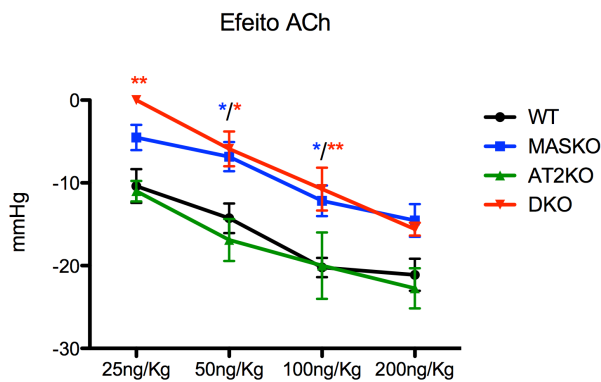


Figura 20. Função endotelial em WT (n=10) , MasKO (n=6), AT<sub>2</sub>KO (n=6) e duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> (DKO) (n=12) com *background* B6. Resposta vascular em resposta a administração de A) doses crescentes de acetilcolina (ACh); B) 10ug/Kg de nitroprussiato de sódio (SNP). C) Efeito vascular da ACh normalizado pela resposta produzida pelo SNP. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. A e C Two-Way ANOVA ; B one way ANOVA) .

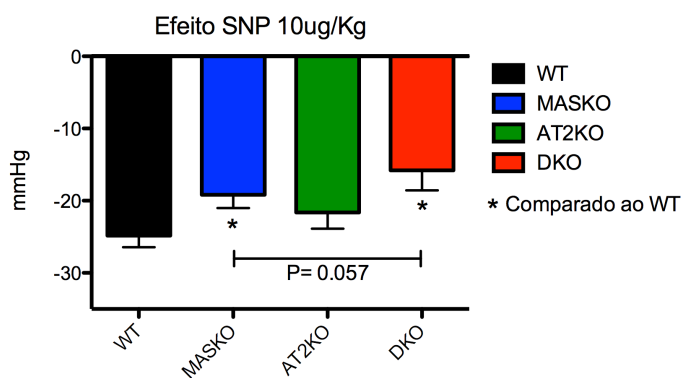
### **5.13. Avaliação da função endotelial em camundongos duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> com *background* FVB/N**

Assim como realizado para os animais DKO B6, avaliamos a função endotelial, nos camundongos acordados duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> com *background* FVB/N. A resposta vasodilatadora à ACh está reduzida nos animais MasKO e DKO, quando comparada ao grupo WT (Fig 21 A). O grupo AT<sub>2</sub>KO não diferiu do grupo controle, WT (Fig 21 A). Ao contrário do que foi observado nos animais DKO com *background* B6, a resposta endotélio-independente, mensurada pela administração de nitroprussiato de sódio (SNP) (10ug/Kg), está significativamente reduzida nos animais MasKO e DKO, quando comparada ao grupo WT (P < 0,05) (Fig 18 B). O grupo DKO apresentou menor resposta ao SNP que o grupo MasKO, havendo tendência do grupo DKO se diferir do MasKO (P = 0,057). O grupo AT<sub>2</sub>KO não se diferiu estatisticamente do grupo WT, porém houve tendência a diferença (P = 0,059). Nenhuma diferença estatística foi constatada entre os grupos quando se normalizou a resposta à ACh com a produzida pelo SNP (Fig 21 C).

