

PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Estudo do papel do *Sry* no sistema cardiovascular e sua interação com o  
sistema renina angiotensina

Belo Horizonte

2014

**Fabiana Alves**

**Estudo do papel do *Sry* no sistema cardiovascular e sua interação com o sistema renina angiotensina**

*Tese apresentada junto ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG, como requisito para a obtenção do título de doutora em Fisiologia.*

**Orientador:** *Dr. Almir de Sousa Martins*

**Co-orientador:** *Dr. Robson Augusto Souza dos Santos*

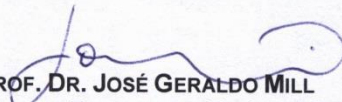
**Belo Horizonte**


**2014**

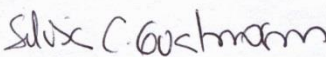
**"ESTUDO DO PAPEL DO SRY NO SISTEMA CARDIOVASCULAR  
E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA"**

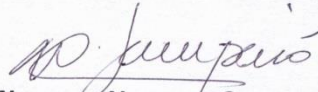
**FABIANA ALVES**


Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **18 de dezembro de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

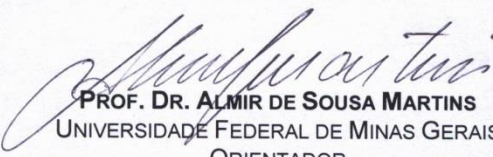
  
**PROF. DR. JOSÉ GERALDO MILL**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

  
**PROFA. DRª. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE DOS SANTOS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRª. SILVIA CAROLINA GUATIMOSIM FONSECA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRª. WALKYRIA NEYDE DE OLIVEIRA SAMPAIO**  
UNIVERSIDADE DE ITAÚNA

  
**PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CO-ORIENTADOR

  
**PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG  
**Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2014**

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios: Núcleo de Fisiologia Genômica e Funcional e Laboratório de Hipertensão Arterial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação do Professor Dr. Almir de Sousa Martins e Co-orientação do Professor Dr. Robson Augusto Souza Santos, na vigência de auxílios concedidos pelas instituições: CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCT.

"Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

Esses são os imprescindíveis."

(Bertolt Brecht).

Dedico esse trabalho ao meu marido

Francisco pelo amor compartilhado, paciência e

companheirismo; e aos meus pais por serem

imprescindíveis na minha vida.

# AGRADECIMENTOS

---

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua eterna presença em meu caminho, me guiando às portas corretas e tornando possível a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador professor Dr. Almir de Sousa Martins, por ter me recebido de portas abertas no NUFIGEN, pelo profissionalismo, por ser tão agradável e por ter me orientado de forma exemplar durante todo o meu doutorado.

Ao meu co-orientador professor Dr. Robson Augusto de Souza dos Santos por ter me dado todo apoio necessário para a realização deste trabalho e pelas oportunidades oferecidas durante estes quatro anos.

Aos professores Rômulo Cerqueira Leite e Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, meus eternos orientadores.

Ao Antônio Augusto Bastos Peluso pela perfeita e total colaboração neste trabalho e pela amizade construída durante os experimentos.

**Aos meus pais, simplesmente por existirem! Agradeço a criação que vocês me deram, agradeço as oportunidades que vocês me proporcionaram mesmo nos momentos mais difíceis. E afirmo que tudo que estou conseguindo é porque tive bases fortes. Dedico todo a minha satisfação e felicidade a vocês. Amo vocês intensamente!**

Ao meu marido Francisco, pelo amor, pelo apoio, pelo companheirismo, pela amizade, pela compreensão nos momentos difíceis e agradeço profundamente por você fazer parte da minha vida!

À professora Maristela de Oliveira Poletini pela contribuição intelectual e disposição durante os experimentos.

Ao professor Luiz Orlando Ladeira por disponibilizar as nanopartículas utilizadas neste estudo.

Aos professores membros da banca de qualificação: Dra. Silvia Carolina Guatmosim Fonseca, Dra. Adelina Martha dos Reis e Dr. Anderson José Ferreira, por terem contribuído plenamente para melhoria deste trabalho.

