

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

ANTONIO AUGUSTO BASTOS PELUSO

**EFEITO COMPARATIVO ENTRE A ANGIOTENSINA-(1-7) E O NOVO AGONISTA DO  
RECEPTOR MAS, CGEN 856S, NAS VIAS AKT/eNOS E AKT/FOXO1 UTILIZANDO  
MODELOS CELULARES**

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

BELO HORIZONTE

2014

ANTONIO AUGUSTO BASTOS PELUSO

**EFEITO COMPARATIVO ENTRE A ANGIOTENSINA-(1-7) E O NOVO AGONISTA DO  
RECEPTOR MAS, CGEN 856S, NAS VIAS AKT/eNOS E AKT/FOXO1 UTILIZANDO  
MODELOS CELULARES**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Ciências Biológicas/  
Fisiologia e Farmacologia  
do Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do título  
de mestre, área de concentração em Fisiologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

BELO HORIZONTE

2014

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida;

Aos meus pais, José e Elaine e irmãos Bráulio e Allan, por todo suporte e apoio às minhas decisões;

Ao meu orientador, Prof. Robson Santos, pela confiança, apoio, oportunidades, ensinamentos privilegiados de um pesquisador único e por sempre ter acreditado em mim;

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão, em especial à Danielle Silva, pessoa fundamental para o desenvolvimento deste trabalho; à Jousie, por todos os ensinamentos e amizade destes últimos quatro anos como aluno do laboratório; à Janaína por toda ajuda e ensinamentos quando tudo começou, Gisele Etelvino e Daniel Vilella pela ajuda indispensável nos experimentos finais realizados;

Aos amigos do “Nobreza Pura”: Aline Nardoni, Ana Paula Nadu, Cynthia Almedia, Danielle Silva (Dani GPS), Danielle Coutinho, Giselle Etelvino, Janaína Félix, Jouse e Neiva, pela amizade, apoio, momentos e companhias diferenciadas;

Aos demais professores e colegas do Laboratório de Hipertensão;

Ao curso de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do ICB/ UFMG;

A conclusão deste trabalho foi mais fácil e prazerosa com a presença e apoio de todos vocês. MUITO OBRIGADO.

**Apoio Financeiro**

FAPEMIG

INCT-NanoBioFar

## RESUMO

Estudos em biotecnologia baseados em uma plataforma computacional desenvolvida pela empresa *Compugen*, Tel Aviv – Israel – permitiram a descoberta de um potencial agonista do receptor Mas, o CGEN 856S, o qual produz vários efeitos semelhantes àqueles produzidos pela Ang-(1-7), incluindo efeitos anti-hipertensivos e cardioprotetores, como diminuição de isquemia, redução de fibrose renal e cardíaca e vasodilatação dependente de óxido nítrico (NO). Além disso, o CGEN 856S é capaz de atenuar o remodelamento cardíaco induzido por isoproterenol e lesão por infarto do miocárdio. Estudos utilizando fosfoproteômica mostraram que a Ang-(1-7) promove ativação e translocação nuclear do fator de transcrição FOXO1 em células de endotélio de aorta humana (HAEC). No entanto, ainda não é claro se o CGEN 856S é capaz de ativar as mesmas vias de sinalização intracelular anteriormente já demonstradas para Ang-(1-7). Este trabalho avaliou e comparou os efeitos do CGEN 856S e da Ang-(1-7) sobre a ativação das vias AKT/eNOS e AKT/FOXO1, utilizando diferentes modelos celulares. Células de ovário de *hamster* chinês (CHO) transfectadas com o receptor Mas (CHO-Mas) foram estimuladas com CGEN 856S e Ang-(1-7). Células CHO não transfectadas foram usadas como controle. O extrato proteico foi utilizado em *Western Blot* para detecção das proteínas AKT, AKT fosforilada, eNOS fosforilada, FOXO1 fosforilado, Mas e GAPDH. Células CHO-Mas e CHO foram expostas a ambos os peptídeos para medida da liberação de NO, através da técnica de incorporação de DAF-FM. Células HAEC, A549 e DU145 (as duas últimas, linhagens tumorais de câncer de pulmão humano e próstata humana, respectivamente) foram tratadas com CGEN 856S e Ang-(1-7) com ou sem tratamento prévio com A779, utilizadas para imunolocalização de FOXO1, analisadas por microscopia confocal e a intensidade de fluorescência nuclear foi quantificada. Células A549 e DU145 também foram utilizadas em teste de citotoxicidade, sendo tratadas com uma combinação dos inibidores de PI3K wortmannin ou LY294002 em diferentes concentrações e CGEN 856S ou Ang-(1-7). Os resultados mostraram uma diferença significativa no aumento da fosforilação da AKT, eNOS, bem como na desfosforilação de FOXO1 apenas em células CHO-Mas tratadas com CGEN 856S e Ang-(1-7). Células CHO-Mas tratadas com ambos os peptídeos também promoveram um aumento significativo na liberação de NO comparado com células CHO-Mas não tratadas. Não foram observadas diferenças em células CHO não transfectadas. Células HAEC, A549 e DU145 tratadas com CGEN 856S e Ang-(1-7) promoveram translocação nuclear significativa de FOXO1. O A779 bloqueou este efeito, pelo menos, parcialmente. Tanto em células A549 quanto em DU145, a combinação dos inibidores de PI3K wortmannin e LY294002 com CGEN 856S e Ang-(1-7) mostrou um efeito anti-proliferativo potencializado. Estes dados sugerem que tanto o CGEN 856S quanto a Ang-(1-7), como agonistas do

receptor Mas, possuem efeitos semelhantes e representam um potencial alvo terapêutico no câncer e em patologias cardiovasculares.

## ABSTRACT

Biotechnology studies based on a computational platform developed by *Compugen*, Tel Aviv, Israel - allowed the discovery of a potential Mas agonist, CGEN 856S, which produces several effects resembling those produced by Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], including anti-hypertensive and cardioprotective effects, such as decrease of ischemia, renal and cardiac fibrosis reduction and vasodilation nitric oxide (NO) dependent. Moreover, CGEN 8566S attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury. Studies using phosphoproteomics have shown that Ang-(1-7) promotes FOXO1 activation and nuclear translocation in human aortic endothelial cells (HAEC). It is not clear, however, whether CGEN 856S is capable to activate the same intracellular pathways than those previously demonstrated for Ang-(1-7). This study evaluated and compared the effect of CGEN 856S and Ang-(1-7) on AKT/eNOS and AKT/FOXO1 activation, using different cell types. Mas-transfected CHO (Chinese Hamster Ovary - CHO-Mas) cells were stimulated with CGEN 856S and Ang-(1-7). Non-transfected CHO cells were used as control. The protein extract was used for, AKT, phospho-AKT, phospho-eNOS, phospho-FOXO1, Mas and GAPDH detection by western blot. CHO-Mas and CHO cells were also exposed to both peptides for NO release measurement, through DAF-FM incorporation technique. HAEC, A549 and DU145 (human tumoral linages from lungs and prostate, respectively) cells were treated with CGEN 856S and Ang-(1-7) with or without previous A779 treatment. The cells were used for immunolocalization of FOXO1, analyzed by confocal microscope and the nuclear fluorescence intensity was quantified. A549 and DU145 cells were also used for cytotoxicity test, being treated with a combination of PI3 kinase inhibitors wortmannin or LY294002 in different concentrations and CGEN856S or Ang-(1-7). The results showed a significant increase phosphorylation of AKT, eNOS as well as the dephosphorylation of FOXO1 only in CHO-Mas cells treated with CGEN856S and Ang-(1-7). CHO-Mas transfect cells treated with CGEN 856S and Ang-(1-7) also promoted a significant release of NO compared with CHO-Mas non-treated cell. No differences were observed in CHO non-transfected cells. HAEC, A549 and DU145 cell types treated with CGEN 856S and Ang-(1-7) showed a significant FOXO1 nuclear translocation. A779 blocked this effect, at least partly. In both A549 and DU145 cells, the combination of the PI3 kinase inhibitors wortmannin and LY294002 with CGEN 856S or Ang-(1-7) showed a potentiated anti-proliferative effect. These data suggest that CGEN 856S and Ang-(1-7) as agonists of Mas receptor had similar effects, and thus represent a potential therapeutic target in cancer and cardiovascular pathologies.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Sistema renina-angiotensina

**Figura 2:** Modelo da placa de 96 poços utilizada em teste de citotoxicidade celular.

**Figura 3:** Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) nos níveis de fosforilação da eNOS.

**Figura 4:** Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) nos níveis de fosforilação da eNOS.

**Figura 5:** Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) nos níveis de fosforilação de FOXO1.

**Figura 6:** Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) na liberação de NO em células CHO-Mas.

**Figura 7:** Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) na liberação de NO em células CHO.

**Figura 8:** Imunolocalização de FOXO1 em células HAEC.

**Figura 9:** Imunolocalização de FOXO1 em células A549.

**Figura 10:** Imunolocalização de FOXO1 em células DU145.

**Figura 11:** Ensaio de citotoxicidade em células A549.

**Figura 12:** Ensaio de citotoxicidade em células A549.

**Figura 13:** Ensaio de citotoxicidade em células DU145.

**Figura 14:** Ensaio de citotoxicidade em células DU145.

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

± - Mais ou menos

μL - Microlitro

μM – Micromolar

μg – Micrograma

A549 – Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano

A-779 - Antagonista seletivo do receptor Mas

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

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

Ang A – Angiotensina A

AKT - Proteína quinase B

APS – Persulfato de amônio

AT1 - Receptor angiotensinérgico subtipo 1

AT2 - Receptor angiotensinérgico subtipo 2

ATCC – *American Type Culture Collection*

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

BSA - Albumina de soro bovino

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CHO - *Chinese Hamster Ovary*

CHO-Mas – Células CHO transfectadas com o receptor Mas

DAF-FM - 4-amino-5-metil amino-2'-7'-difluorofluoresceína diacetato

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM-F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DU145 – Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humana

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA - Ácido etilenediaminotetracético

EGTA - Ácido tetracético de etileno glicol

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

FOX – *Fator de transcrição Forkhead box*

FOXO1 - *Fator de transcrição Forkhead box*, subgrupo O1

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

GPCR – Receptor acoplado à proteína G

HCl – Ácido Clorídrico

HAEC – Célula endotelial de aorta humana

HBS - Solução salina balanceada de Hanks

KO - Nocaute

M – Molar

Mas - Receptor específico da Angiotensina-(1-7)

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

miRNA – Micro RNA

mL – Mililitro

mM - Milimolar

MrgD - Receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas - tipo D

Na - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaF - Fluoreto de sódio

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> - Ortovanadato de sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NEP - Endopeptidase neutra

NO – Óxido nítrico

nm – Nanômetros

One-away ANOVA - Análise de variância de uma via

PBS – Tampão fosfato-salino

PCP - Prolil-carboxipeptidase

PEP - Prolil-endopeptidase

pH - Potencial hidrogeniônico

PI3K - Fosfatidilinositol 3 quinase

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Ser - Serina

SFB – Soro fetal bovino

SRA – Sistema renina-angiotensina

TBS-T - Solução Tris-Base 1M pH 7,6 contendo 0,1% de Tween 20.

Thr - Treonina

Two-away ANOVA - Análise de variância de duas vias

U.A – Unidades Arbitrárias

V -Volts

## ÍNDICE

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O Sistema Renina Angiotensina Clássico.....	15
1.2 Novos componentes do SRA.....	15
1.3 Novos agonistas do receptor Mas.....	18
1.4 O CGEN 856S.....	18
1.5 O fator de transcrição FOXO1.....	19
1.6 FOXO como alvo para estudos do câncer.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 METODOLOGIA.....	22
3.1 Cultivo celular.....	22
3.1.1 Cultivo de células CHO e CHO-Mas.....	22
3.1.2 Cultivo de células HAEC.....	22
3.1.3 Cultivo de células A549 e DU145.....	22
3.2 Tratamentos.....	22
3.3 <i>Western Blot</i> .....	23
3.4 Media de NO intracelular.....	24
3.5 Imunolocalização de FOXO1.....	25
3.6 Teste de citotoxicidade.....	26
3.7 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 O CGEN 856S ativa a AKT em células CHO-Mas.....	28
4.2 O CGEN 856S ativa a eNOS em células CHO-Mas.....	30
4.3 O CGEN 856S e a Ang-(1-7) ativam FOXO1 em células CHO-Mas.....	32
4.4 O CGEN 856S promove liberação de óxido nítrico em células CHO-Mas.....	34
4.5 O CGEN 856S e a Ang-(1-7) translocam FOXO1 para o núcleo de células HAEC, A549 e DU145.....	36
4.6 O CGEN 856S e a Ang-(1-7) potencializam o efeito dos inibidores da PI3K.....	44
5 DISCUSSÃO.....	49

6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXO.....	58

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Sistema Renina-Angiotensina clássico

O sistema renina-angiotensina (SRA) é descrito como endócrino e tecidual, o qual desempenha importante papel fisiológico no controle vascular, renal e cardíaco. Classicamente é composto pelo Angiotensinogênio, uma  $\alpha$ -glicoproteína produzida principalmente pelo fígado e secretada na corrente sanguínea. Esta é clivada pela renina, uma protease produzida nos rins e secretada por células justaglomerulares da arteríola aferente, produzindo Angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo biologicamente inativo. A Ang I pode ser produzida a partir do Angiotensinogênio por meio de outras enzimas e parece estar relacionada com o nível de peptídeos angiotensinérgicos nos tecidos. No entanto, a renina é a principal enzima que desencadeia a formação dos peptídeos circulantes.

A Ang I é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina, a ECA, produzindo o peptídeo Angiotensina II (Ang II). Este peptídeo liga-se principalmente a dois receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, o AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub>, descritos por produzirem efeitos usualmente opostos.

O receptor AT<sub>1</sub> encontra-se principalmente em tecidos cardiovasculares e neuroendócrinos de adultos e está relacionado com efeitos de vasoconstrição, retenção do íon sódio e água nos túbulos renais, liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, elevação da pressão arterial, aumento da contratilidade cardíaca, além de efeitos pró-fibróticos e hipertróficos (Neves et al., 1997; Timmermans et al., 1992). O receptor AT<sub>2</sub> é encontrado durante todo desenvolvimento do indivíduo e inclui dentre seus efeitos, vasodilatação dependente de óxido nítrico (NO) ou guanosina monofosfato cíclico (GMPc), além de apoptose e inibição da proliferação celular (Batenburg et al., 2004; Tsutsumi et al., 1999).

## 1.2 Novos componentes do SRA

O atual SRA é composto por uma série de peptídeos, enzimas e receptores biologicamente ativos em adição ao sistema clássico (Figura 1). A Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) é um heptapeptídeo formado a partir da Ang I de forma dependente ou independente da Enzima Conversora de Angiotensina 2, a ECA2 (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). Esta se encontra presente principalmente em células endoteliais, artérias, arteríolas, veias do coração e dos rins e não pode ser bloqueada pelos clássicos inibidores da ECA. A Ang-(1-7) pode ser formada ainda pela ação da prolil-endopeptidase (PEP), endopeptidase

neutra (NEP) ou a partir da Ang II pela ação da PEP e prolil-carboxipeptidase (PCP) (Santos et al., 2000; Welches et al., 1993).

A Ang-(1-7) foi descrita como um peptídeo contra-regulatório aos efeitos da Ang II (Santos et al., 2000) sendo capaz de promover ações como vasodilatação, anti-arritmogênese, anti-trombogênese e anti-fibrogênese (Ferreira et al., 2001; Ferreira & Santos, 2005; Grobe et al., 2006). Recentemente, o SRA tem sido relacionado com a via de sinalização da insulina, onde a Ang II modula negativamente essa via. A Ang-(1-7), ao contrário, estimula a via da insulina, melhorando assim, o metabolismo de glicose e lipídeos. Camundongos nocaute (KO) para o receptor Mas, por exemplo, desenvolvem estado de síndrome metabólica caracterizado por mudanças dramáticas no metabolismo glicêmico e lipídico (Giani et al., 2009; Santos et al., 2008).