A)



B)



C)

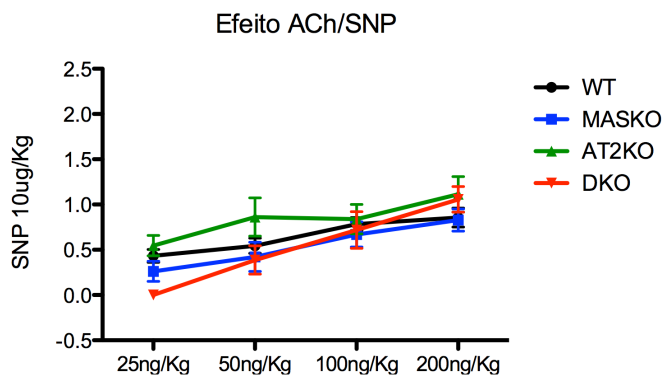


Figura 21. Função endotelial em camundongos WT (n=5) , MaskO (n=4), AT<sub>2</sub>KO (n=5) e duplo nocaute para os receptores Mas e AT2 (DKO) (n=4) com *background* FVB/N. Resposta vascular em resposta à administração de **A)** doses crescentes de acetilcolina (ACh); **B)** 10ug/Kg de nitroprussiato de sódio (SNP). **C)** Efeito vascular da ACh normalizado pela resposta produzida pelo SNP. (\*p<0,05, \*\*p<0,01. A e C Two-Way ANOVA ; B one way ANOVA) .

## 6. DISCUSSÃO:

O presente trabalho demonstra de forma molecular e funcional uma interação direta entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>.

Para avaliar a interação molecular entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> usamos a técnica de transferência ressonante de energia fluorescente (FRET). Observamos uma heterodimerização entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> dependente da cisteína na posição 35' (N terminal) do receptor AT<sub>2</sub>. A interação entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> é específica pois, a expressão dos receptores Mas ou AT<sub>2</sub> não fluorescentes competiu com a eficiência da FRET produzida pelos receptores MAS e AT<sub>2</sub> fluorescentes. Outro fator que indica a especificidade da heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub>, foi que nenhum FRET foi observado entre os receptores Mas ou AT<sub>2</sub> e o receptor TRPC6, também expresso na membrana. Adicionalmente, observamos a homodimerização do receptor Mas e do receptor AT<sub>2</sub>, esta última já demonstrada por Miura. *et.al*<sup>65</sup>.

Este estudo não utilizou o cálculo da FRET usando a fórmula descrita por Foster; utilizou-se formas indiretas de calcular a FRET por queima do acceptor ou por FRET *emission*. É importante ressaltar que na fórmula descrita por Foster, a FRET é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre as moléculas fluorescentes, isto é, a FRET é modulada, para maior ou menor, pela sexta potência da distância entre as proteínas fluorescentes. Quando as proteínas fluorescentes YFP e CFP são fundidas entre si, estando à menor distancia possível, a eficiência da FRET calculada pelo método de queima do acceptor é de, no máximo, 50%<sup>75</sup>. Levando em consideração que a FRET é inversamente proporcional à sexta potência da

distância entre as moléculas fluorescentes, quando se adiciona duas proteínas (o receptor Mas e o AT<sub>2</sub>) entre as proteínas fluorescentes, isto aumenta a distância entre as moléculas e, assim, uma eficiência de FRET menor que 50% é esperada. Desta forma, as eficiências de FRET para hetero e homodimerizações observadas em nosso estudo são aceitáveis.

Clavreul et al. 2011, demonstraram a presença do receptor de pró-renina em células HEK293<sup>76</sup>, sendo assim possível que estas expressem outros receptores do RAS como os receptores Mas e AT<sub>2</sub>. Embora a presença endógena dos receptores Mas e/ou AT<sub>2</sub> nas células HEK293 possa competir com os receptores fluorescentes, e assim reduzir a eficiência da FRET medida, essa hipótese é improvável. Como os receptores Mas e AT<sub>2</sub> fluorescentes são expressos usando um método não fisiológico, acreditamos que seria necessário alta expressão dos receptores endógenos Mas e/ou AT<sub>2</sub> para influir na medida da FRET. É importante ressaltar que a expressão endógena dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> é baixa<sup>37,46</sup>. Adicionalmente, o uso de células HEK293 não comprometeu o estudo que demonstrou a heterodimerização entre o receptor Mas e o receptor AT<sub>2</sub>.