Aos professores membros da banca de defesa: Dr. José Geraldo Mill, Dra. Maria José Campagnole dos Santos, Dra. Silvia Carolina Guatmosim Fonseca e Dra. Walkyria Neyde de Oliveira Sampaio, pelas correções e sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos meus irmãos, em ordem alfabética para não ter ciúmes: Alexandre, Andréia e Robson. Agradeço a vocês a união, o amor, o companheirismo e a felicidade que temos.

Aos meus sobrinhos lindinhos e amorzinhos da minha vida também em ordem alfabética: Arthur, Gabriel, Henrique, Isabela, Lucas, Rodrigo e Vitor. Amo vocês!!!...

À Sra. Elza e Sr. Duílio por serem tão amáveis, agradáveis e por me tratarem com filha. Muito obrigada pelo apoio!

Aos meus cunhados Ana Paula, Andréia, Clemerson e Diego, por fazerem parte da família!

À Helen Lima Del Puerto, amiga e companheira lhe agradeço por me ajudar a integrar no meio científico.

Ao meu Arguinhos lindinho!!!...

À Gissandra Farias Braz pela amizade e companheirismo.

Marisa agradeço sua amizade! Eu sei que vai durar pelo resto de nossas vidas, mesmo com a distância do “tempo”.

À Sarah e Deborah pela companhia, ajuda nos experimentos e amizade compartilhada!

A todos do laboratório NUFIGEN, ICB, UFMG (Professora Elaine, Ludmila, Lucas, Gabriela, Maria Clara), pelos momentos de alegria e descontração. Agradeço em especial ao Jonas e Pedro pela ajuda durante os experimentos e pela boa vontade.

Ao Zezé que é perfeito sempre!!!...Amigo, gentil e profissionalíssimo! Muito obrigada pela extraordinária colaboração neste trabalho.

À Gisele Etelvino por sempre se preocupar comigo e me ajudar nas horas de necessidade.

À Marilene que é sempre tão atenciosa e prestativa. Muito obrigada pela ajuda e contribuição neste trabalho.

À Betinha pelos momentos de descontração e alegria no laboratório.

À todos do Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

À Cynthia, Nilda e Rodner da secretaria de Pós Graduação em Fisiologia do ICB, UFMG, pelo profissionalismo e paciência.

À professora Dra. Maria Esther por ser tão gentil, amiga e por ter nos ajudado tanto.

À Danielle Peres Rocha Oliveiros Marciano pela amizade, compreensão e profissionalismo.

Aos professores Márcia Amorim, Marília, Karen, Marina, Ricardo e Hudson por sempre terem torcido por mim! Muito obrigada!

Ao RETROLAB que continua sendo minha segunda casa no coração.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente durante a produção deste trabalho.

À CAPES que conferiu minha bolsa de estudos.

À FAPEMIG, CNPq e INCT pela ajuda financeira em eventos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

# RESUMO

---

## RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença multifatorial, poligenética e ligada ao sexo, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Um dos componentes da complexa rede que regula a PA é o sistema renina angiotensina (SRA), que influencia a homeostase do sódio e da água e o tônus vascular, têm sido extensamente estudados na correlação com a HAS e com doenças cardiovasculares. O SRA poder ser basicamente dividido em um eixo vasoconstritor (ECA/ANGII/AT1) e um eixo vasodilatador (ECA2/ANG 1-7/MAS/AT2) diretamente correlacionado à regulação da via das MAP quinases: ERK 1/2, JNK e p38. Muitos estudos demonstram que há maior incidência de HA e DCV em homens, quando comparados às mulheres. Recentemente, estudos tem demonstrado a participação do locus Sry do cromossomo Y na interação com o SRA de ratos. O objetivo do presente estudo foi analisar o papel do gene Sry humano na regulação da pressão arterial e no sistema renina angiotensina de ratos das linhagens Sprague Dawley (SD); e avaliar em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos SD e Wistar sua interação com o sistema renina angiotensina. Ratos SD foram submetidos às técnicas de eletroporação renal e transfecção por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) para liberação de clones contendo *Sryh* (*PSryh*) e *Sry3* (*PSry3*) via carótida e foram monitorados por telemetria para verificação da pressão arterial. A viabilidade da transfecção foi verificada por microscopia de luz e de transmissão. A partir da transfecção de *PSryh*, *PSry3*, *siSry* e *siMas* funcionalizados com NTCPM verificou-se a relação do *Sry* com: regulação da pressão arterial, frequência cardíaca, expressão dos genes do SRA, expressão de tirosina hidroxilase, ERK 1/2, JNK e p38. Os resultados obtidos pela microscopia comprovaram a transfecção e os de telemetria mostraram um aumento significativo da pressão arterial e da frequência cardíaca dos animais transfectados com *PSry3* e *PSryh* quando comparados aos controles, semelhante aos dados obtidos pela técnica de eletroporação renal. Após a transfecção em cardiomiócitos de ratos SD e Wistar, com *PSryh*, verificou-se um aumento significativo da