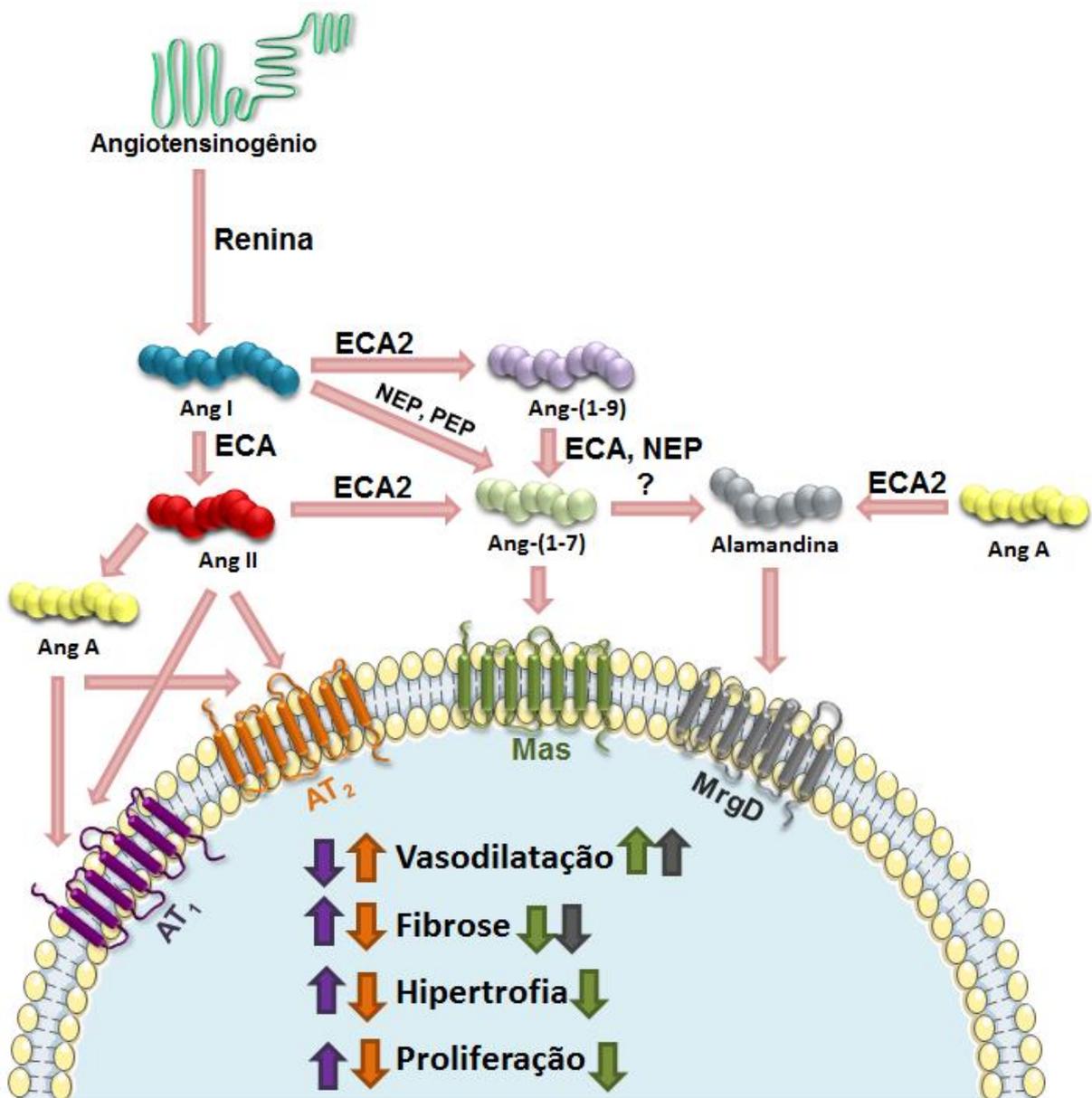
A Ang-(1-7) também é descrita como capaz de promover efeitos anti-proliferativos e anti-angiogênicos. Soto-Pantoja et al., 2009 mostraram que este peptídeo inibe tanto o crescimento de células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) quanto a angiogênese tumoral com diminuição da formação de túbulos por células endoteliais humanas e correspondente redução de fator de crescimento endotelial vascular *in vitro*. Além disso, esse peptídeo tem sido relacionado com o estudo de outros tipos de câncer, promovendo a diminuição de fibrose em tumor de mama (Cook et al., 2010) atenuação da metástase causada por câncer de próstata, bem como redução da osteoclastogênese (Krishnan, et al., 2013).

Atualmente, testes clínicos de fase I e II utilizando a Ang-(1-7) para o tratamento do câncer estão em andamento. Os estudos clínicos de Petty et al., 2009 fornecem evidências da Ang-(1-7) como uma droga anti-angiogênica, a qual possui o receptor Mas como alvo. Além disso, segundo o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (<http://clinicaltrials.gov>), é possível encontrar testes clínicos utilizando a Ang-(1-7) no tratamento de pacientes com tumores sólidos, bem como pacientes com câncer em estado de metástase os quais não podem ser removidos por cirurgia.

A ação da Ang-(1-7) está relacionada à ligação e ativação de seu receptor específico, o Mas, descrito por Santos et al., 2003. O Mas é classificado como um receptor de sete domínios transmembrana acoplado à proteína G, o qual pode ter seus efeitos bloqueados de forma seletiva pelo antagonista A-779. O receptor Mas é amplamente expresso em testículo e cérebro, mas também pode ser detectado em outros tecidos, como no endotélio vascular humano, onde ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) via cascata fosfatidilinositol 3 quinase/ proteína quinase B (PI3K/AKT) (Sampaio et al., 2007). Assim, vários efeitos causados por este peptídeo angiotensinérgico tem sido

descritos, apesar de pouco se saber sobre os mecanismos moleculares envolvidos em suas propriedades biológicas.

Recentemente, Lautner et al., 2013 descreveram e caracterizaram um novo peptídeo do SRA, a Alamandina, a qual pode ser formada a partir da Ang-(1-7) ou Angiotensina A (Ang A), um peptídeo formado a partir da Ang II (Jankowski et al., 2007). O aminoácido Asp<sup>1</sup> da Ang-(1-7) é descarboxilado em Ala<sup>1</sup>, enquanto o aminoácido C-terminal da Ang A é clivado pela ação da ECA2, formando-se a Alamandina. O mesmo trabalho também descreveu o receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas - tipo D (MrgD) como receptor para Alamandina. Dentre as ações deste peptídeo, destacam-se a vasodilatação, liberação de NO, efeitos anti-hipertensivos e anti-fibróticos (Lautner et al., 2013).



**Figura 1:** Sistema renina-angiotensina. Ang: Angiotensina; AT1: Receptor da Ang II tipo 1; AT2: Receptor da Ang II tipo 2; ECA: Enzima conversora de angiotensina; ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2; Mas: Receptor da Ang-(1-7), MrgD: Receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas tipo - D; NEP: Endopeptidase neutra; PEP: Prolil-endopeptidase.

### 1.3 Novos agonistas do receptor Mas

Os efeitos benéficos promovidos pela ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas mostrados em diversos estudos tem reforçado a busca por novos agonistas capazes de estimular esse eixo. Como exemplo, tem-se o AVE-0991 (Ferreira et al., 2007 - A), o CGEN 856S (Silvia Quintão Savernini et al., 2010), dentre outros compostos análogos (Bader et al., 2012).

O AVE-0991 foi descrito como um composto não peptídico análogo à Ang-(1-7) de caráter hidrofóbico, o qual pode atravessar a barreira hematoencefálica e exercer funções centrais. Além disso, o AVE-0991 preveniu hipertrofia e deposição de colágeno induzida por Ang II (Ferreira et al., 2007 - B).

### 1.4 O CGEN 856S

Avanços em biotecnologia baseados em uma plataforma biológica computacional desenvolvida pela *Compugen Ltd* (Tel Aviv, Israel), empresa de biotecnologia, permitiram análises para a predição de possíveis peptídeos ligantes à receptores acoplados a proteína G (GPCRs) inseridos no proteoma humano utilizando o banco de dados Uniprot/Swiss Protein e banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (GenBank™ versão 149).

Seguindo parâmetros numéricos através de um programa computacional de classificação, baseado no algoritmo *Random Forest*, atribuiu-se pontuações para cada peptídeo capaz de se ligar à GPCRs, obtendo-se em um total de 100 possíveis ligantes. Aqueles que alcançaram maior pontuação foram analisados manualmente por pesquisadores de acordo com diversos critérios, dentre eles: conservação da sequência e sítios de clivagem do peptídeo na proteína precursora; número de resíduos cisteína, ligações dissulfeto; perfil de expressão e especificidade tecidual do precursor em relação ao receptor. Assim, o processo de seleção manual resultou em um subgrupo de 33 novos peptídeos (Kliger et al., 2008; Shemesh et al., 2008).

Foram analisados quais dos 33 peptídeos eram capazes de promover a ativação de 152 GPCRs considerando-se a relevância clínica de cada um, dentre eles o receptor Mas, através de ensaio de influxo de cálcio em células CHO (do inglês, *Chinese Hamster*

Ovary) transfetadas com o receptor Mas (CHO-Mas). Dois peptídeos foram capazes de promover o influxo de cálcio em células CHO-Mas, o CGEN 856 e o CGEN 857, os quais tiveram o aminoácido terminal de cisteína substituído por outro de serina e treonina, respectivamente, para evitar a formação de ligação dissulfeto. Desta forma, foram desenvolvidos os peptídeos CGEN 856S e CGEN 857V que também mostraram-se capazes de promover o influxo de íons cálcio em células CHO-Mas. Estes peptídeos, apesar de agonistas do receptor Mas, não possuem homologia com as angiotensinas e não foram capazes de se ligar aos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Shemesh et al., 2008).

O CGEN 856S possui 24 aminoácidos (Fen-Leu-Gli-Tir-Ser-Ile-Tir-Leu-Asn-Arg-Lis-Arg-Arg-Gli-Asp-Pro-Ala-Fen-Lis-Arg-Arg-Leu-Arg-Asp) e aparentemente é mais estável do que a Ang-(1-7). Segundo estudos de (Savergnini et al., 2010), o CGEN 856S promoveu efeitos anti-hipertensivos e cardioprotetores incluindo diminuição de isquemia, redução de fibrose cardíaca e renal e vasodilatação dependente de óxido nítrico. Recentemente, o mesmo grupo mostrou que o CGEN 8566S reduziu o remodelamento cardíaco induzido por isoproterenol (Savergnini et al., 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual o CGEN 856S promove tais efeitos ainda não é completamente esclarecido. Devido aos efeitos já descritos para o CGEN 856S, o mesmo foi escolhido para este trabalho.

## 1.5 O fator de transcrição FOXO1

*Forkhead box*, subgrupo O1 (FOXO1), é um fator de transcrição chave na regulação de vários processos celulares, o qual é capaz de se ligar ao DNA, exercendo suas funções, como apoptose, parada do ciclo celular, resistência ao estresse, reparo de dano ao DNA e supressão tumoral. (Greer & Brunet, 2005; Zhao et al., 2011). Quando ativado, FOXO1 encontra-se desfosforilado e no núcleo celular, onde irá ativar a transcrição de um grupo de genes. Assim, no núcleo, FOXO1 se liga em seus motivos de DNA consenso para ativar a transcrição de genes alvo, como CDKN1A, CDKN1B (inibidores de quinase dependente de ciclinas, envolvidas no ciclo celular), GADD45 e SOD2 (envolvidas no reparo de DNA e resposta ao estresse, respectivamente) e FASLG, TRAIL e BIM (envolvidos em apoptose), assim como inibir genes relacionados à proliferação.

Mutações de ponto, amplificação de genes, translocação de genes da família FOX, repressão mediada por miRNA, bem como sequestro de proteínas FOX para o citoplasma mediada pela AKT alteram diretamente a função de FOX em células tumorais. Isso faz com que este fator de transcrição perca a função de supressão tumoral (Katoh et al., 2013). Alterações relacionadas à inativação de genes da família FOX leva a sua exportação para o citoplasma e consequente inativação. Dessa forma, há uma perda do

controle transcricional dos genes regulados por FOX, o que pode gerar um estado proliferativo descontrolado.

A via PI3K/AKT foi a primeira a ser descrita na regulação da função de genes FOXO, sendo bem conservada em células de mamíferos. Nesse tipo celular, a fosforilação de FOXO se dá após estimulação por uma variedade de fatores de crescimento, incluindo a insulina, fatores de crescimento epidermal e eritropoietina (Arden, 2006). Além da via PI3K/AKT, a SGK, uma proteína quinase relacionada com a AKT, reconhece os mesmos sítios que esta e tem se mostrado capaz de fosforilar FOXO1.

O bloqueio da via PI3K/AKT pode ser feito utilizando-se diversos inibidores seletivos para estas proteínas como, por exemplo, o Wortmannin e o LY294002. O Wortmannin é um inibidor de PI3K que atua de forma irreversível ligando-se covalentemente à subunidade p110 da PI3K. O inibidor LY294002 também é um inibidor de PI3K, no entanto esse atua de forma reversível, competindo pela subunidade p85 $\alpha$  da PI3K.

## **1.6 FOXO como alvo de estudos do câncer**

A super ativação da via PI3K/AKT é um marco em muitos tipos de câncer, especialmente aqueles de origem epitelial. Como os fatores FOXO são inativados por esta via, uma estratégia potencial para o tratamento do câncer seria ter como alvo a reativação dos fatores FOXO em células tumorais utilizando terapias gênicas e farmacológicas.

Estudos utilizando RNA de interferência para PI3K em três diferentes estágios do desenvolvimento do câncer de mama resultaram em diminuição significativa da viabilidade celular e indução de apoptose em células tumorais independente do estágio que se encontravam. Além disso, a inibição da PI3K resultou em ativação significativa dos fatores FOXO e simultânea indução de apoptose FOXO-dependente (Reagan-Shaw & Ahmad, 2007).

Estudos utilizando fosfoproteômica mostraram que a Ang-(1-7) fosforila diversas proteínas quinase e desfosforila o fator de transcrição FOXO1 no resíduo de Serina256, em células de endotélio de aorta humana (HAEC), ativando-o e promovendo sua translocação para o núcleo celular. Além disso, o mesmo trabalho mostrou a translocação de FOXO1 em células A549 (Verano-Braga et al., 2012).

Estudos anteriores confirmam a presença constitutiva do receptor Mas em células endoteliais de aorta humana (HAEC) (Sampaio et al., 2007) assim como em linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) (Gallagher & Tallant, 2004) e próstata humana (DU145)(Krishnan et al., 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar e comparar os efeitos dos peptídeos agonistas do receptor Mas, CGEN856S e Ang-(1-7) em diferentes modelos celulares.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar e comparar os efeitos da exposição aguda ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) na ativação da via AKT/eNOS em células CHO-Mas;
- Avaliar e comparar a produção de NO em células CHO-Mas expostas ao CGEN 856S e a Ang-(1-7);
- Avaliar e comparar o efeito da exposição aguda ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) na ativação do fator de transcrição FOXO1 em células CHO-Mas;
- Verificar a translocação de FOXO1 em células de endotélio de aorta humana (HAEC) e células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e próstata (DU145) humanas expostas ao CGEN 856S e a Ang-(1-7);
- Verificar se o antagonista seletivo do receptor Mas, o A-779 é capaz de bloquear a translocação de FOXO1 em células HAEC, A549 e DU145 expostas aos peptídeos CGEN 856S e Ang-(1-7);
- Verificar se o CGEN 856S e a Ang-(1-7) são capazes de potencializar o efeito dos inibidores de PI3K wortmannin e LY294002 em teste de citotoxicidade, utilizando as linhagens de células tumorais A549 e DU145.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Cultivo celular**

##### **3.1.1 Cultivo de células CHO e CHO-Mas**

Células de ovário de *hamster* chinês estavelmente transfectadas com o cDNA para o receptor Mas e selecionadas por neomicina (CHO-Mas) ou não (CHO), foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e mantidas a 37°C em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%.

##### **3.1.2 Cultivo de células HAEC**

Células de endotélio de aorta humana (HAEC - *Human Aortic Endothelial Cells*) obtidas do banco de células americano (ATCC - *American Type Culture Collection*) foram cultivadas em Meio 200 (Gibco, Estados Unidos) com suplemento específico (*Low Serum Growth Supplement kit*, Gibco, Estados Unidos) e mantidas a 37°C em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%.

##### **3.1.3 Cultivo de células A549 e DU145**

Linhagens de células tumorais humanas provenientes de epitélio pulmonar (A549) e epitélio de próstata (DU145), ambas obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e mantidas a 37°C em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%.

#### **3.2 Tratamentos**

Células CHO-Mas e CHO foram mantidas em meio DMEM-F12 sem soro por 4 horas, estimuladas com CGEN 856S e Ang-(1-7), ambos a 10<sup>-7</sup>M e 10<sup>-9</sup>M durante 5 e 10 minutos e o extrato proteico foi utilizado na técnica de Western Blot. Concentração e tempo de exposição aos peptídeos foram escolhidos inicialmente baseando-se em estudos anteriores de Sampaio et al., 2007. A melhor condição de tratamento observada nestas células por Western Blot foi escolhida para técnica de ensaio da media de óxido nítrico intracelular.

Células HAEC foram estimuladas com CGEN 856S e Ang-(1-7), ambos na concentração de 10<sup>-7</sup>M durante 3 e 10 minutos na presença e ausência de A-779 (este último pré-incubado a 10<sup>-6</sup>M por 10 minutos) e utilizadas para imunolocalização de FOXO1. Células HAEC não estimuladas foram utilizadas como controle. Concentração e tempo de exposição aos peptídeos foram escolhidos inicialmente baseando-se em estudos anteriores de Verano-Braga et al., 2012.

Células A549 e DU145 foram estimuladas com Ang-(1-7) e CGEN 856S, ambos na concentração  $10^{-7}$ M durante 3 e 10 minutos na presença e ausência de A-779 (este último pré-incubado a  $10^{-6}$ M por 10 minutos) e utilizadas para imunolocalização de FOXO1 ou ainda na concentração de  $10^{-6}$ M por 48 horas quando em teste de citotoxicidade. Neste último teste, também foram utilizados os inibidores de PI3K wortmannin (Invitrogen, Estados Unidos) ou LY294002 (Invitrogen, Estados Unidos) diluídos de forma seriada. Células A549 e DU145 não tratadas foram usadas como controle.

### 3.3 Western Blot

A técnica de *Western Blot* foi utilizada para determinar a influência dos peptídeos CGEN 856S e Ang-(1-7) na ativação das vias AKT/eNOS e AKT/FOXO1 através da fosforilação das enzimas AKT em Ser473, isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) em Ser1177 e Thr495 (sítios de ativação e inativação, respectivamente), fator de transcrição FOXO1 em Ser256, bem como a participação do receptor Mas em promover esta ativação. Para isso, foram utilizadas células CHO transfectadas com o receptor Mas e células CHO não transfectadas utilizadas como controle.