Com a finalidade de buscar prováveis sítios de interação entre o receptor Mas e o AT<sub>2</sub>, usamos como base o estudo de Miura et al., que demonstrou que a homodimerização do receptor AT<sub>2</sub> é dependente de uma ligação dissulfeto na cisteína 35 (Cis35) do receptor AT<sub>2</sub><sup>65</sup>. Nossos dados mostram que, possivelmente, essa ligação dissulfeto, na cisteína 35 do receptor AT<sub>2</sub>, esta também relacionada com a heterodimerização entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub>. Não descartamos a hipótese de existirem outros sítios de ligação responsáveis pela heterodimerização dos receptores, visto que a



eficiência da FRET não foi abolida após a mutação pontual no receptor AT<sub>2</sub>.

Deve-se considerar que a redução da FRET com a mutação na Cis35 pode ter sido causada não pela perda da ligação dissulfeto, mas por alteração na conformação do receptor AT<sub>2</sub>, o que o afastaria do receptor Mas, resultando em uma redução da eficiência da FRET medida. A técnica de FRET não possibilita responder esta questão, porém, Miura et al., usando outras técnicas além da FRET, demonstraram que a homodimerização do receptor AT<sub>2</sub> foi significativamente reduzida após mutação nessa cisteína, assim como, após o bloqueio de ligações dissulfeto<sup>65</sup>.

No ensaio de FRET dinâmico, a medida de FRET para a heterodimerização dos receptores Mas/AT<sub>2</sub> não foi alterada após administração dos respectivos agonistas, Ang-(1-7) e C21. Possivelmente, a heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> é constitutiva e a medida do FRET dinâmico não foi sensível o suficiente para captar alterações conformacionais dos receptores após ligação com os agonistas. Nossos dados de FRET dinâmico se assemelham a outros estudos que demonstraram heterodimerização entre os receptores AT<sub>2</sub>/AT<sub>1</sub><sup>63</sup>, Mas/AT<sub>1</sub><sup>60</sup> e AT<sub>2</sub>/B<sub>2</sub><sup>64</sup>, que também constataram que não houve alteração da heterodimerização entre os receptores após estimulação ou inibição dos mesmos.

Para avaliar se a interação molecular Mas/AT<sub>2</sub>, observada na FRET, se reflete de forma funcional, comparamos o efeito da estimulação concomitante dos receptores Mas/AT<sub>2</sub> aos efeitos de modulação da sensibilidade barorreflexa e vasoativa produzidos pela ativação do receptor Mas ou AT<sub>2</sub> separadamente. Nosso estudo confirmou o efeito de aumento da sensibilidade barorreflexa produzido pela infusão ICV de Ang-(1-7) em

SHR<sup>67</sup>. Demonstramos, pela primeira vez, um aumento na sensibilidade barorreflexa e redução na PAM produzidos pela infusão ICV do agonista não peptídico do receptor AT<sub>2</sub>, o composto 21, em ratos espontaneamente hipertensos. Como a ativação dos dois receptores separadamente produziu um efeito de aumento da sensibilidade barorreflexa, esperávamos um efeito potencializado após estímulo concomitante dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>. Surpreendentemente, o efeito de aumento da sensibilidade barorreflexa foi totalmente abolido após a estimulação concomitante dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>. Houve redução significativa da taquicardia barorreflexa após três horas de infusão ICV de Ang-(1-7) e C21 em SHR. A redução da PAM observada durante a infusão ICV do C21, em SHR, foi também revertida após a estimulação concomitante dos receptores Mas e AT<sub>2</sub>.