expressão de *angiotensinogênio*, *renina*, *ECA*, *AT2*, *TH*, ERK 1/2 e JNK, diminuição na expressão de p38; sem alterações significativas para ECA2 e MAS. Observou-se ainda, pela técnica de citometria de fluxo, um aumento do tamanho e da granulosidade dos cardiomiócitos após o tratamento, que foram confirmados pelas técnicas de HE e imunofluorescência. Estes dados confirmam o envolvimento do *Sry* no mecanismo de hipertrofia. Ao inibir a expressão dos genes *Sry* e *Mas* pela técnica de siRNA, observou-se um efeito regulatório do receptor Mas sobre o *Sry*, provavelmente pela inibição da via das MAP quinases, ERK 1/2 e JNK. Contudo, o *Sry3* produziu um aumento significativo na pressão sanguínea de ratos SD, do mesmo modo relatado na literatura para ratos Wistar Kyoto, mostrando que o *Sry* tem ações fisiológicas conservadas nas linhagens estudadas de *Rattus norvegicus*. O *Sryh* regula a pressão arterial, interfere na expressão gênica da via vasoconstritora do SRA, e da via precursora de catecolaminas a partir do aumento da expressão de tirosina hidroxilase. Este último, ocasionado provavelmente pelo aumento da expressão do receptor AT2.

**Palavras-chave:** *Sry* humano. *Sry3*. SRA. TH. AT2. Receptor Mas. MAPK

# ABSTRACT

---

## ABSTRACT

The systemic arterial hypertension (SAH) is a multifactorial, polygenetic and sex-linked medical condition characterized by high and sustained levels of blood pressure (BP). One of the components of the complex network that regulates PA is the renin angiotensin system (RAS), which influences the homeostasis of salt and water and vascular tone, has been extensively studied in correlation with hypertension and cardiovascular disease. The SRA can be basically divided into a vasoconstrictor axis (ACE/ANG II/AT1) and a vasodilator axis (ACE2/ANG 1-7/MAS/AT2) directly correlated to regulation via the MAP kinases: ERK 1/2, JNK and p38. Many studies show that there is a higher incidence of hypertension and CVD in men compared to women. Recently, studies have demonstrated the involvement of the *Sry* locus on the Y chromosome in the interaction with the SRA of rats. The aim of this study was to analyze the role of human *Sry* gene in the regulation of blood pressure and renin angiotensin system of mice strains Sprague Dawley (SD); and evaluate in primary culture of neonatal rat cardiomyocytes SD and Wistar its interaction with the renin angiotensin system. Sprague Dawley rats were subjected to the techniques of electroporation and transfection by renal carbon nanotubes multi-walled (NTCPM) for delivery of clones containing *Sryh* (*P Sryh*) and *Sry3* (*P Sry3*) via carotid and were monitored by telemetry for blood pressure. The viability was checked by transfection of light and transmission electron microscopy. From the transfection of *Sryh*, *Sry3*, si*Sry* and si*Mas*, functionalized with NTCPM, there was a relationship of *Sry* to the following: regulation of blood pressure, heart rate, gene expression of RAS, expression of *tyrosine hydroxylase* and ERK1 / 2, JNK and p38. The results obtained by microscopy confirmed the transfection and telemetry showed a significant increase in blood pressure and heart rate of the animals transfected with *Sry3* and *Sryh* when compared to controls, similar to the data obtained by the technique of kidney electroporation. After transfection into cardiomyocytes of SD and Wistar rats with *Sryh*, there was a significant increase in the expression of the of *renin*, *ACE*, *AT2*, *TH*, JNK and ERK 1/2 but decrease in the expression of p38;