Após a estimulação com os peptídeos, as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x e lisadas com tapão de lise contendo 1% Triton X-100, 50mM de pirofosfato de Na, 50mM de NaF, 5mM de NaCl, 5mM de  $\text{Na}_2$  EDTA, 5mM de EGTA, 10mM de HEPES, 40 $\mu$ l/ml de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , além de uma pastilha contendo um coquetel de inibidores de protease (Roche, Estados Unidos). O material extraído foi lisado ainda por ultrassom e centrifugado a 14000 RPM, 4°C por 15 minutos a fim de descartar todo o *debris* celular. O sobrenadante foi recolhido para outro tubo. A concentração proteica das amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro, em triplicatas e por comparação com curva de solução de albumina em concentrações conhecidas, através do método de Bradford (Bradford, 1976).

Preparou-se alíquotas contendo o volume necessário para uma carga de 60  $\mu$ g de proteína total de células CHO-Mas e CHO para análise de todas as proteínas desejadas. Para isso, foi adicionado o tampão de amostra Lammeli 5X (4 mL de Tris-HCl 1,5M pH 6,8, 10 mL de glicerol, 5 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol, 2 g de SDS, 1mL de 1% azul de bromofenol) e todas as alíquotas foram padronizadas para um volume final de 15  $\mu$ L completando o volume de cada uma com água Milli-Q, quando necessário. As amostras depois de preparadas foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos.

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 4% (0,5 M Tris HCl pH:6,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS e Temed) e 10% (1,5 M Tris HCl pH: 8,8,

acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em tampão de eletroforese (25mM de Tris HCl ,190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 150V por aproximadamente 1 hora, para separação proteica por peso molecular. Em seguida, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose por meio de nova eletroforese. Para isso, o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados de forma sobreposta em uma solução tampão de transferência que foi mantida em aproximadamente 4°C durante todo processo de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM e Metanol 20%) com corrente constante de 100V por 1,5 horas.

Ao final da transferência, as membranas foram coradas com solução Ponceau para verificação da eficiência da transferência. A solução Ponceau foi removida das membranas com solução TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,6), e posteriormente foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com solução de bloqueio - leite desnatado 5% em TBS-T para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* à 4°C, sob agitação, em TBS-T adicionado dos seguintes anticorpos primários: Mas (produzido pelo Laboratório de Hipertensão da UFMG utilizando camundongos nocaute para a proteína Mas - diluição 1:500), p-AKT Ser473 (Cell signalling, Boston, Estados Unidos - diluição 1:500), AKT (Cell signalling, Boston, Estados Unidos - diluição 1:1000), p-eNOS Ser1177 (Cell signalling, Boston, Estados Unidos – diluição 1:250), p-eNOS Thr475 (Cell signalling, Boston, Estados Unidos – diluição: 1:250) p-FOXO1 (Abcam, Estados Unidos - diluição 1:500) e GAPDH (Sigma, Estados Unidos - diluição 1:2000). Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes com solução TBS-T a cada 10 minutos, para remoção do excesso de anticorpo primário e possível ligação inespecífica. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário fluorescente (Li-cor, Estados Unidos – diluição 1:10.000), imunoglobulina IgG anti-camundongo ou anti-coelho, de acordo com as especificações do animal onde foi produzido o anticorpo primário.

A detecção das proteínas foi realizada por um sistema de *scanner* de fluorescência (Odyssey – Li-cor, Estados Unidos) de acordo com o comprimento de onda do anticorpo secundário, por meio do *software* Odyssey. A intensidade de fluorescência foi quantificada por densitometria (*software* Odyssey) e normalizada pelo controle endógeno GAPDH ou proteína total no caso de proteína fosforilada.

### **3.4 Medida de NO intracelular**

Em experimentos utilizando fluorescência, células CHO-Mas e CHO foram plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com Poli-L-lisina (Sigma, Estados Unidos), cerca de 48 a 72 horas antes do experimento. Após atingirem aproximadamente 80% de

confluência, essas foram pré-incubadas por 30 minutos em meio DMEM-F12 contendo 4-amino-5-metil amino-2'-7'-difluorofluoresceína diacetato, o qual após reagir com o NO forma um composto benzotriazol fluorescente com excitação/emissão máxima de 495/515 nm (DAF-FM diacetato; Molecular Probes). Depois de lavadas com PBS 1X a 37°C, as células foram estimuladas com Ang-(1-7) ou CGEN 856S, ambos na concentração de  $10^{-7}$ M durante 10 minutos. Células controle foram mantidas em meio de cultivo sem nenhum tratamento. Após o período de incubação, o meio de cultivo foi descartado e as células lavadas com PBS 1X a 37°C. Cada lamínula foi cuidadosamente colocada em lâminas contendo *Hydromount*® (*National Diagnostics*, Estados Unidos) e imediatamente analisada. Imagens de fluorescência foram obtidas através de microscopia confocal utilizando-se *laser* de argônio com excitação em 488 nm (microscópio confocal *Zeiss 510 Meta Laser*), equipado com lente objetiva de óleo de imersão com capacidade de aumento de 63x. A intensidade de fluorescência de 13 a 19 células por grupo foi obtida e quantificada utilizando-se o *software Image J* (*Image Processing and Analysis in Java*. NIH- Estados Unidos <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>).

### 3.5 Imunolocalização de FOXO1

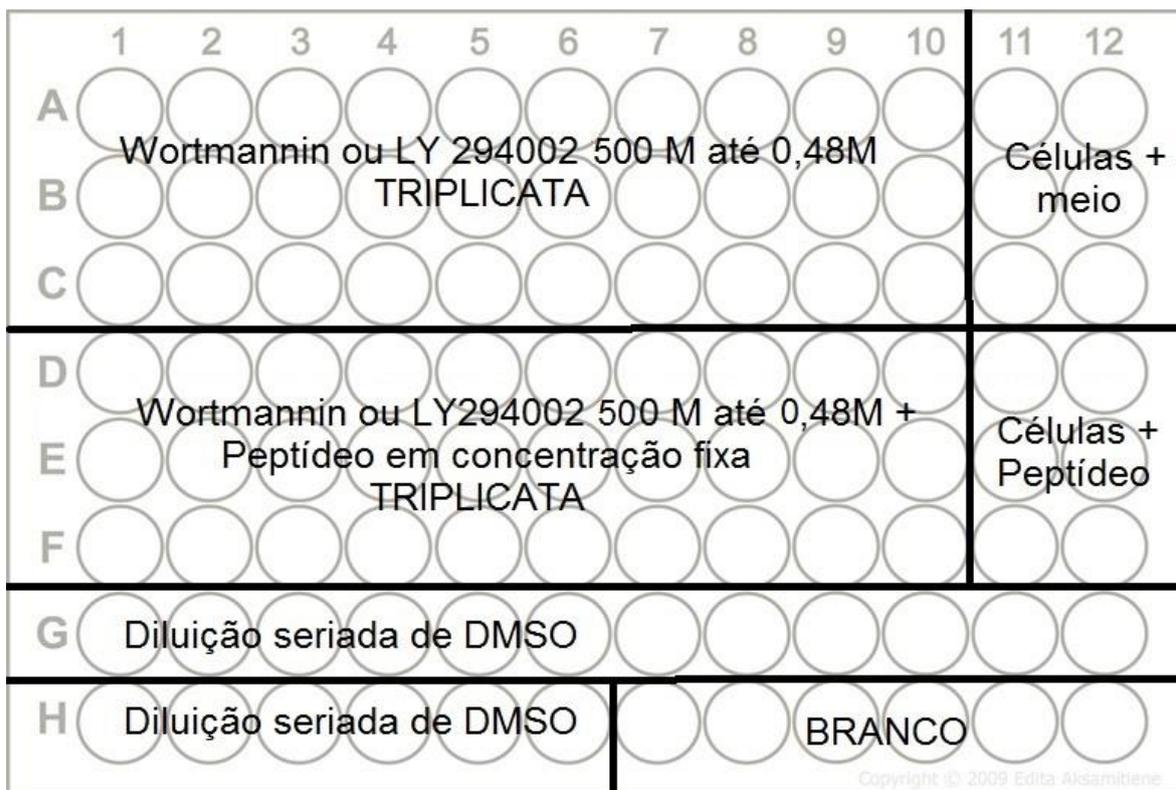
Todas as células utilizadas foram mantidas em meio sem soro 3 horas antes dos experimentos. Células HAEC, A549 e DU145 foram cultivadas em lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina (Sigma, Estados Unidos) até atingirem confluência de até 80%. Após serem estimuladas com Ang-(1-7) ou CGEN 856S, ambos na concentração de  $10^{-7}$ M durante 3 e 10 minutos, foram lavadas com PBS 1X. Este foi completamente removido e as células foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS 1X por 15 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução Triton X-100 0,5 % em PBS 1X durante 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram mantidas em solução de bloqueio contendo albumina de soro bovino (BSA) 4% em PBS 1X por 1 hora. Após o bloqueio, adicionou-se o anticorpo primário policlonal anti-FOXO1 (Cell Signaling, Estados Unidos – diluição 1:200) diluído em PBS 1X, o qual foi mantido *overnight* a 4°C. O anticorpo primário foi removido e, em ambiente escuro, adicionou-se o anticorpo secundário Alexa 488 *anti-rabbit* conjugado (Invitrogen, Estados Unidos – diluição 1:1.000) durante 1 hora em temperatura ambiente. Entre cada etapa, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X. Selou-se, então, as lamínulas em lâminas com Vectashield (Vector Laboratories, Estados Unidos) contendo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um ligante específico de DNA. As lâminas foram analisadas por microscopia confocal (microscópio confocal *Zeiss 510 Meta Laser*), equipado com lente objetiva de óleo de imersão com capacidade de aumento de

63x. A quantificação da fluorescência foi feita através do *software Image J (Image Processing and Analysis in Java*. NIH- Estados Unidos <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>). Para cada grupo de tratamento foram analisadas pelo menos 30 células. O núcleo celular foi analisado individualmente e a intensidade de fluorescência média foi determinada.

### 3.6 Teste de Citotoxicidade

As linhagens celulares A549 e DU145 foram mantidas em garrafas de cultivo celular (TPP, Suíça) até atingirem confluência de 80%. Em seguida, foram lavadas com solução salina balanceada de Hanks (HBS1X), tripsinizadas e plaqueadas em placa de 96 poços (TPP, Suíça) contendo cerca de 5000 células por poço em um volume final de 250 µl de meio DMEM-F12 suplementado. Os poços 7H a 12H foram mantidos sem células para serem utilizados como branco do experimento. As células foram mantidas em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 24 horas e no dia seguinte, todos os poços tiveram o meio de cultivo removido.

Nas linhas 1, 2, 3, 7 e 8 adicionou-se 125 µl de meio de cultivo suplementado. Nas linhas 4, 5 e 6 adicionou-se 125 µl meio de cultivo suplementado mais Ang-(1-7) 10<sup>-6</sup>M ou CGEN 856S 10<sup>-6</sup>M. Em seguida, 25 µl do inibidor Wortmaninn na concentração de 500 µM diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado na primeira coluna, exceto para os poços 1G e 1H, o qual foi adicionado apenas 25 µl de DMSO. Mais 100 µl de meio de cultivo com ou sem Ang-(1-7) 10<sup>-6</sup>M ou CGEN 856S 10<sup>-6</sup>M foram adicionados na primeira coluna, conforme descrito. Fez-se diluição seriada até a coluna 10, exceto para a última linha (7H a 12H). Para isso, 125 µl de cada coluna eram homogeneizados e repassados para a coluna seguinte, utilizando-se sempre novas ponteiros a cada diluição. Ao final, descartou-se 125 µl da coluna 10 e completaram-se todos os poços com mais 125 µl de meio de cultivo com ou sem Ang-(1-7) 10<sup>-6</sup>M ou GEN 856S 10<sup>-6</sup>M para um volume final de 250 µl (Figura 2). Repetiu-se o mesmo protocolo para o tratamento das células A549 e DU145 usando o inibidor de PI3K LY294002. As linhagens celulares foram incubadas por mais 48 horas a 37°C e então o meio foi trocado por outro em um volume final de 100 µl contendo resazurina 0,01% em PBS 1X na proporção de 1:10 de resazurina para meio de cultivo. Aguardou-se 4 horas com as células em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C. A placa foi, então, lida por espectrofotômetro com filtro duplo de 570 nm de excitação e 600 nm de emissão. Os dados foram analisados usando os *softwares MS Excel e GraphPrism*. A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada usando como controle o grupo de células que não recebeu tratamento algum ou que foi tratado apenas com um dos peptídeos.



**Figura 2:** Modelo da placa de 96 poços utilizada em teste de citotoxicidade celular.

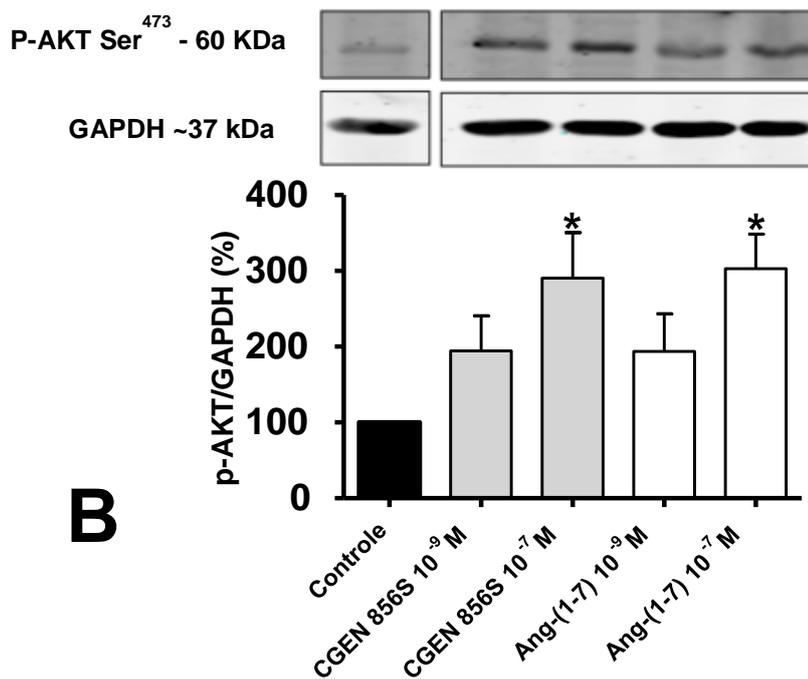
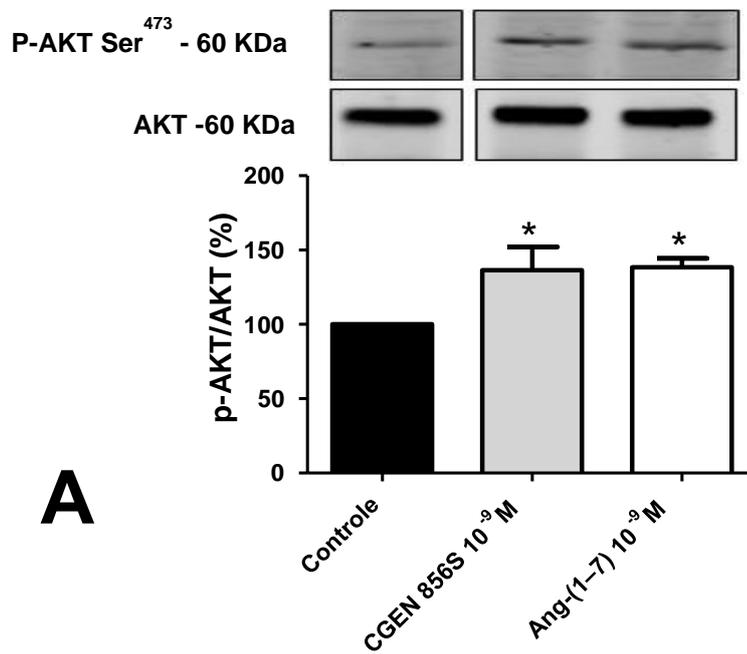
### 3.7 Análise Estatística

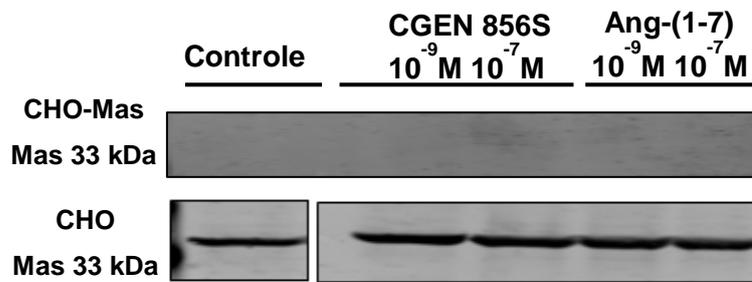
Os dados serão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ou pela mediana com mínimo e máximo de cada grupo. Para análise comparativa entre os grupos utilizou-se o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls ou *Two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. O critério para significância estatística foi  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

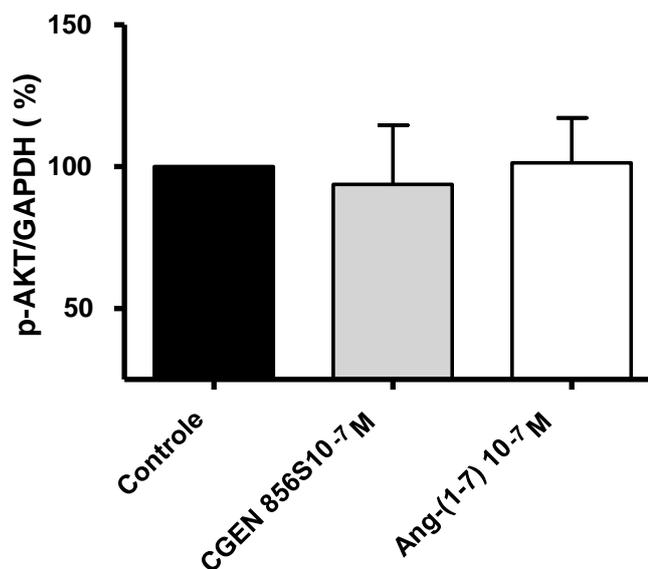
### 4.1 O CGEN 856S ativa a AKT em células CHO-Mas

Para avaliar o efeito agudo do CGEN 856S e da Ang-(1-7) sobre a ativação da AKT em células CHO-Mas, estas foram estimuladas com ambos os peptídeos em diferentes tempos (5 e 10 minutos de incubação) e concentrações ( $1 \times 10^{-9} \text{M}$  e  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Células CHO não transfectadas foram utilizadas como controle e submetidas ao mesmo protocolo experimental.