O ensaio em anéis de aorta de ratos Wistar corroborou com os dados observados pela infusão ICV. A administração concomitante do C21 não alterou o efeito vasorelaxante mediado pela Ang-(1-7). Porém, de forma interessante, o efeito vasorelaxante da Ang-(1-7) foi totalmente bloqueado quando o C21 foi administrado, dez minutos antes, da Ang-(1-7). Isso leva a inferir que uma ativação prévia do receptor AT<sub>2</sub> seja necessária para haver o efeito antagônico do C21 sobre o receptor Mas. Esta hipótese foi, de forma indireta, reiterada no ensaio em células CHO que expressam por transfecção estável o receptor Mas. Observamos que a liberação de NO, após a administração de Ang-(1-7), não foi bloqueada pela pré-incubação com o C21, sugerindo que os efeitos antagônicos do C21, observados nos experimentos de vaso isolado e de barorreflexo são dependentes da participação do receptor AT<sub>2</sub>, visto que células CHO não expressam esse

receptor<sup>77</sup>.

Assim, nos experimentos que avaliamos a interação funcional Mas/AT<sub>2</sub> por estimulação farmacológica dos receptores, observamos efeito antagônico, uma vez que as respostas observadas pela ativação dos receptores Mas ou AT<sub>2</sub> separadamente foram bloqueadas quando estes foram estimulados concomitantemente.

O Composto 21 é específico para o receptor AT<sub>2</sub>, porém fisiologicamente o agonista para o receptor AT<sub>2</sub> é a angiotensina II, sendo assim possível que o efeito antagônico produzido pela ativação do receptor AT<sub>2</sub>, seja por causa de um mecanismo de curto prazo gerado fisiologicamente pela Ang II que ao excitar o receptor AT<sub>2</sub>, bloqueia os efeitos produzidos pela ativação do receptor Mas.

Observamos severa disfunção endotelial nos animais duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> (DKO) com *background* C57BL/6 (B6), assim como nos animais MasKO. A disfunção endotelial não diferiu entre os grupos DKO e MasKO, havendo, no entanto, maior significância no grupo DKO que no grupo MasKO, quando comparados ao WT.

De forma interessante, a redução na pressão arterial produzida pela administração do SNP nos animais nocaute (MasKO, AT<sub>2</sub>KO e DKO) estava significativamente mais acentuada que nos animais WT. No entanto, os grupos nocaute não diferiram entre si. É possível que o aumento da resposta vascular ao SNP seja um mecanismo compensatório relacionado à redução da função endotelial nesses animais nocaute.

É importante destacar que os animais MasKO com *background* C57BL/6 possuem fenótipo diferente, quando comparados aos animais

MaskKO com *background* FVB/N<sup>28,78</sup> e o mesmo ocorre para os animais AT<sub>2</sub>KO<sup>39</sup>. Desta forma, desenvolvemos animais DKO com *background* FVB/N. A avaliação da função endotelial medida pela administração de ACh constatou severa disfunção endotelial nos animais DKO e MaskKO com *background* FVB/N, porém não houve diferença estatística entre os dois grupos.

Ao contrário do que foi observado nos animais B6, a resposta vascular ao SNP nos animais com *background* FVB/N nocaute (DKO, MaskKO, AT<sub>2</sub>KO) foi menor que a do grupo controle. A menor resposta ao SNP nos animais DKO quando comparada aos demais grupos testados, principalmente aos animais MaskKO, evidencia significativo fenótipo presente nos animais DKO com *background* FVB/N. Este dado mostra a importância da ação conjunta dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> na função vascular.

Abdalla et al. evidenciaram que a heterodimerização AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> intrinsecamente inibe o receptor AT<sub>1</sub>, isto é, o acoplamento do receptor AT<sub>2</sub> fisicamente inibe o funcionamento do receptor AT<sub>1</sub><sup>63</sup>. No entanto, estudo mais recente sugere que a inibição do receptor AT<sub>1</sub> via AT<sub>2</sub> é devido a um *crosstalk* inibitório na via de sinalização citoplasmática dos receptores, onde a ativação do receptor AT<sub>2</sub> inibe a fosforilação da fosfolipase C-beta mediada via receptor AT<sub>1</sub><sup>79</sup>. Assim, como no estudo acima descrito, observamos que os receptores Mas e AT<sub>2</sub> intrinsecamente se heterodimerizam, sugerindo uma interação física entre os receptores, porém evidenciamos também a necessidade de uma prévia ativação do receptor AT<sub>2</sub> para haver inibição do receptor Mas, que sugere interação através *cross-talk* de via de sinalização.