without significant changes to AT1, *ACE2* and *MAS*. We also observed by flow cytometry, an increase in the size and granularity of cardiomyocytes after treatment, which were confirmed by HE and immunofluorescence techniques. These data suggest the involvement of *Sry* in hypertrophy mechanism. By inhibiting the expression of the genes *Sry* and MAs by siRNA technique, there is a regulatory effect on *Sry* receptor but probably via the inhibition of MAP kinases, JNK and ERK 1/2. However, *Sry3* produced a significant increase in blood pressure of SD rats in the same way reported in the literature for Wistar Kyoto, showing that *Sry* has physiological actions conserved in the studied strains of *Rattus norvegicus*. The *Sryh* regulates blood pressure, interferes with gene expression of the vasoconstrictor via the SRA, and the precursor pathway of catecholamines from the increased expression of tyrosine hydroxylase. The latter probably due to increased expression of AT2 receptor.

**Keywords:** Human *Sry*. *Sry3*. RAS. TH. AT2. MAs Receptor. MAPK

# LISTA DE FIGURAS

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração simplificada da cascata proteolítica de formação e de degradação dos principais peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos..	39
<b>Figura 2.</b> Relação da ANG 1-7 com a atenuação da via das MAP quinases no sistema nervoso central e Interação da ANG II com a via das MAP quinases, sobrevivência, crescimento e hipertrofia na musculatura lisa vascular .....	44
<b>Figura 3.</b> Relação do Sry com o sistema renina antiotensina.....	46
<b>Figura 4.</b> Modelo apresentando a proteína Sry humana e de rato ligada ao DN..	50
<b>Figura 5.</b> Microscopia de luz do rim de ratos SD corados por técnica citoquímica específica para DNA (reação de Feulgen), após inoculação dos NTCPM complexados com clones Sry.....	81
<b>Figura 6.</b> Eletromicrografia eletrônica apresentando endocitose de grumos de NTCPM no endotélios dos capilares glomerulares.....	82
<b>Figura 7.</b> Eletromicrografias das células endoteliais do capilar glomerular..	83
<b>Figura 8.</b> Eletromicrografia de tecido muscular e vascular cardíaco..	84
<b>Figura 9.</b> A microscopia eletrônica de transmissão de cérebro de rato, apresentando unidade neurovascular. ....	85
<b>Figura 10.</b> A microscopia eletrônica de transmissão de cérebro de rato, apresentando detalhes do núcleo (N) da célula endotelial da unidade neurovascular e lume do vaso (L). ....	86
<b>Figura 11.</b> Pressão sistólica dos ratos SD após eletroporação com clones de Sry3, hSry e vetor controle..	88
<b>Figura 12.</b> Pressão sistólica dos ratos SD após inoculação de NTCPM complexados com clones de Sry3, hSry e vetor controle.....	89
<b>Figura 13.</b> Análise da frequência cardíaca em ratos SD após transfecção de PSry3 e PSryh com NTCPM..	90