**C**

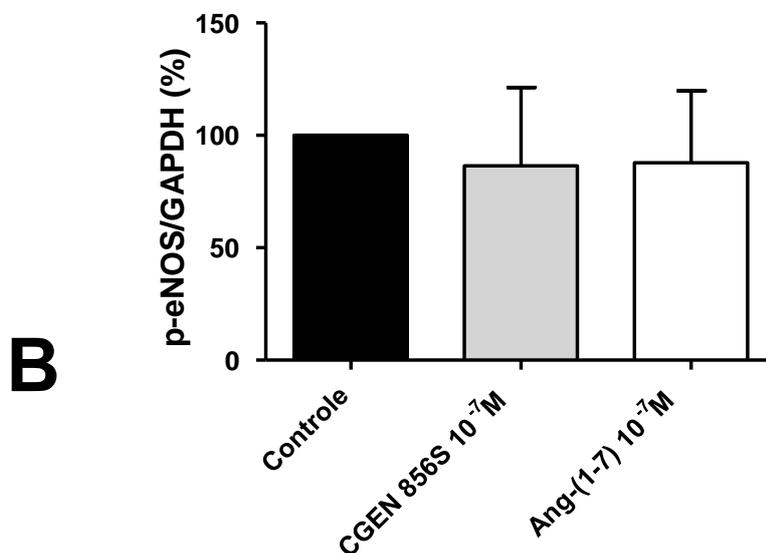
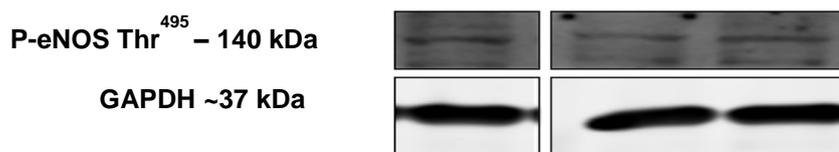
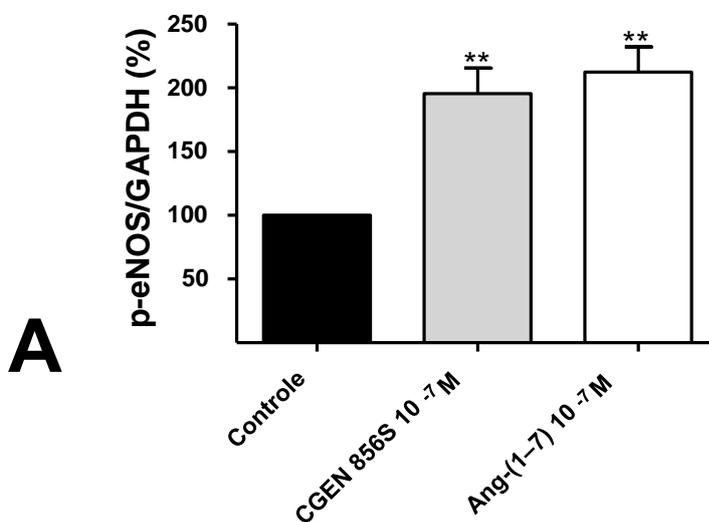
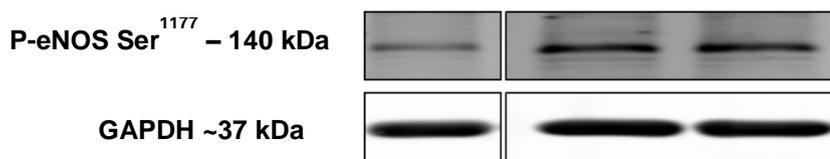


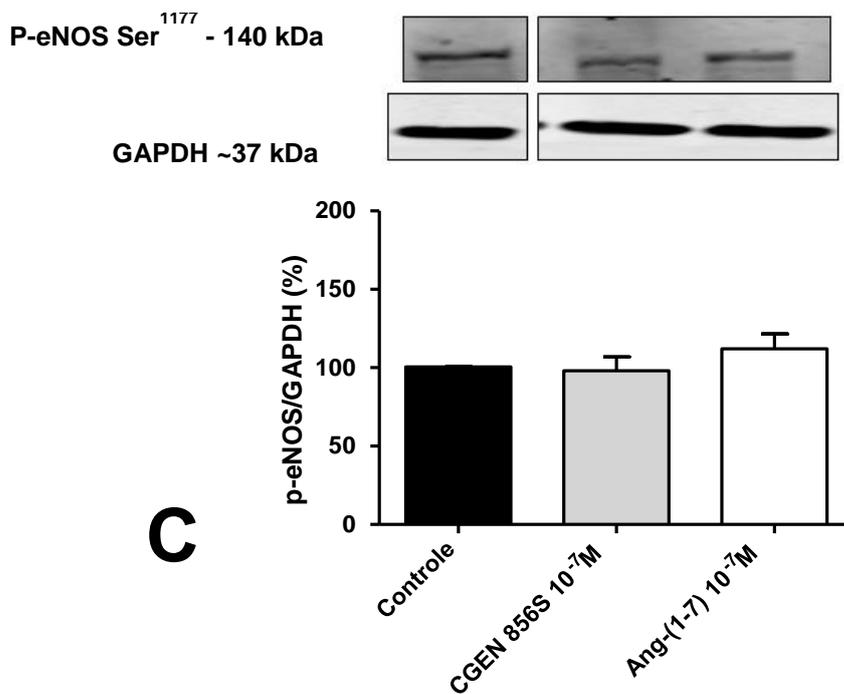
**D**

**Figura 3: Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) nos níveis de fosforilação da AKT.** (A) Efeito da exposição ao CGEN 856S e Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  mol/L) durante 5 minutos na fosforilação da AKT em células CHO-Mas. (B) Efeito da exposição ao CGEN 856S e Ang-(1-7) (ambos a  $10^{-9}$  mol/L e  $10^{-7}$  mol/L) durante 10 minutos sobre os níveis de p-AKT em células CHO-Mas. (C) Imagem representativa demonstrando a presença do receptor Mas em células CHO transfectadas (CHO-Mas) e ausência em células CHO não transfectadas. (D) Ausência de efeito da exposição ao CGEN 856S e Ang-(1-7) ( $10^{-7}$  mol/L) durante 10 minutos em células CHO não transfectadas. GAPDH e AKT total foram usados como controle endógeno. \* $P < 0.05$  vs. controle. Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 experimentos

## 4.2 O CGEN 856S ativa a eNOS em células CHO-Mas

Para avaliar o efeito agudo do CGEN 856S e da Ang-(1-7) sobre a ativação da eNOS em células CHO-Mas, estas foram estimuladas com ambos os peptídeos durante 10 minutos na concentração de  $10^{-7}$ M. Células CHO não transfectadas foram utilizadas como controle e submetidas ao mesmo protocolo experimental.



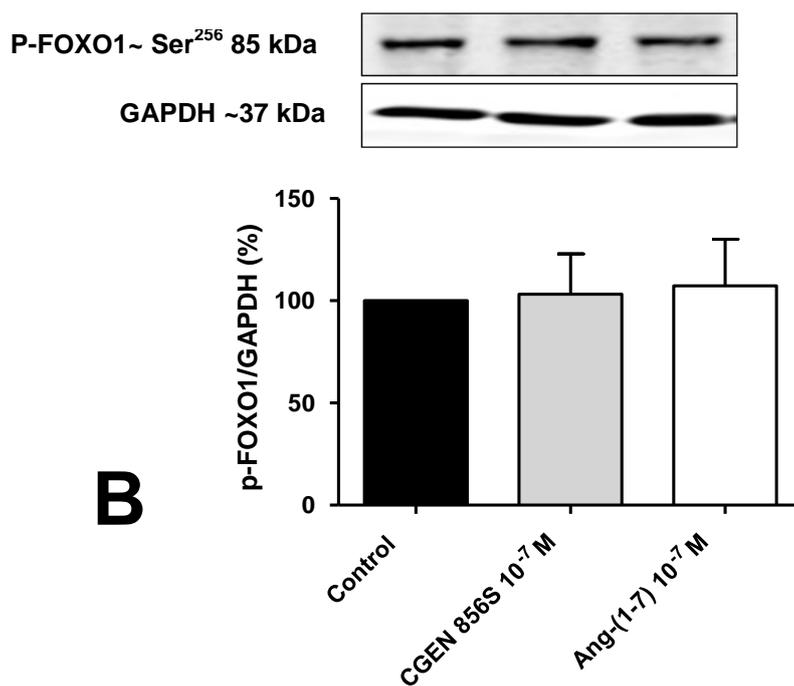
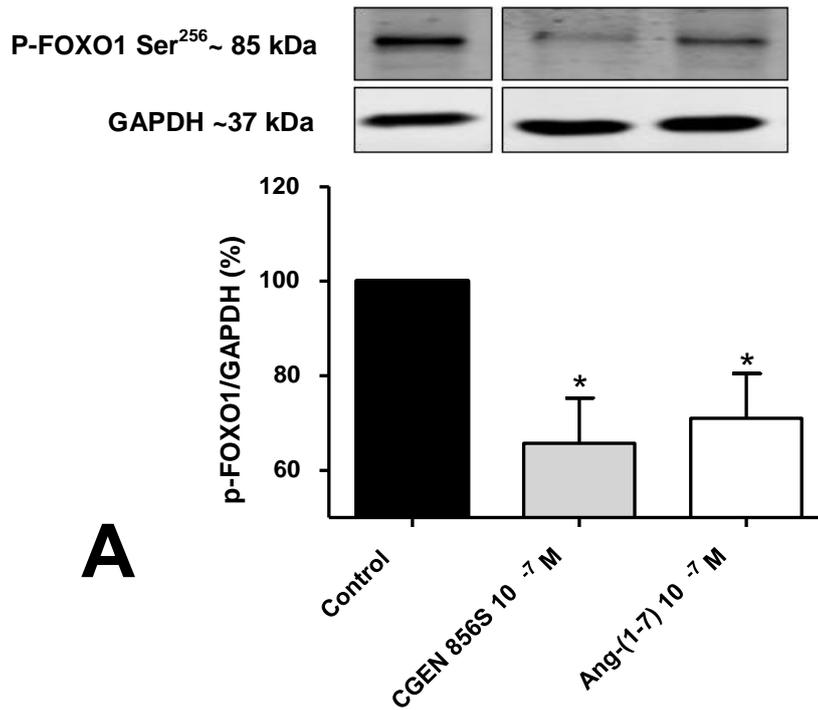


**Figura 4: Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) nos níveis de fosforilação da eNOS.**

A administração de ambos os peptídeos ( $10^{-7}$  mol/L) por 10 minutos aumentou os níveis de p-eNOS Ser1177 (A), mas não de p-eNOS Thr495 (B) em células CHO-Mas. (C) Ausência de efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) em células CHO não transfectadas. O GAPDH foi usado como controle endógeno. \*\*  $p < 0.01$  vs. controle. Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 experimentos.

### 4.3 O CGEN 856S e a Ang-(1-7) ativam FOXO1 em células CHO-Mas

Para avaliar o efeito agudo do CGEN 856S e da Ang-(1-7) sobre a ativação de FOXO1 em células CHO-Mas, estas foram estimuladas com ambos os peptídeos durante 10 minutos na concentração de  $10^{-7}$ M. Células CHO não transfectadas foram utilizadas como controle e submetidas ao mesmo protocolo experimental.

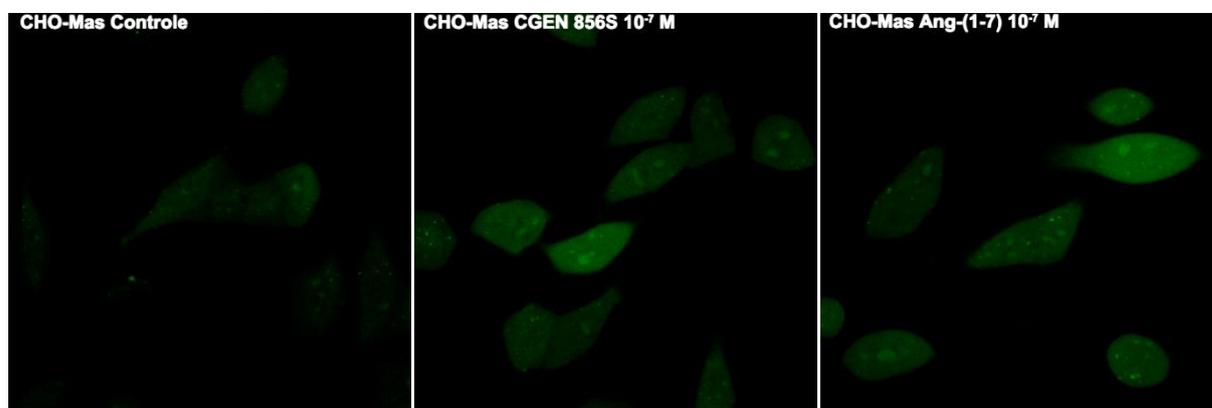


**Figura 5: Efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) nos níveis de fosforilação de FOXO1.** (A) A administração de ambos os peptídeos a  $10^{-7}$ mol/L durante 10 minutos diminuíram os níveis de p-FOXO1 Ser256 em células CHO-Mas (B) Ausência de efeito da exposição ao CGEN 856S e a Ang-(1-7) em células CHO não transfectadas. O GAPDH foi usado como controle endógeno. \*  $p < 0.05$  vs. controle. Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 experimentos.

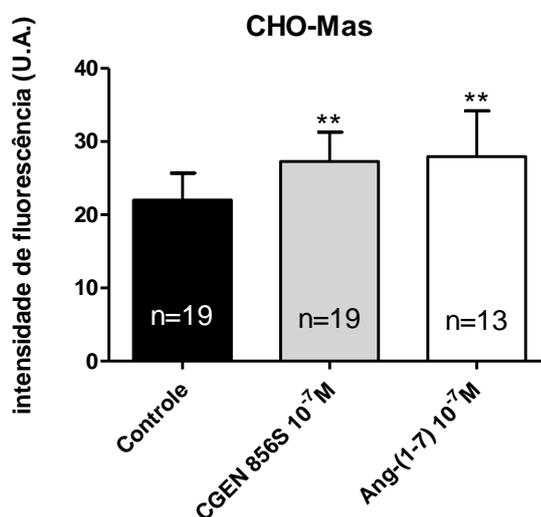
#### 4.4 O CGEN 856S promove liberação de óxido nítrico em células CHO-Mas

As análises qualitativa e quantitativa da liberação de NO foram feitas pelo método de 4-amino-5-metil amino-2'-7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM). Tanto o CGEN 856S quanto a Ang-(1-7) (este último utilizado como controle positivo) foram capazes de promover a liberação de NO em células CHO estavelmente transfectadas com o receptor Mas, quando comparado com o grupo controle (Figura 6). Não foram observadas diferenças na liberação de NO em células CHO não transfectadas quando comparado àquelas estimuladas com CGEN 856S ou Ang-(1-7) com o grupo controle (Figura 7).