Apesar dos estudos relacionados com interações entre receptores do

sistema renina angiotensina, assim como outros sistemas serem ainda incipientes e pouco conclusivos em respeito ao mecanismo e função dessas dimerizações, esses estudos expandem as alternativas de novos caminhos terapêuticos para doenças ligadas ao RAS, como por exemplo a hipertensão arterial.

Possivelmente, as interações entre receptores do RAS ocorrem e são moduladas para manter a homeostasia em determinadas situações fisiológicas e fisiopatológicas. O estudo que relacionou a presença de heterodímeros  $AT_1/B_2$  com pré-eclâmpsia ilustra bem esta hipótese<sup>59</sup>.

Sumarizando, neste estudo evidenciamos por métodos *in vivo* e *in vitro* direta interação entre os receptores Mas e  $AT_2$ . Este novo conhecimento corrobora os recentes achados sobre interações entre receptores do RAS e ilustra a complexidade de um sistema mantido evolutivamente por milhões de anos.

## 7. CONCLUSÕES:

- Os receptores Mas e AT<sub>2</sub> se heterodimerizam.
- A Heterodimerização Mas/AT<sub>2</sub> é dependente de ligação dissulfeto na cisteína 35 do receptor AT<sub>2</sub>.
- Há interação funcional entre os receptores Mas e AT<sub>2</sub> uma vez que:
  - a) A ativação concomitante dos receptores Mas e AT<sub>2</sub> inibiu o aumento da sensibilidade barorreflexa induzido pela estimulação do receptor Mas ou AT<sub>2</sub> isoladamente.
  - b) O efeito vasorelaxante da Ang-(1-7) foi inibido pelo composto 21, agonista do receptor AT<sub>2</sub>.
  - c) A liberação de óxido nítrico induzida pela Ang-(1-7) não foi afetada pelo C21 (agonista do receptor AT<sub>2</sub>) em CHO, células que não expressam o receptor AT<sub>2</sub>.
- Camundongos duplo nocaute para os receptores Mas e AT<sub>2</sub> com o *background* FVB/N apresentam disfunção vascular.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Phillips, M. I. & Schmidt-Ott, K. M. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol. Sci.* **14**, 271–274 (1999).
2. Bader, M. *et al.* Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med.* **79**, 76–102 (2001).
3. Wright, J. W. & Harding, J. W. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul. Pept.* **59**, 269–295 (1995).
4. Fournier, D., Luft, F. C., Bader, M., Ganten, D. & Andrade-Navarro, M. A. Emergence and evolution of the renin–angiotensin–aldosterone system. *J Mol Med (Berl)* **90**, 495–508 (2012).
5. Dzau, V. J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* **77**, I4–13 (1988).
6. Ganten, D., Speck, G., Schelling, P. & Unger, T. The brain renin--angiotensin system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **28**, 359–372 (1981).
7. Santos, R. A. S., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T. & Bader, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J. Endocrinol.* **216**, R1–R17 (2013).
8. Santos, R. A. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension* **11**, I153–157 (1988).
9. Schiavone, M. T., Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Khosla, M. C. & Ferrario, C. M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4095–4098 (1988).
10. Campagnole-Santos, M. J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am. J. Physiol.* **257**, H324–329 (1989).
11. Santos, R. A. S. & Ferreira, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **16**, 122–128 (2007).
12. Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J. & Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul. Pept.* **91**, 45–62 (2000).
13. Tipnis, S. R. *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33238–33243 (2000).
14. Donoghue, M. *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **87**, E1–9 (2000).
15. Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J. & Hooper, N. M. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* **383**, 45–51 (2004).
16. Vickers, C. *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **277**, 14838–14843 (2002).
17. Santos, R. A. *et al.* Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res. Bull.* **35**, 293–298 (1994).
18. Santos, R. A. S. *et al.* Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension* **41**, 737–743 (2003).

19. Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O. & Wigler, M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* **45**, 711–719 (1986).
20. Young, D., O'Neill, K., Jessell, T. & Wigler, M. Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5339–5342 (1988).
21. Alenina, N., Xu, P., Rentzsch, B., Patkin, E. L. & Bader, M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7). *Experimental Physiology* **93**, 528–537 (2008).
22. Sasaki, K. *et al.* Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**, 230–233 (1991).
23. Metzger, R. *et al.* Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Letters* **357**, 27–32 (1995).
24. Jackson, T. R., Blair, L. A., Marshall, J., Goedert, M. & Hanley, M. R. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* **335**, 437–440 (1988).
25. Ambroz, C., Clark, A. J. & Catt, K. J. The mas oncogene enhances angiotensin-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1133**, 107–111 (1991).
26. Santos, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8258–8263 (2003).
27. Santos, R. A. S. *et al.* Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* **47**, 996–1002 (2006).
28. Xu, P. *et al.* Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension* **51**, 574–580 (2008).
29. De Moura, M. M. *et al.* Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides* **31**, 1934–1939 (2010).
30. Fraga-Silva, R. A. *et al.* The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol. Med.* **14**, 28–35 (2008).
31. Chiu, A. T. *et al.* Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **165**, 196–203 (1989).
32. Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. & Bernstein, K. E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233–236 (1991).
33. Kambayashi, Y., Takahashi, K., Bardhan, S. & Inagami, T. Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor. *Kidney Int.* **46**, 1502–1504 (1994).
34. Nouet, S. & Nahmias, C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 1–6 (2000).
35. Rodrigues-Ferreira, S. & Nahmias, C. An ATypical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 684–690 (2010).
36. Horiuchi, M., Akishita, M. & Dzau, V. J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* **33**, 613–621 (1999).
37. Steckelings, U. M., Kaschina, E. & Unger, T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* **26**, 1401–1409 (2005).
38. Steckelings, U. M. *et al.* The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **11**, 67–73 (2010).



39. Avila, M. D., Morgan, J. P. & Yan, X. Genetically modified mouse models used for studying the role of the AT<sub>2</sub> receptor in cardiac hypertrophy and heart failure. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 141039 (2011).
40. Kaschina, E. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* **118**, 2523–2532 (2008).
41. Wan, Y. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT<sub>2</sub> receptor agonist. *J. Med. Chem.* **47**, 5995–6008 (2004).
42. Passos-Silva, D. G., Verano-Braga, T. & Santos, R. A. S. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci.* **124**, 443–456 (2013).
43. Bader, M., Santos, R. A., Unger, T. & Steckelings, U. M. New therapeutic pathways in the RAS. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **13**, 505–508 (2012).
44. Siragy, H. M. & Carey, R. M. The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 264–269 (1997).
45. Sampaio, W. O. *et al.* Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* **49**, 185–192 (2007).
46. Santos, R. A. S., Ferreira, A. J. & Simões E Silva, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol.* **93**, 519–527 (2008).
47. Stoll, M. *et al.* The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 651–657 (1995).
48. Zhang, F., Hu, Y., Xu, Q. & Ye, S. Different Effects of Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *PLoS ONE* **5**, e12323 (2010).
49. Rowe, B. P., Saylor, D. L., Speth, R. C. & Absher, D. R. Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regul. Pept.* **56**, 139–146 (1995).
50. Walters, P. E., Gaspari, T. A. & Widdop, R. E. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* **45**, 960–966 (2005).
51. Tesanovic, S., Vinh, A., Gaspari, T. A., Casley, D. & Widdop, R. E. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1606–1613 (2010).
52. Castro, C. H. de *et al.* Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the mouse heart. *Hypertension* **46**, 937–942 (2005).
53. Gironacci, M. M., Adler-Graschinsky, E., Peña, C. & Enero, M. A. Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on the release of [3H]norepinephrine from rat atria. *Hypertension* **24**, 457–460 (1994).
54. Macari, D., Bottari, S., Whitebread, S., De Gasparo, M. & Levens, N. Renal actions of the selective angiotensin AT<sub>2</sub> receptor ligands CGP 42112B and PD 123319 in the sodium-depleted rat. *Eur. J. Pharmacol.* **249**, 85–93 (1993).
55. Nossaman, B. D., Feng, C. J., Kaye, A. D. & Kadowitz, P. J. Analysis of responses to ANG IV: effects of PD-123319 and DuP-753 in the pulmonary circulation of the rat. *Am. J. Physiol.* **268**, L302–308 (1995).