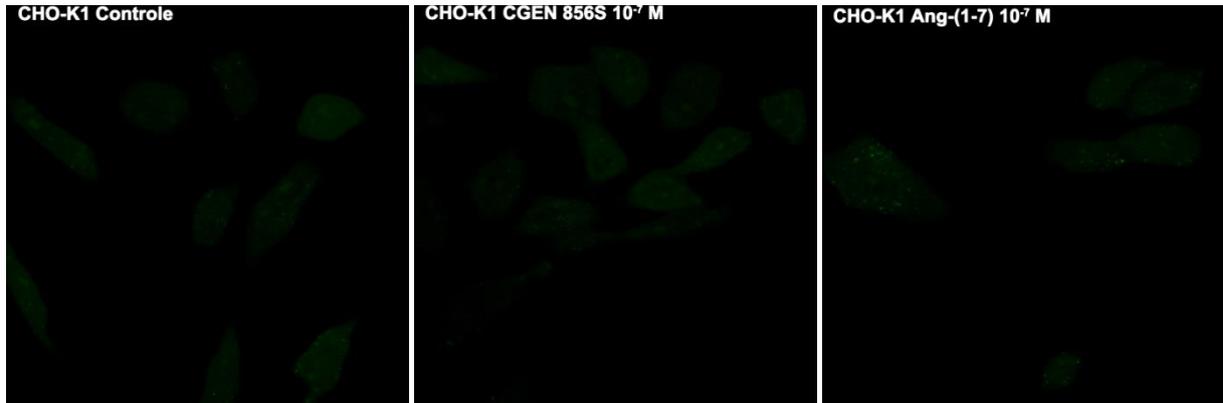
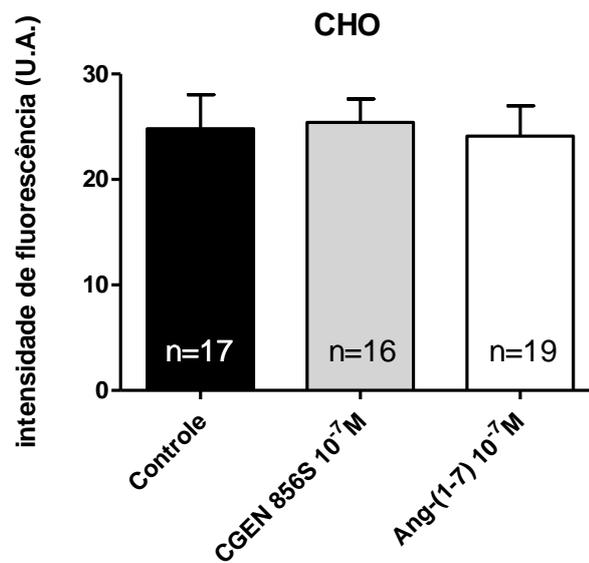
**A**



**B**



**Figura 6: Efeito da exposição ao CGEN 856S e Ang-(1-7) na liberação de NO em células CHO-Mas** A) Microscopia confocal representativa da liberação de NO (em verde) induzida pelo tratamento com os peptídeos CGEN 856S e Ang-(1-7) durante 10 minutos na concentração de 10<sup>-7</sup> M em células CHO-Mas. Aumento: 63x B) Quantificação da liberação de NO dos experimentos representados em A. \*\* P<0.05 vs. controle. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média.

**A****B**

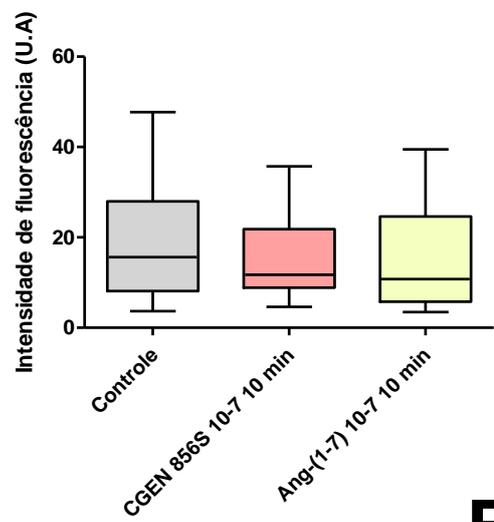
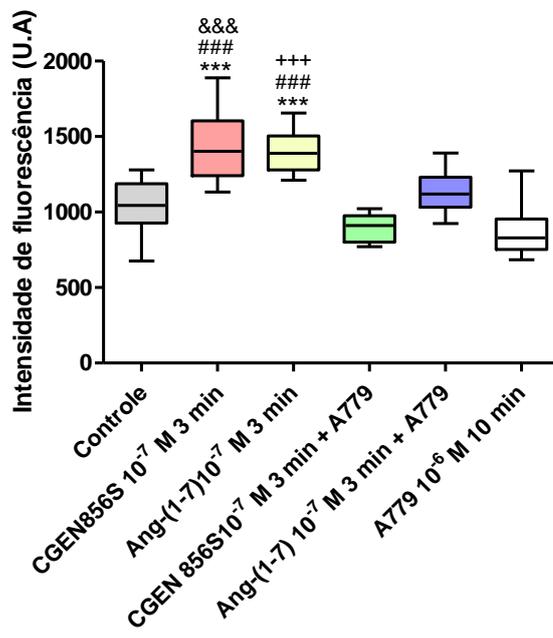
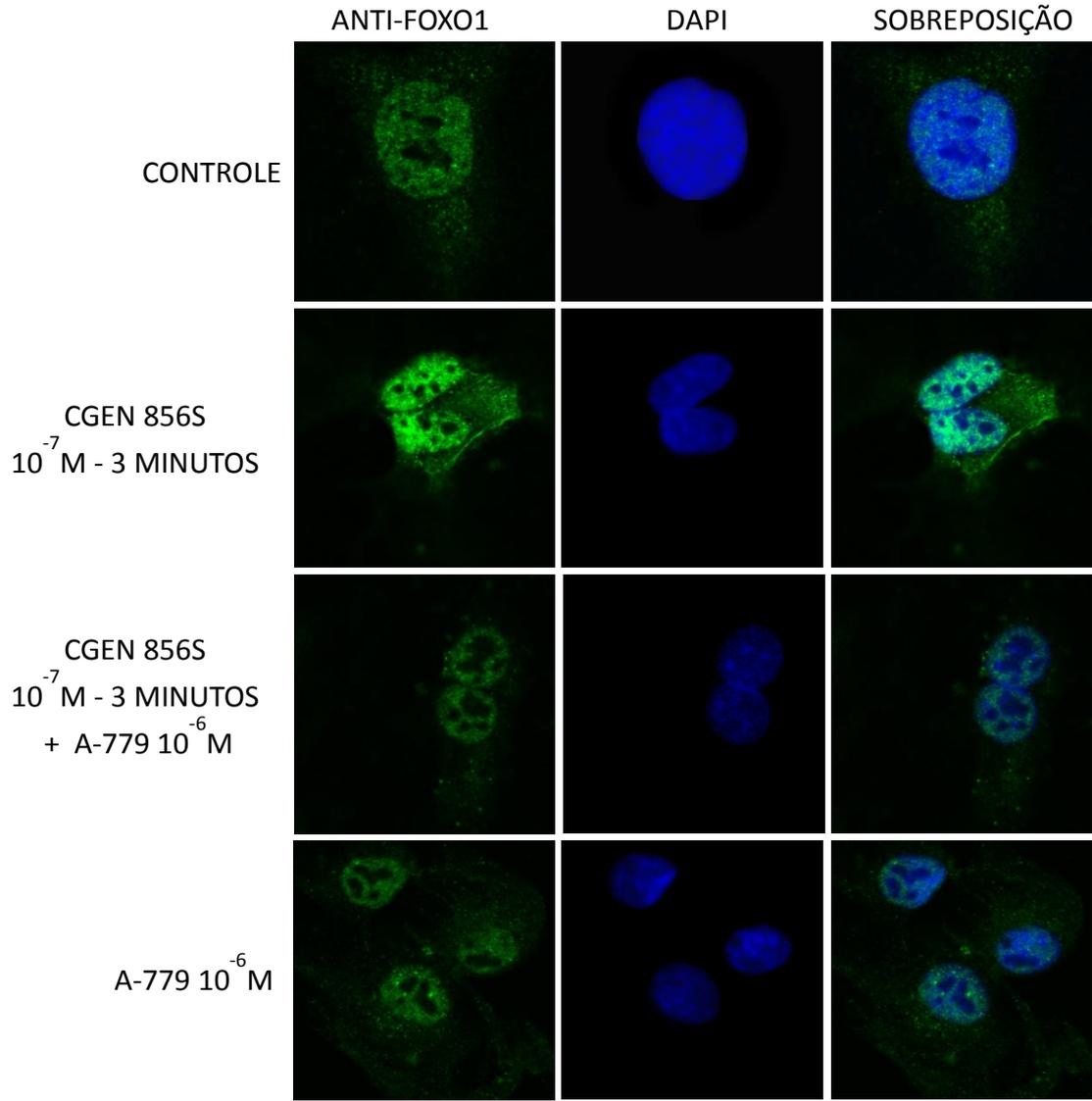
**Figura 7: Efeito da exposição ao CGEN 856S e Ang-(1-7) na liberação de NO em células CHO.**

A) Microscopia confocal representativa da liberação de NO induzida pelo tratamento com os peptídeos CGEN 856S e Ang-(1-7) durante 10 minutos na concentração de  $10^{-7}$  M em células CHO não transfectadas. B) Quantificação da liberação de NO dos experimentos representados em A. Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média.

#### **4.5 O CGEN 856S e a Ang-(1-7) translocam FOXO1 para o núcleo de células HAEC, A549 e DU145**

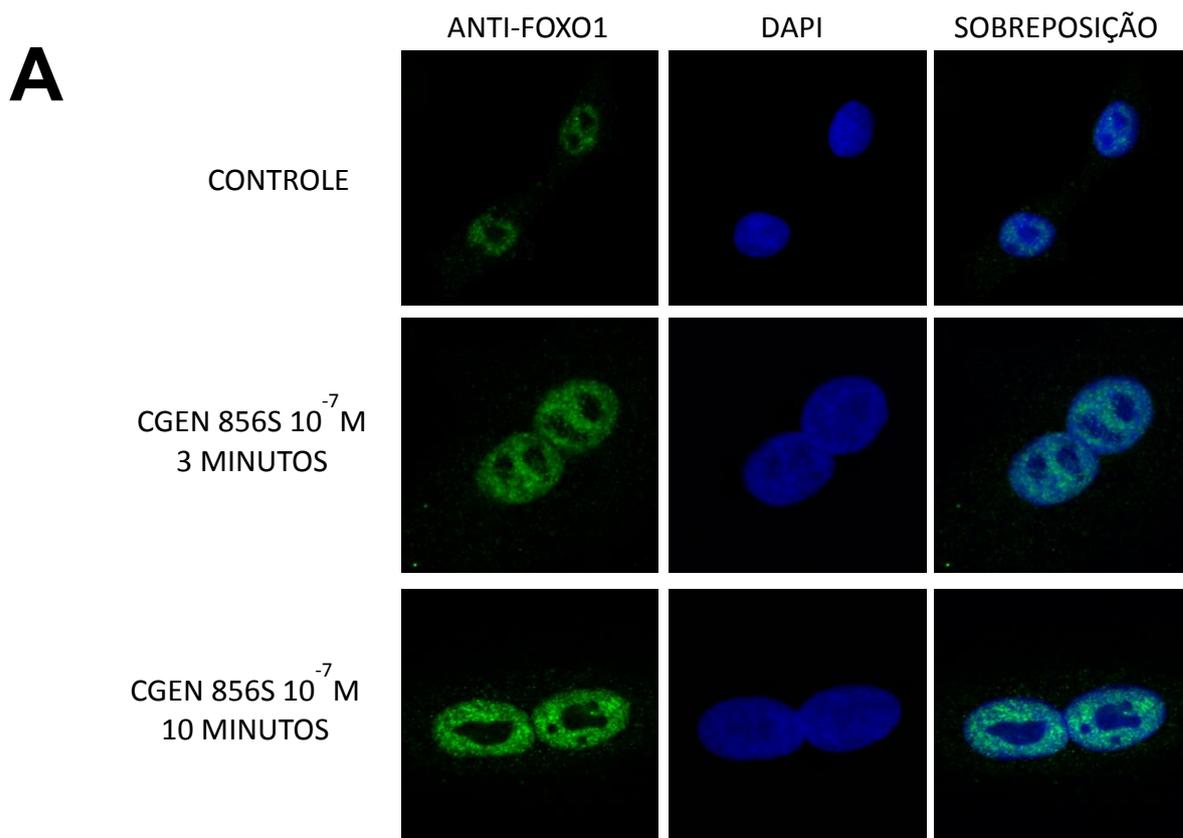
Estudos de fosfoproteômica mostraram uma desfosforilação de FOXO1 em células HAEC tratadas com Ang-(1-7)  $10^{-7}$ M por 3 minutos. Para avaliar se ocorre translocação de FOXO1 após esse tratamento, se os efeitos promovidos pela Ang-(1-7) podem ser reproduzidos com o uso do CGEN 856S, bem como verificar se o efeito anticarcinogênico da Ang-(1-7) pode ser explicado, ao menos em parte, pela ativação de FOXO1, foi realizado a imunolocalização de FOXO1 em células HAEC, bem como nas linhagens tumorais A549 e DU145 tratadas com os peptídeos CGEN 856S e Ang-(1-7), ambos na concentração de  $10^{-7}$ M durante os tempos de 3 e 10 minutos. Além disso, para confirmar a participação do receptor Mas na ativação de FOXO1, os mesmos experimentos descritos acima foram feitos com a pré-incubação com A-779 a  $10^{-6}$ M durante 10 minutos.

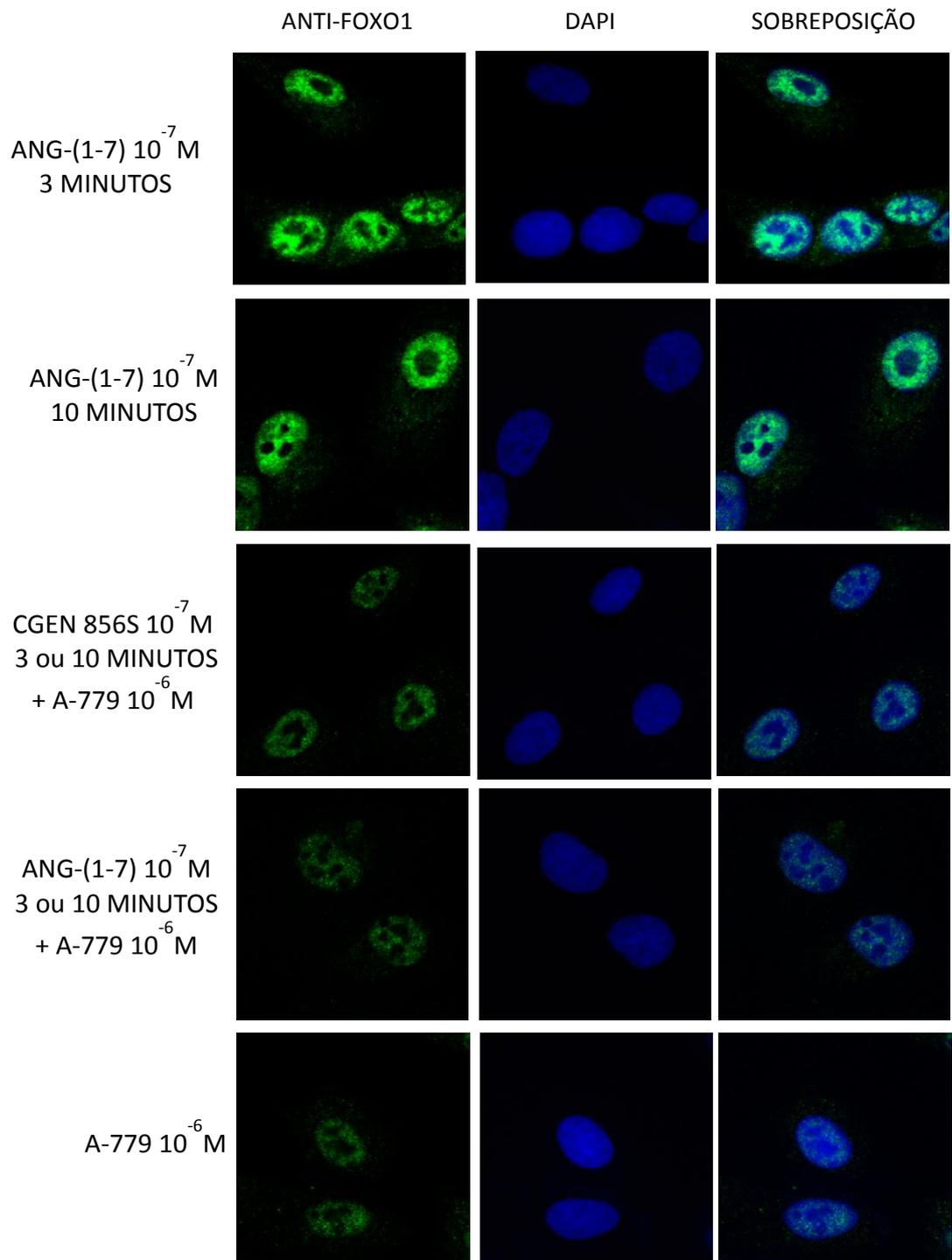
Na figura 8A observa-se a imunolocalização de FOXO1 em células HAEC. O grupo controle apresentou uma menor quantidade de FOXO1 encontrada no núcleo, quando comparado com os grupos tratados com CGEN 856S ou Ang-(1-7) ambos a  $10^{-7}$ M no tempo de 3 minutos. Nota-se que o A-779 foi capaz de bloquear de forma eficiente os efeitos do CGEN 856S e da Ang-(1-7). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado apenas com A-779 a  $10^{-6}$ M por 10 minutos. No tempo de 10 minutos não houve diferença na translocação nuclear de FOXO1 em células HAEC, comparando-se com o grupo controle. A marcação com anticorpo anti-FOXO1 detectados com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 é representado em verde. A marcação do núcleo com DAPI é representado em azul. O terceiro painel de cada figura representa a sobreposição dos dois painéis anteriores. A quantificação da intensidade de fluorescência nuclear de cada grupo, em unidades arbitrárias (U.A.) pode ser observada na figura 8B.

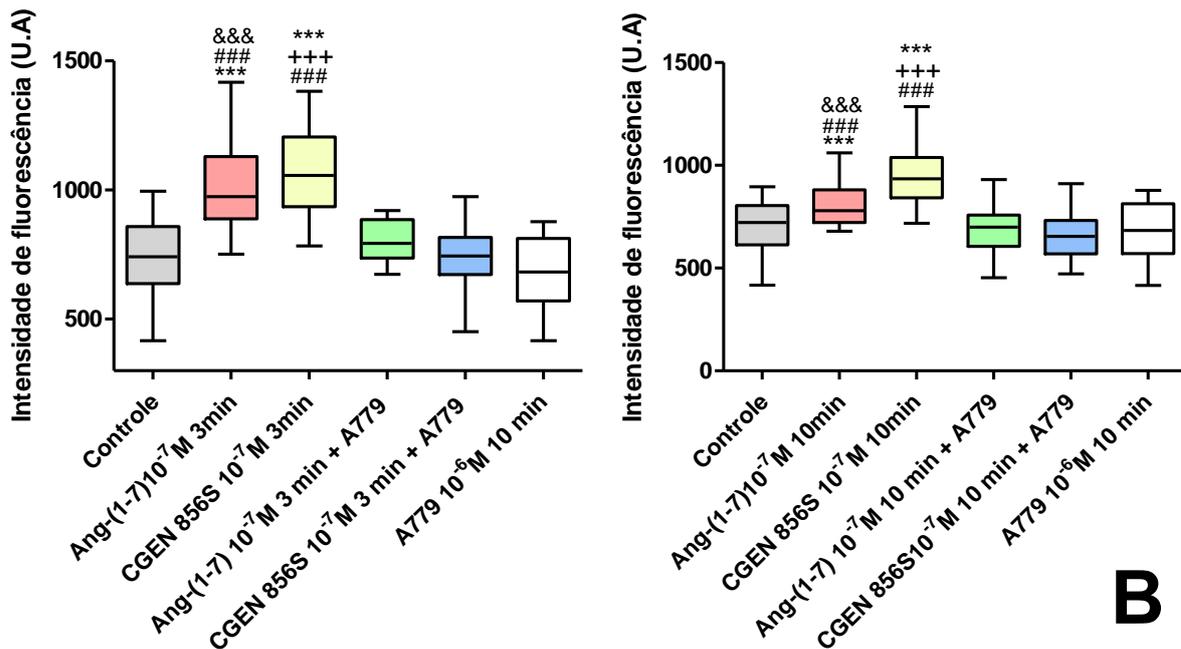
**A****B**

**FIGURA 8: Imunolocalização de FOXO1 em células HAEC.** (A) Ensaio de imunolocalização para verificação da translocação de FOXO1 em células endoteliais de aorta humana (HAEC). Utilizou-se células não tratadas como controle ou tratadas com CGEN 856S  $10^{-7}$  M e Ang-(1-7)  $10^{-7}$  M por 3 min na presença e ausência de A-779  $10^{-6}$  M ou ainda por 10 min. Aumento: 63x. O núcleo foi corado com DAPI (em azul). Anticorpo anti-FOXO1 detectado com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (em verde). (B) Quantificação da fluorescência nuclear de células HAEC em unidades arbitrárias com representação da mediana. As barras representam o mínimo e o máximo. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs Controle; ### $p \leq 0,001$  vs. A-779  $10^{-6}$ M, &&&  $p \leq 0,001$  vs CGEN 856S  $10^{-7}$ M + A-779  $10^{-6}$ M e +++  $p \leq 0,001$  vs Ang-(1-7)  $10^{-7}$ M + A-779  $10^{-6}$ M

A figura 9A representa a imunolocalização de FOXO1 em células A549. O grupo controle apresentou uma menor quantidade de FOXO1 encontrada no núcleo, quando comparado com os grupos tratados com CGEN 856S e Ang-(1-7), ambos na concentração de  $10^{-7}$ M nos tempos de 3 e 10 minutos. Observa-se ainda que o A-779 foi capaz de bloquear de forma eficiente os efeitos do CGEN 856S e Ang-(1-7), quando tratados nos tempos de 3 e 10 minutos. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado apenas com A-779 a  $10^{-6}$ M por 10 minutos. A marcação com anticorpo anti-FOXO1 detectados com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 é representado em verde. A marcação do núcleo com DAPI é representado em azul. O terceiro painel de cada figura representa a sobreposição dos dois painéis anteriores. A quantificação da intensidade de fluorescência nuclear de cada grupo, em unidades arbitrárias (U.A) pode ser observada na figura 9B.

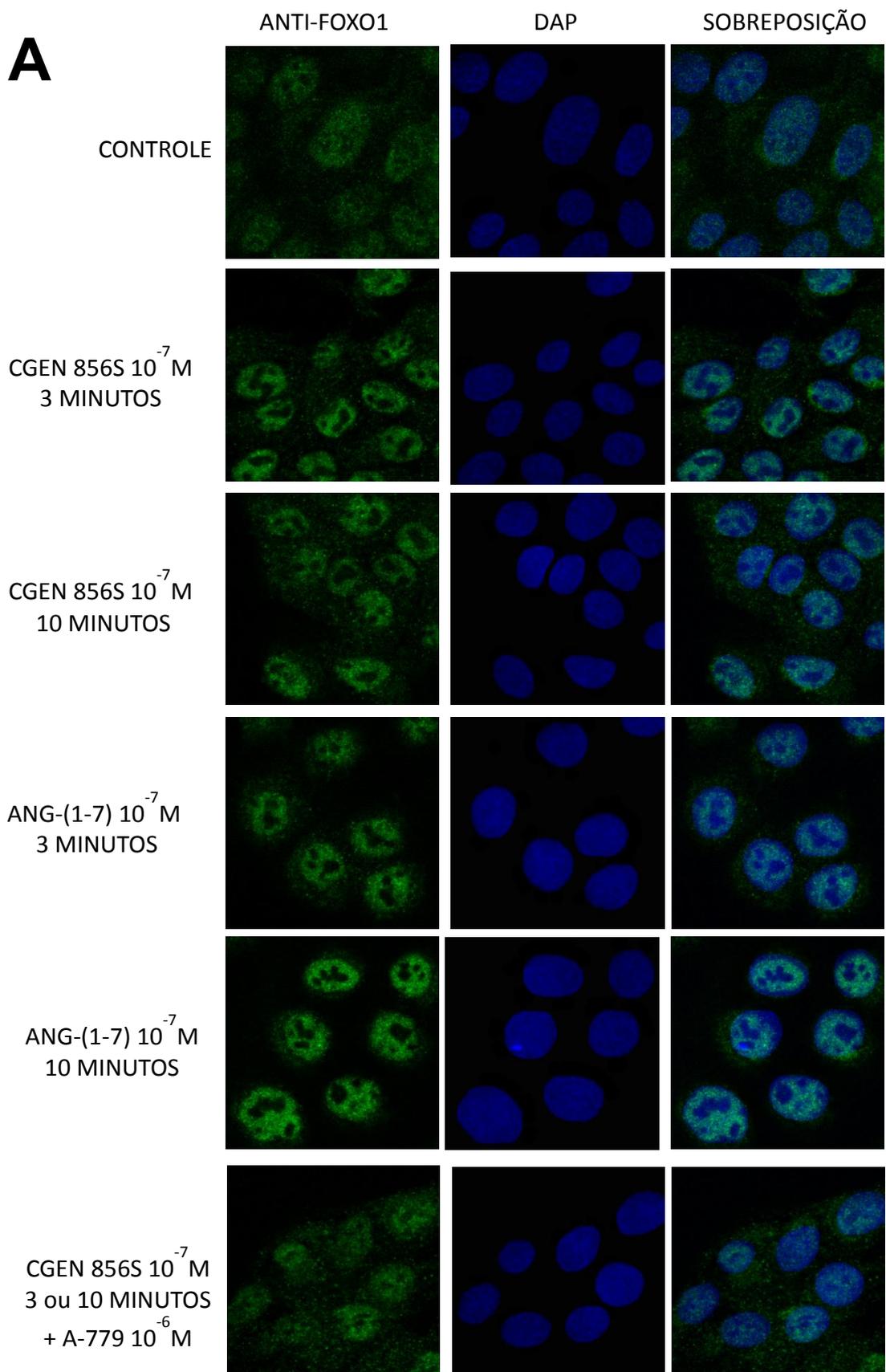


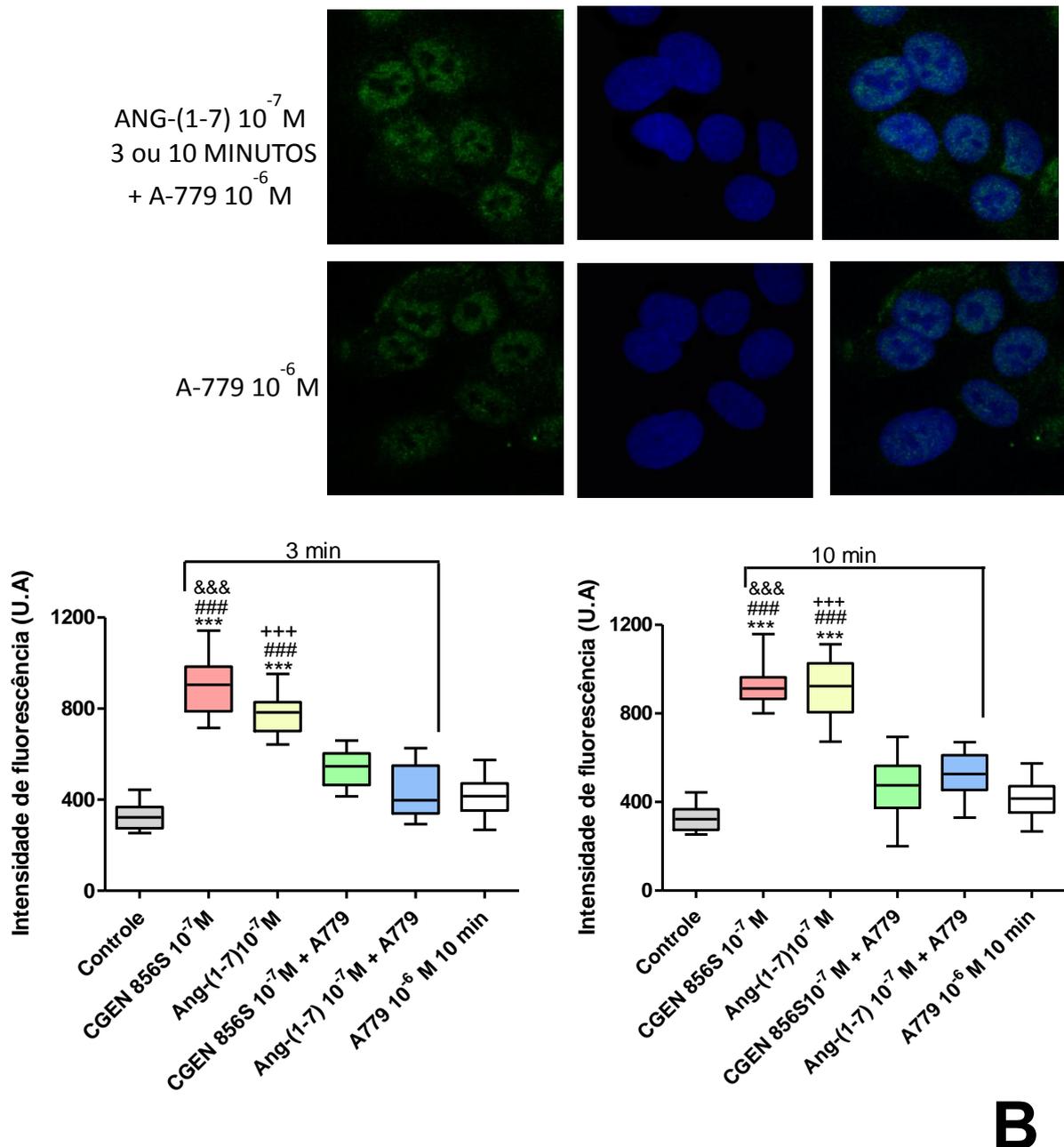




**FIGURA 9: Imunolocalização de FOXO1 em células A549.** (A) Ensaio de imunolocalização para verificação da translocação de FOXO1 em células de tumor de pulmão humano (A549). Utilizou-se células não tratadas como controle ou tratadas com CGEN 856S  $10^{-7}$  M e Ang-(1-7)  $10^{-7}$  M por 3 e 10 minutos na presença e ausência de A-779  $10^{-6}$  M. Aumento: 63x. O núcleo foi corado com DAPI (em azul). Anticorpo anti-FOXO1 detectado com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (em verde). (B) Quantificação da fluorescência nuclear de células A549 em unidades arbitrárias com representação da mediana. As barras representam o mínimo e o máximo. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs Controle; ### $p \leq 0,001$  vs. A-779  $10^{-6}$ M, +++  $p \leq 0,001$  vs CGEN 856S  $10^{-7}$ M 3 ou 10 min + A-779  $10^{-6}$ M e &&&  $p \leq 0,001$  vs Ang-(1-7)  $10^{-7}$ M 3 ou 10 min + A-779  $10^{-6}$ M

Na figura 10A observa-se a imunolocalização de FOXO1 em células DU145. O grupo controle apresentou uma menor quantidade de FOXO1 encontrada no núcleo, quando comparado com os grupos tratados com CGEN 856S e Ang-(1-7), ambos na concentração de  $10^{-7}$ M nos tempos de 3 e 10. Observa-se também que o A-779 foi capaz de bloquear de forma eficiente os efeitos do CGEN 856S e Ang-(1-7), quando tratados nos tempos de 3 e 10 minutos. A marcação com anticorpo anti-FOXO1 detectados com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 é representado em verde. A marcação do núcleo com DAPI encontra-se em azul. O terceiro painel de cada figura representa a sobreposição dos dois painéis anteriores. A quantificação da intensidade de fluorescência nuclear de cada grupo, em unidades arbitrárias (U.A) pode ser observada na figura 10B.



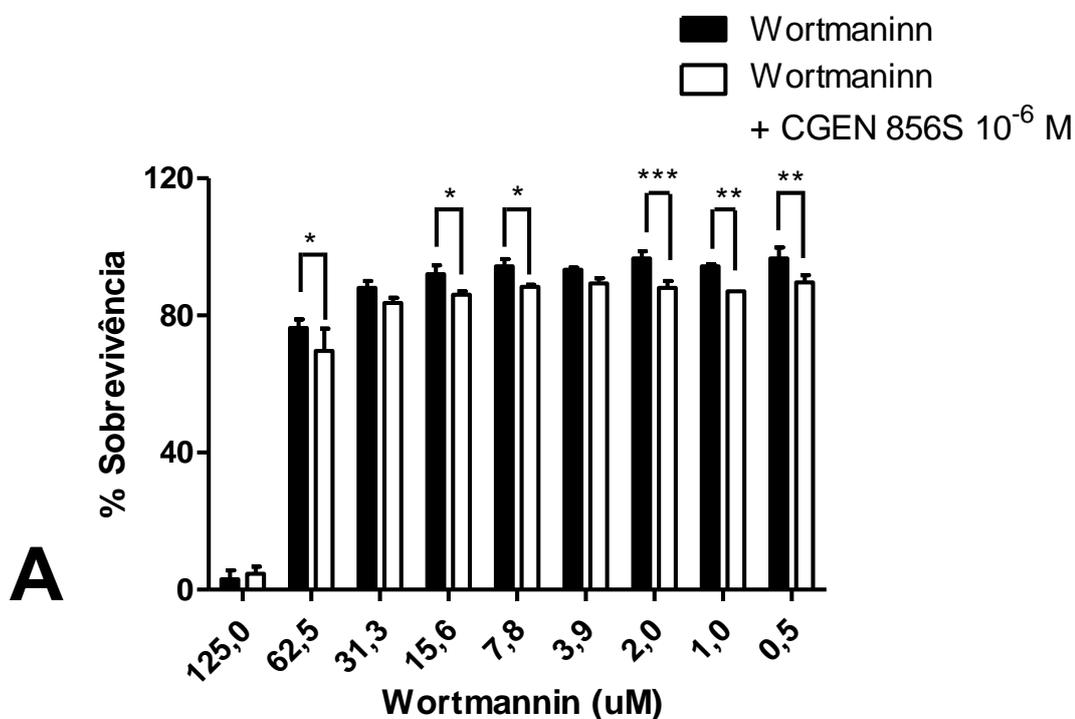


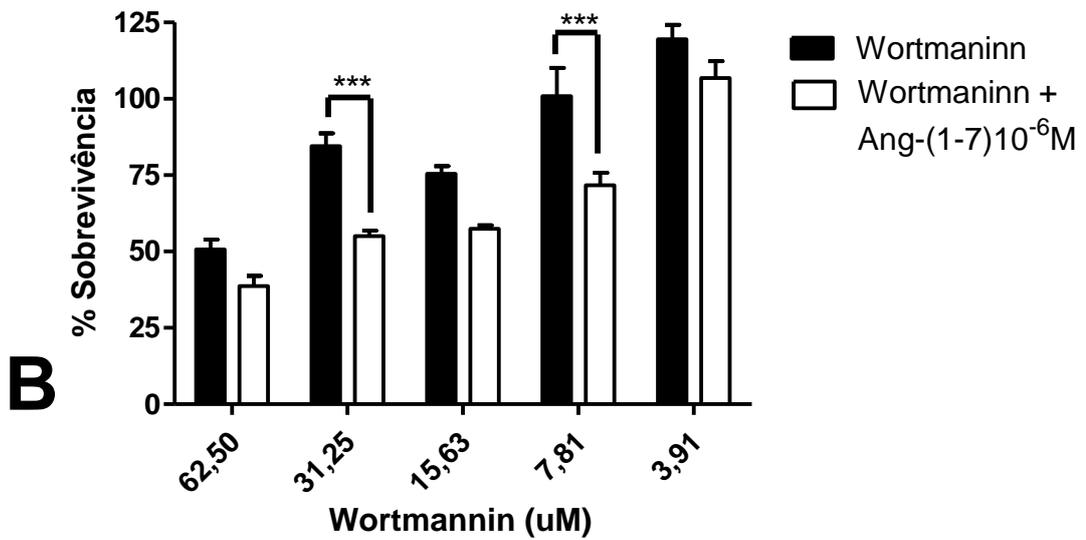
**FIGURA 10: Imunolocalização de FOXO1 em células DU145** (A) Ensaio de imunolocalização para verificação da translocação de FOXO1 em células de tumor de próstata humana (DU145). Utilizou-se células não tratadas como controle ou tratadas com CGEN 856S  $10^{-7}$  M e Ang-(1-7)  $10^{-7}$  M por 3 e 10 minutos na presença e ausência de A-779  $10^{-6}$  M. Aumento: 63x. O núcleo foi corado com DAPI (em azul). Anticorpo anti-FOXO1 detectado com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (em verde). (B) Quantificação da média de fluorescência nuclear de células DU145 em unidades arbitrárias com representação da mediana. As barras representam o mínimo e o máximo. \*\*\* $p \leq 0,001$  vs Controle; ### $p \leq 0,001$  vs. A-779  $10^{-6}$ M e &&&  $p \leq 0,001$  vs CGEN 856S  $10^{-7}$ M 3 ou 10 min + A-779  $10^{-6}$ M e +++  $p \leq 0,001$  vs Ang-(1-7)  $10^{-7}$ M 3 ou 10 min + A-779  $10^{-6}$ M

#### 4.6 O CGEN 856S e a Ang-(1-7) potencializam o efeito dos inibidores da PI3K

Estudos anteriores mostraram a participação da via PI3/AKT na modulação da atividade de FOXO1. Sabe-se, também, que a Ang-(1-7) é capaz de fosforilar a AKT, ativando-a, conforme estudos de Sampaio et al., 2007. No entanto, estudos recentes mostraram que a Ang-(1-7) é também capaz de ativar FOXO1 através de sua desfosforilação (Verano-Braga et al., 2012). Tendo em vista esses resultados, este trabalho teve como um dos objetivos avaliar o efeito da combinação do tratamento com inibidores de PI3K mais CGEN 856S ou Ang-(1-7) no crescimento de células tumorais A549 e DU145.