56. Lautner, R. Q. *et al.* Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* **112**, 1104–1111 (2013).
57. Klemm, J. D., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 569–592 (1998).
58. Breitwieser, G. E. G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Implications for G Protein Activation and Cell Signaling. *Circulation Research* **94**, 17–27 (2004).
59. AbdAlla, S., Lothar, H., El Massiery, A. & Quitterer, U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat. Med.* **7**, 1003–1009 (2001).
60. Kostenis, E. *et al.* G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* **111**, 1806–1813 (2005).
61. Fernandes, L. *et al.* Potentiation of Bradykinin by Angiotensin-(1-7) on Arterioles of Spontaneously Hypertensive Rats Studied In Vivo. *Hypertension* **37**, 703–709 (2001).
62. Carvalho, M. B. L. *et al.* Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats. *Hypertension* **50**, 762–767 (2007).
63. AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M. & Quitterer, U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* **276**, 39721–39726 (2001).
64. Abadir, P. M., Periasamy, A., Carey, R. M. & Siragy, H. M. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension* **48**, 316–322 (2006).
65. Miura, S.-I., Karnik, S. S. & Saku, K. Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 18237–18244 (2005).
66. Piston, D. W. & Kremers, G.-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 407–414 (2007).
67. Heringer-Walther, S. *et al.* Baroreflex Improvement in SHR After ACE Inhibition Involves Angiotensin-(1-7). *Hypertension* **37**, 1309–1314 (2001).
68. De Moura, M. M. *et al.* Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides* **31**, 1934–1939 (2010).
69. Ichiki, T. *et al.* Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* **377**, 748–750 (1995).
70. Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J. & Kobilka, B. K. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* **377**, 744–747 (1995).
71. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (CSHL Press, 2001).
72. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104–108 (1992).
73. Wouters, F. S. & Bastiaens, P. I. Imaging protein-protein interactions by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 19**, Unit19.5 (2001).
74. Campagnole-Santos, M. J., Diz, D. I. & Ferrario, C. M. Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* **11**, 1167–1171 (1988).
75. Dinant, C., Van Royen, M. E., Vermeulen, W. & Houtsmuller, A. B. Fluorescence resonance energy transfer of GFP and YFP by spectral imaging and quantitative acceptor photobleaching. *J Microsc* **231**, 97–104 (2008).

76. Clavreul, N., Sansilvestri-Morel, P., Magard, D., Verbeuren, T. J. & Rupin, A. (Pro)renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**, F1310–1318 (2011).
77. Milligan, G. G Protein-Coupled Receptor Dimerization: Function and Ligand Pharmacology. *Mol Pharmacol* **66**, 1–7 (2004).
78. Hammond, S., Kaplarevic, M., Borth, N., Betenbaugh, M. J. & Lee, K. H. Chinese hamster genome database: An online resource for the CHO community at [www.CHOgenome.org](http://www.CHOgenome.org). *Biotechnology and Bioengineering* **109**, 1353–1356 (2012).
79. Miura, S., Matsuo, Y., Kiya, Y., Karnik, S. S. & Saku, K. Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 85–90 (2010).
80. Rabelo, L. A. *et al.* Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens* **2**, 418–424 (2008).