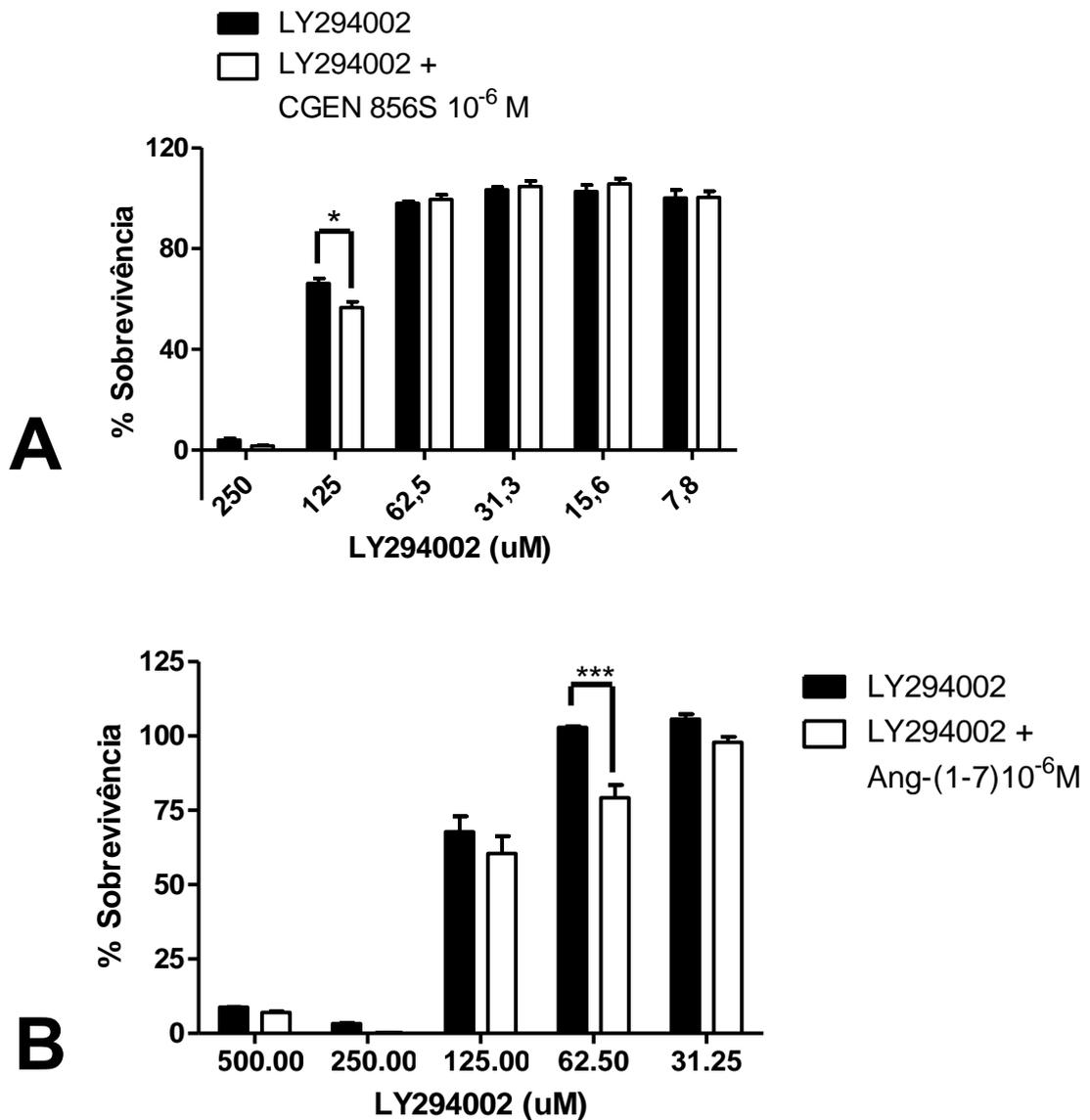
Na linhagem celular A549, conforme observado na figura 11A, o CGEN foi capaz de potencializar o efeito citotóxico do inibidor de PI3K wortmaninn quando combinados. As diferenças foram significativas com o CGEN 856S mantido fixo na concentração de  $10^{-6}$ M e o wortmaninn nas concentrações de 62,5  $\mu$ M, 15,6  $\mu$ M, 7,8  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, e 0,5  $\mu$ M. Já na figura 11B, nota-se uma diferença significativa na sobrevivência de células A549 tratadas com a combinação de Wortmaninn a 31,25  $\mu$ M e 7,8  $\mu$ M mais Ang-(1-7) mantida a  $10^{-6}$ M quando comparadas com aquelas tratadas apenas com Wortmaninn a 31,25  $\mu$ M e 7,8  $\mu$ M.





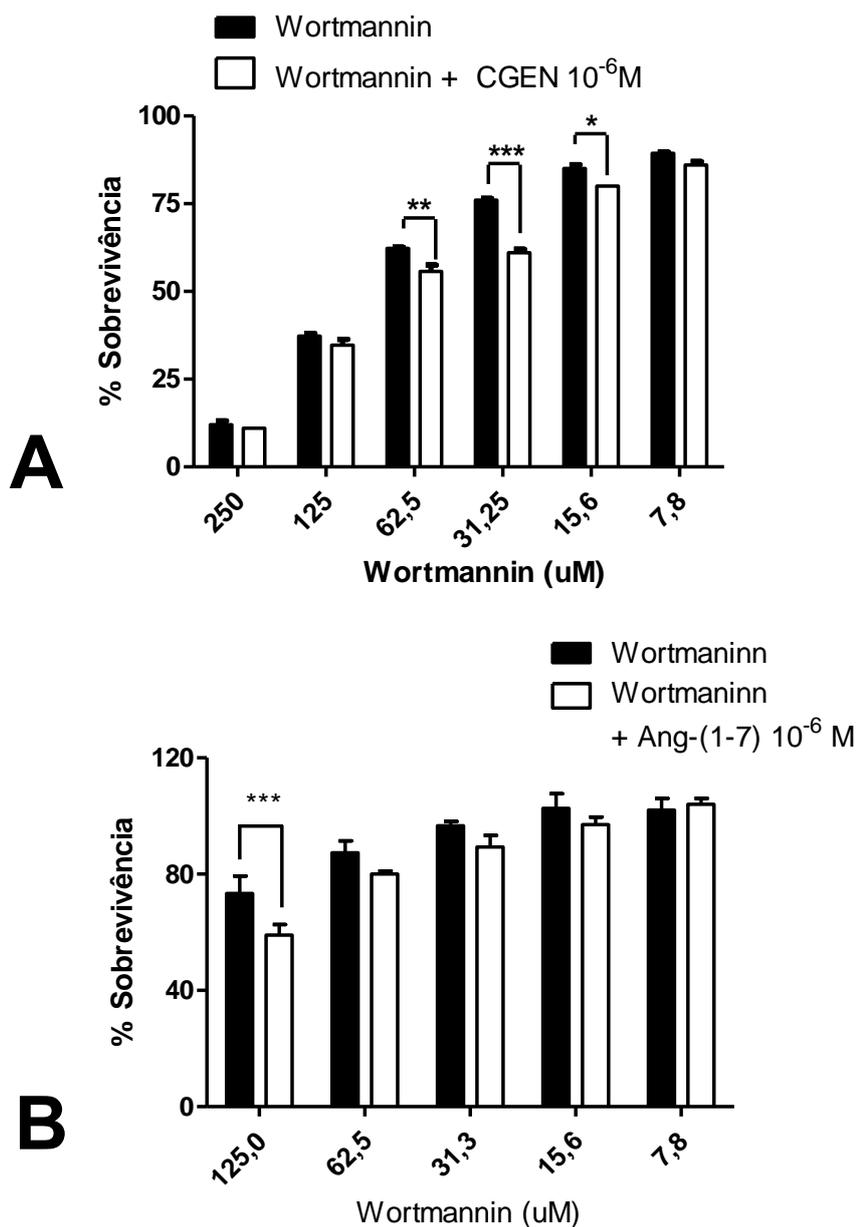
**Figura 11: Ensaio de citotoxicidade em células A549.** (A) Quantificação da taxa de sobrevivência de células A549 tratadas com wortmannin na ausência (em preto) / presença (em branco) de CGEN 856S 10<sup>-6</sup>M. (B) Quantificação da taxa de sobrevivência de células A549 tratadas com wortmannin na ausência (em preto) / presença (em branco) de Ang-(1-7)10<sup>-6</sup>M. Média expressa em porcentagem. \*p<0.05; \*\*p<0,01; \*\*\* p < 0.001

No caso do inibidor de PI3K LY294002, ainda para a linhagem celular A549, conforme observado na figura 12A, o CGEN 856S foi capaz de potencializar o efeito citotóxico do LY294002 na concentração de 125  $\mu$ M quando ambos foram combinados. Já a Ang-(1-7) fixada em  $10^{-6}$ M, como observado na figura 12B, mostrou-se capaz de potencializar o efeito citotóxico do LY294002 na concentração de 62,5  $\mu$ M quando ambos foram combinados.



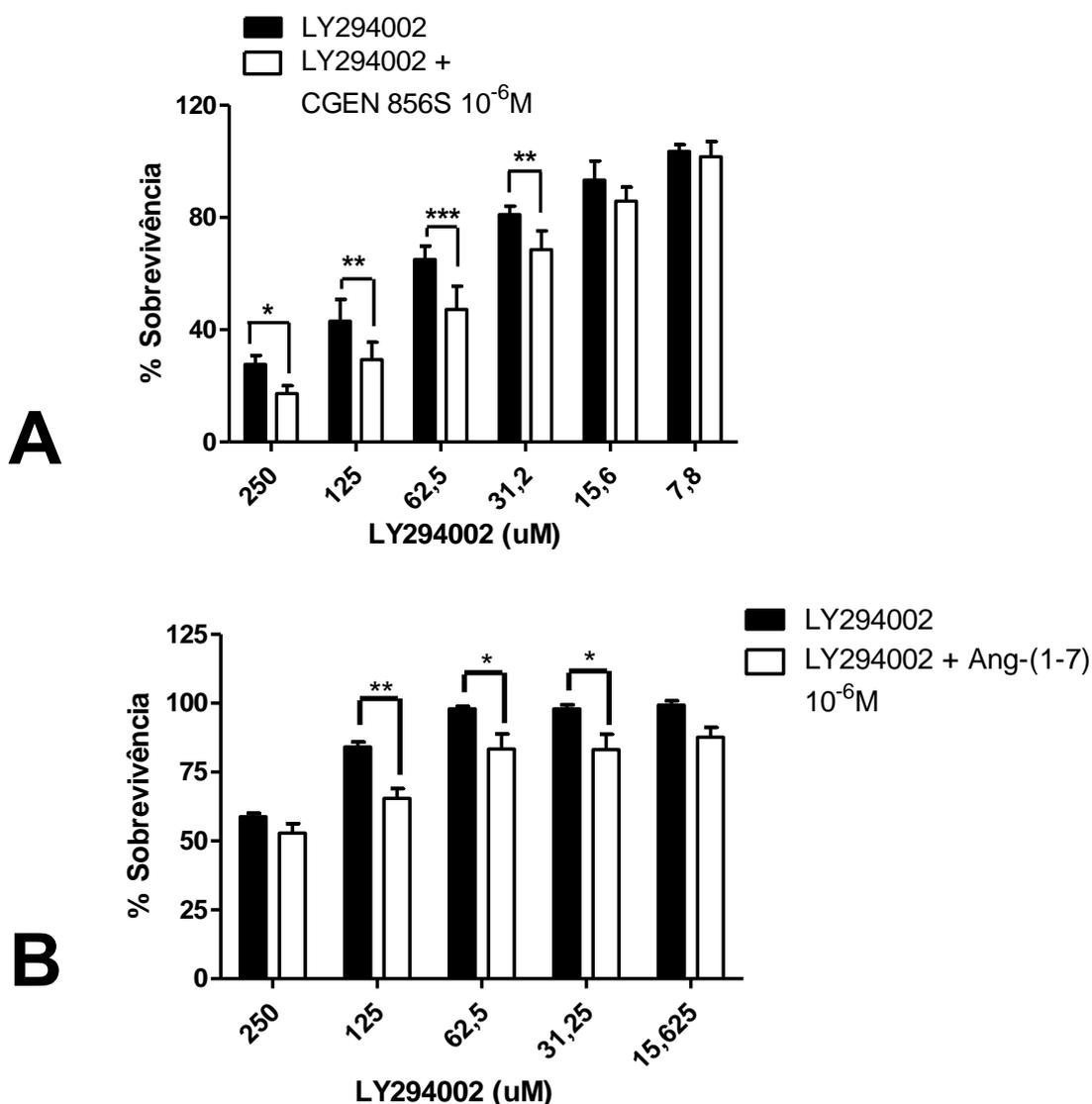
**Figura 12: Ensaio de citotoxicidade em células A549.** (A) Quantificação da taxa de sobrevivência de células A549 tratadas com LY294002 na ausência (em preto) / presença (em branco) de CGEN 856S  $10^{-6}$ M. (B) Quantificação da taxa de sobrevivência de células A549 tratadas com LY294002 na ausência (em preto) / presença (em branco) de Ang-(1-7) $10^{-6}$ M. Média expressa em porcentagem. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Em células DU145, observa-se na figura 13A que CGEN 856S fixado na concentração de  $10^{-6}$ M foi capaz de potencializar o efeito citotóxico do wortmannin quando este foi utilizado nas concentrações de 62,5  $\mu$ M, 31,25  $\mu$ M e 15,625  $\mu$ M. Já na figura 13B, nota-se uma diferença significativa na sobrevivência de células DU145 tratadas com a Ang-(1-7) fixada em  $10^{-6}$ M mais wortmannin na concentrações de 125  $\mu$ M.



**Figura 13: Ensaio de citotoxicidade em células DU145.** (A) Quantificação da taxa de sobrevivência de células DU145 tratadas com wortmannin na ausência (em preto) / presença (em branco) de CGEN 856S  $10^{-6}$ M. (B) Quantificação da taxa de sobrevivência de células DU145 tratadas com wortmannin na ausência (em preto) / presença (em branco) de Ang-(1-7) $10^{-6}$ M. Média expressa em porcentagem. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Na figura 14A nota-se que o CGEN 856S foi capaz de potencializar o efeito citotóxico do inibidor de PI3K LY294002 quando combinados. As diferenças foram significativas com o CGEN 856S mantido fixo na concentração de  $10^{-6}$ M e o LY294002 utilizado nas concentrações de 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 62,5  $\mu$ M e 31,25  $\mu$ M. Para a Ang-(1-7), conforme observado na figura 14B, houve uma diferença significativa na porcentagem das células tratadas com a combinação do peptídeo com LY294002 a 62,5  $\mu$ M quando comparado com o tratamento utilizando-se apenas o inibidor de PI3K LY294002 a 62,5  $\mu$ M + Ang-(1-7)  $10^{-6}$ M.



**Figura 14: Ensaio de Citotoxicidade em células DU145.** (A) Quantificação da taxa de sobrevivência de células DU145 tratadas com LY294002 na ausência (em preto) / presença (em branco) de CGEN 856S  $10^{-6}$ M. (B) Quantificação da taxa de sobrevivência de células DU145 tratadas com LY294002 na ausência (em preto) / presença (em branco) de Ang-(1-7)  $10^{-6}$ M. Média expressa em porcentagem. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

## 5 DISCUSSÃO

O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas exerce um papel contra-regulatório importante àqueles produzidos pela Ang II via receptor AT<sub>1</sub>, no que se refere à manutenção das funções cardiovasculares e homeostase, incluindo contração vascular, fibrose e crescimento. Desta forma, várias pesquisas têm sido realizadas em busca por novos peptídeos e compostos capazes de estimular esse eixo através da ativação do receptor Mas.

Savergnini et al., 2010 demonstraram vários efeitos cardioprotetores do peptídeo CGEN 856S utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, incluindo vasodilatação, anti-arritmogenia e anti-hipertensão. Mais recentemente, Savergnini et al. 2013, também mostraram que o CGEN 856S atenua o remodelamento cardíaco induzido por isoproterenol e injúria do miocárdio. Sabe-se que diferentemente da Ang-(1-7), O CGEN 856S promove o influxo de íons cálcio, conforme observado por Shemesh et al., 2008 e não é capaz de inibir a atividade da ECA. No entanto, ambos promovem vasodilatação dependente de NO.

Este trabalho mostrou que o CGEN 856S ativa a via AKT/eNOS, através da fosforilação da AKT em Serina 473 e eNOS em Ser1177, de forma semelhante à Ang-(1-7) (tratamento agudo por 10 minutos a uma concentração 10<sup>-7</sup>M). Não houve diferença significativa na fosforilação do resíduo Treonina495 da eNOS (sítio inibitório da enzima). Além disso, foi observada a liberação de NO em células CHO estavelmente transfectadas com o receptor Mas, quando estimuladas com ambos os peptídeos. Os efeitos observados na ativação da AKT e eNOS assim como na liberação de NO, não foram observados em células CHO as quais não expressam o receptor Mas constitutivamente, o que indica a participação deste receptor em promover e mediar estas respostas. Além disso, os dados obtidos corroboram os resultados anteriores de Savergnini et al., 2010 em modelo de vaso isolado, os quais mostraram a participação do endotélio na liberação de NO em modelos de anéis de aorta de camundongos e a ausência desses efeitos em anéis aorta de camundongos nocaute para o Mas.

Verano-Braga et al., 2012 mostraram que a Ang-(1-7) induz a ativação e translocação nuclear de FOXO1 em células HAEC e A549. FOXO1 é capaz de ativar genes relacionados a apoptose, parada do ciclo celular e resistência ao estresse oxidativo.

Estudos mostraram que Ang-(1-7) diminui significativamente a proliferação de células tumorais de pulmão humano *in vitro*, pela redução da atividade de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) (Gallagher & Tallant, 2004). Além disso, a infusão de Ang-(1-7) diminuiu o crescimento de células A549 com correspondente redução de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Menon et al., 2007).

Os dados obtidos no presente estudo mostraram que tanto o CGEN 856S quanto a Ang-(1-7) promoveram a desfosforilação de FOXO1 em células CHO-Mas, efeito este não observado em células CHO não transfectadas com o Mas. Além disso, o CGEN 856S promoveu a translocação de FOXO1 para o núcleo de células HAEC, após tratamento agudo por 3 minutos a uma concentração de  $10^{-7}$ M e também para o núcleo de células tumorais de pulmão humano da linhagem A549, de forma semelhante à Ang-(1-7) conforme mostrado recentemente por Verano-Braga et al., 2012. No modelo de células A549 a translocação de FOXO1 ainda permaneceu significativa durante 10 minutos.

Estudos recentes de Krishnan et al, 2013, mostraram pela primeira vez a inibição do crescimento de câncer de próstata metastático promovido pela Ang-(1-7) através da diminuição do crescimento de células de tumor de próstata (linhagem PC3) encontradas na tibia de camundongos em processo de metástase induzido pela injeção destas células intratibial. Neste mesmo trabalho, a Ang-(1-7) diminuiu a proliferação de células DU145 em até 25% além da migração das mesmas quando tratadas com o esse peptídeo durante sete dias a uma concentração de  $10^{-7}$ M. O autor sugere ainda que estes efeitos são mediados via receptor Mas, uma vez que o tratamento prévio com o A779 atenuou significativamente o efeito da Ang-(1-7) sob a migração celular. Os dados obtidos no presente estudo utilizando modelo de células tumorais DU145, mostraram que o CGEN 856S e a Ang-(1-7) também promoveram a translocação de FOXO1 na concentração de  $10^{-7}$ M nos tempos de 3 e 10 minutos.

Os dados deste trabalho indicam que, pelo menos em parte, o potencial antiproliferativo e antitumoral tanto do CGEN 856S quanto da Ang-(1-7) pode envolver a participação de FOXO1, uma vez que quando ativado, o mesmo encontra-se no núcleo celular. Tal ativação pode ser mediada pelo receptor Mas, já que o antagonista seletivo deste receptor, o A779, foi capaz de bloquear de forma eficaz a translocação de FOXO1 em células HAEC, A549 e DU145. Além disso, nenhum efeito dos dois peptídeos sob o nível de fosforilação de FOXO1 foi observado em células CHO que não expressam o Mas.

Estudos anteriores mostraram que inibidores da PI3K como a Wortmaninn e LY294002, são capazes de causar uma ativação de FOXO1, uma vez que bloqueiam os efeitos da via PI3K/AKT(Ciechomska et al., 2003; Ghatak et al., 2002) .

Jackson e colaboradores mostraram que em células de câncer de mama, a fosforilação de FOXO1 mediada por EGF pode ser bloqueada pelo LY294002, um inibidor de PI3K que atua no sitio de ligação da AKT pela PI3K e que não interfere na estimulação de EGF pela PI3K (Jackson et al., 2000).

Ciechomska e colaboradores mostraram que o tratamento de células de glioma C6 com LY294002 aumentou a translocação de FOXO1 para ao núcleo, mas que não foi

suficiente para induzir a expressão de FasL e apoptose . Em mielomas múltiplos de células MM1S, o LY294002 bloqueou a inativação de FOXO1 desencadeada por IL-6, resultando em uma regulação positiva de p27-Kip1 e aprisionamento do ciclo celular na fase G1 (Ciechomska et al., 2003). Samuels e colaboradores mostraram que a LY294002 inibe fracamente a fosforilação de FOXO1 e FOXO3, além de reduzir a proliferação de células cólon-retais tumorais, HCT116 e DLD1 (Samuels et al., 2005). Tanto o wortmannin, um metabólito fúngico inibidor de PI3K, quanto a LY294002 inibiram a fosforilação de FOXO1 em células HCT116 e células de carcinoma mamário TA3/St (Ghatak et al., 2002).

Neste trabalho, ambos os peptídeos CGEN 856S e Ang-(1-7) foram capazes de potencializar o efeito antiproliferativo dos inibidores de PI3K LY294002 e wortmaninn em linhagens de células tumorais. Isso provavelmente ocorre porque ao mesmo tempo em que há uma inibição da via PI3K/AKT pelos inibidores Wortmaninn e LY294002, o CGEN 846S e a Ang-(1-7) podem causar a ativação direta de FOXO1 ou de forma independente da via inibida pelo wortmaninn ou LY294002. A ativação de FOXO1, por sua vez, irá estimular a transcrição de genes relacionados com a parada do ciclo celular e apoptose.

Além de FOXO1, os estudos de fosfoproteômica para Ang-(1-7) mostraram que este peptídeo também promoveu ativação/inibição de outras proteínas relacionadas a proliferação celular, como DYRK1 e HDAC1. Quando ativado, DYRK1B induz parada do ciclo celular, diferenciação celular, sobrevivência e até mesmo aumenta a atividade de FOXO1 diretamente. (von Groote-Bidlingmaier et al., 2003). HDAC1 é uma enzima nuclear que quando ativada (fosforilada) desacetila histonas na porção N-terminal induzindo proliferação celular. A Ang-(1-7) promoveu a desfosforilação, ou seja, inibição de HDAC1 conforme descrito por Verano-Braga e colaboradores, em 2012. Assim, além de FOXO1, tanto a Ang-(1-7) quanto o CGEN 856S podem estar potencializando a morte celular por ativar ou inibir a atividade dessas proteínas, o que ainda precisa ser esclarecido.

Este estudo sugere que a atividade da isoforma óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) se dá pela ativação da AKT via receptor Mas, quando este é estimulado pelo CGEN 856S ou pela Ang-(1-7). Ao mesmo tempo, a ativação do Mas mostrou ser capaz de ativar FOXO1 por desfosforilação e promover sua translocação para o núcleo. Além disso, ambos os peptídeos potencializaram a inibição da proliferação celular causada pelos inibidores de PI3K wortmaninn e LY294002, sugerindo um contrabalanço entre crescimento celular por liberação de NO e antiproliferação via FOXO1. Em células HAEC, a translocação de FOXO1 foi transiente (apenas com 3 minutos de estimulação), o que é justificável pelo tipo celular, uma vez que nestas células a ativação da via do óxido nítrico é mais interessante do que uma via pró-apoptótica, por exemplo, como ocorreu para células A549 e DU145. Nesse

caso, a ativação de FOXO1 permaneceu por mais tempo (10 minutos), o que é interessante para estas células, já que são linhagens tumorais.

Dessa forma, estudos futuros são necessários para confirmar e esclarecer qual via (ou quais) exatamente é estimulada/inibida pela ação destes peptídeos, pois apesar do CGEN 856S e Ang-(1-7) serem agonistas do mesmo receptor, o Mas, eles são peptídeos não homólogos e podem apresentar diferenças quanto à sinalização intracelular que desencadeiam.

## 6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- O novo agonista do receptor Mas, CGEN 856S, assim como a Ang-(1-7), promoveu fosforilação da AKT no sítio de Ser473 em células CHO transfectadas com o receptor Mas. Não houve fosforilação significativa em células CHO não transfectadas.
- O CGEN 856S, da mesma forma que a Ang-(1-7), promoveu fosforilação da eNOS no sítio de Ser1177 em células CHO transfectadas com o receptor Mas. Não houve desfosforilação significativa no sítio de Thr495, bem como na fosforilação de células CHO não transfectadas.
- O CGEN 856S e a Ang-(1-7) promoveram desfosforilação de FOXO1 no sítio de Ser256 em células CHO transfectadas com o receptor Mas de forma semelhante. Não houve desfosforilação significativa em células CHO não transfectadas.
- O CGEN 856S promoveu liberação de NO em células CHO transfectadas com o receptor Mas. Não houve liberação significativa de NO em células CHO não transfectadas, assim como já observado para a Ang-(1-7)
- O CGEN 856S e a Ang-(1-7) promoveram a translocação nuclear de FOXO1 em células de endotélio de aorta humana (HAEC) bem como linhagens de células tumorais humanas de epitélio pulmonar (A549) e próstata (DU145). Estes efeitos foram bloqueados eficientemente pelo pré-tratamento das células com A779.
- O CGEN 856S e a Ang-(1-7) foram capazes de potencializar o efeito antiproliferativo dos inibidores da PI3K Wortmaninn e LY294002 em células A549 e DU145.

Os resultados apresentados neste trabalho suportam a importância dos benefícios gerados pela estimulação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas via AKT/eNOS e sugere a participação do fator de transcrição FOXO1 em mediar os efeitos antiproliferativos e antitumorais pela ativação do receptor Mas. O CGEN 856S e a Ang-(1-7) como agonistas deste receptor apresentaram efeitos semelhantes e representam, assim, um potencial alvo terapêutico no estudo de patologias cardiovasculares e do câncer.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arden, K. C. (2006). Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Experimental Gerontology*, 41(8), 709–17.
- Bader, M., Santos, R. a, Unger, T., & Steckelings, U. M. (2012). New therapeutic pathways in the RAS. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System : JRAAS*, 13(4), 505–8.
- Batenburg, W. W., Garrelds, I. M., Bernasconi, C. C., Juillerat-Jeanneret, L., van Kats, J. P., Saxena, P. R., & Danser, a H. J. (2004). Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*, 109, 2296-301.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Ciechomska, I., Pyrzynska, B., Kazmierczak, P., & Kaminska, B. (2003). Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells. *Oncogene*, 22(48), 7617–27.
- Cook, K. L., Metheny-Barlow, L. J., Tallant, E. A., & Gallagher, P. E. (2010). Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors. *Cancer Research*, 70(21), 8319–28.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., ... Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*, 87(5), E1–9.
- Ferreira, A. J., Jacoby, B. A., Araújo, C. A. A., Macedo, F. A. F. F., Silva, G. A. B., Almeida, A. P., ... Santos, R. A. S. (2007). The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(2), H1113–9.
- Ferreira, A. J., Oliveira, T. L., Castro, M. C. M., Almeida, A. P., Castro, C. H., Caliari, M. V, ... Santos, R. A. S. (2007). Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Sciences*, 81(11), 916–23.
- Ferreira, A. J., Santos, R. A., & Almeida, A. P. (2001). Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 665–8.
- Ferreira, A. J., & Santos, R. A. S. (2005). Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(4), 499–507.
- Gallagher, P. E., & Tallant, E. A. (2004). Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*, 25(11), 2045–52.
- Ghatak, S., Misra, S., & Toole, B. P. (2002). Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38013–20.
- Giani, J. F., Mayer, M. A., Muñoz, M. C., Silberman, E. A., Höcht, C., Taira, C. A., ... Dominici, F. P. (2009). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance

- and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(2), E262–71.
- Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410–25.
- Grobe, J. L., Mecca, A. P., Mao, H., & Katovich, M. J. (2006). Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(6), H2417–23.
- Jackson, J. G., Kreisberg, J. I., Koterba, A. P., Yee, D., & Brattain, M. G. (2000). Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells. *Oncogene*, 19(40), 4574–81.
- Jankowski, V., Vanholder, R., van der Giet, M., Tölle, M., Karadogan, S., Gobom, J., ... Jankowski, J. (2007). Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(2), 297–302.
- Katoh, M., Igarashi, M., Fukuda, H., Nakagama, H., & Katoh, M. (2013). Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer Letters*, 328(2), 198–206.
- Kliger, Y., Gofer, E., Wool, A., Toporik, A., Apatoff, A., & Olshansky, M. (2008). Predicting proteolytic sites in extracellular proteins: only halfway there. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(8), 1049–55.
- Krishnan, B., Smith, T. L., Dubey, P., Zapadka, M. E., Torti, F. M., Willingham, M. C., ... Gallagher, P. E. (2013). Angiotensin-(1-7) attenuates metastatic prostate cancer and reduces osteoclastogenesis. *The Prostate*, 73(1), 71–82
- Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. a, Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., ... Santos, R. a S. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, 112(8), 1104–11.
- Menon, J., Soto-Pantoja, D. R., Callahan, M. F., Cline, J. M., Ferrario, C. M., Tallant, E. A., & Gallagher, P. E. (2007). Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. *Cancer Research*, 67(6), 2809–15.
- Neves, L. A., Almeida, A. P., Khosla, M. C., Campagnole-Santos, M. J., & Santos, R. A. (1997). Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological*, 30(6), 801–9.
- Petty, W. J., Miller, A. a, McCoy, T. P., Gallagher, P. E., Tallant, E. A., & Torti, F. M. (2009). Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(23), 7398–404.
- Reagan-Shaw, S., & Ahmad, N. (2007). The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 360–8.

- Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2007). Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, *49*(1), 185–92.
- Samuels, Y., Diaz, L. A., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J. M., Delong, L., Cheong, I., ... Velculescu, V. E. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*, *7*(6), 561–73.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., & Andrade, S. P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, *91*(1-3), 45–62.
- Santos, R. A. S., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M. R., Machado, R. P., de Buhr, I., ... Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8258–63.
- Santos, S. H. S., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V. M., Pôrto, L. C. J., Alvarez-Leite, J. I., ... Santos, R. A. S. (2008). Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, *57*(2), 340–7.
- Savergnini, S. Q., Beiman, M., Lautner, R. Q., de Paula-Carvalho, V., Allahdadi, K., Pessoa, D. C., ... Santos, R. A. S. (2010). Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension*, *56*(1), 112–20.
- Savergnini, S. Q., Ianzer, D., Carvalho, M. B. L., Ferreira, A. J., Silva, G. a B., Marques, F. D., ... Santos, R. A. S. (2013). The novel Mas agonist, CGEN-856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *PLoS One*, *8*(3), e57757.
- Shemesh, R., Toporik, A., Levine, Z., Hecht, I., Rotman, G., Wool, A., ... Cohen, Y. (2008). Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(50), 34643–9.
- Soto-Pantoja, D. R., Menon, J., Gallagher, P. E., & Tallant, E. A. (2009). Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Molecular Cancer Therapeutics*, *8*(6), 1676–83.
- Timmermans, P. B., Benfield, P., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Wong, P. C., & Smith, R. D. (1992). Angiotensin II receptors and functional correlates. *American Journal of Hypertension*, *5*(12 Pt 2), 221S–235S.
- Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(43), 33238–43.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., ... Iwasaka, T. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *The Journal of Clinical Investigation*, *104*(7), 925–35.

- Verano-Braga, T., Schwämmle, V., Sylvester, M., Passos-Silva, D. G., Peluso, A. A. B., Etelvino, G. M., ... Roepstorff, P. (2012). Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. *Journal of Proteome Research*, 11(6), 3370–81.
- Von Groote-Bidlingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H. M., Joost, H. G., Becker, W., & Barthel, A. (2003). DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(3), 764–9.
- Welches, W. R., Brosnihan, K. B., & Ferrario, C. M. (1993). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sciences*, 52(18), 1461–80.
- Zhao, Y., Wang, Y., & Zhu, W.-G. (2011). Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(5), 276–82.

## **ANEXO**

### **Artigo publicado:**

Savergnini, S. Q., Ianzer, D., Carvalho, M. B. L., Ferreira, A. J., Silva, G. a B., Marques, F. D., ... Santos, R. A. S. (2013). The novel Mas agonist, CGEN-856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *PloS One*, 8(3).