<b>Figura 14.</b> Análise da citotoxicidade dos NTCPM, do plasmídeo contendo o gene <i>Sryh</i> e dos NTCPM complexados ao plasmídeo contendo o gene <i>Sryh</i> , transfectados em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos SD. ....	91
<b>Figura 15.</b> Análise da expressão de <i>Sry</i> em cultivo de cardiomiócitos de ratos SD após transfecção de <i>Sry3</i> .....	92
<b>Figura 16.</b> Análise da expressão de <i>Sry</i> em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos SD após transfecção de <i>Sryh</i> funcionalizados com NTCPM.....	92
<b>Figura 17.</b> Análise da expressão dos genes relacionados à via vasoconstritora do SRA após a transfecção de <i>Sryh</i> e <i>Sry3</i> em cardiomiócitos de ratos SD.....	94
<b>Figura 18.</b> Análise da expressão dos genes relacionados à via vasodilatadora do SRA após a transfecção de <i>Sryh</i> e <i>Sry3</i> em cardiomiócitos de ratos SD.....	96
<b>Figura 19.</b> Análise da expressão de tirosina hidroxilase após transfecção com <i>Sryh</i> .....	97
<b>Figura 20.</b> Análise da citotoxicidade dos NTCPM, si <i>Sry</i> , plasmídeos <i>Sryh</i> , NTCPM complexados cm si <i>Sry</i> e NTCPM com plasmídeo <i>Sryh</i> , transfectados em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar.....	98
<b>Figura 21.</b> Análise da expressão de <i>Sry</i> em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar após transfecção de <i>Sryh</i> funcionalizados com NTCPM.....	99
<b>Figura 22.</b> Análise da expressão de <i>Sry</i> em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar após transfecção de <i>Sryh</i> funcionalizados com NTCPM.....	100
<b>Figura 23.</b> Análise da expressão de <i>Sry</i> em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar, após o silenciamento do mRNA do <i>Sry</i> .....	101
<b>Figura 24.</b> Análise da expressão do mRNA do receptor Mas em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar, após o silenciamento do mRNA do receptor Mas.....	102
<b>Figura 25.</b> Análise da expressão da proteína do receptor Mas em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar, após o silenciamento do mRNA do receptor Mas.....	103

<b>Figura 26.</b> Análise da expressão do Sry após a transfecção do siMas, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar.....	104
<b>Figura 27.</b> Análise da expressão do receptor Mas após a transfecção do siSry, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. ....	105
<b>Figura 28.</b> Análise da expressão das proteínas ERK 1/2, p38 e JNK após a transfecção do siMAS, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar....	106
<b>Figura 29.</b> Análise da expressão das proteínas ERK 1/2, p38 e JNK após a transfecção do siSry, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar.. ....	107
<b>Figura 30.</b> Análise da expressão das proteínas ERK 1/2, p38 e JNK após a transfecção dos PSryh e PSry3, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. ....	109
<b>Figura 31.</b> Análise da frequência de batimentos dos cardiomiócitos após a transfecção do siSry.....	110
<b>Figura 32.</b> Análise da expressão de tirosina hidroxilase após a transfecção do Sryh, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar .....	111
<b>Figura 33.</b> Análise da expressão de tirosina hidroxilase após a transfecção do Sry3, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. ....	112
<b>Figura 34.</b> Análise da expressão dos genes relacionados ao SRA após a transfecção de Sry3 em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar. ....	113
<b>Figura 35.</b> Análise da expressão dos genes relacionados ao SRA após a transfecção de Sryh em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar. ....	115
<b>Figura 36.</b> Análise do tamanho e granulosidade dos cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar através da técnica de citometria de fluxo.....	117
<b>Figura 37.</b> Análise da área dos cardiomiócitos pela técnica de imunofluorescência. ....	118

# LISTA DE TABELAS

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Expressão de <i>Sry</i> em tecidos de mamíferos e formas de detecção.....	51
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese e amplificação do cDNA.....	68

# **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANG 1-7	Angiotensina 1-7
ANG 1-9	Angiotensina 1-9
AT1	Receptor do subtipo 1 da ANG II
AT2	Receptor do subtipo 2 da ANG II
bpm	Batimentos por minuto
DCV	Doença cardiovascular
ECA	Enzima conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima conversora de Angiotensina 2
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e eosina
KDa	Quilodalton
MAP kinases	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mas	Protooncogene Mas
MRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
PA	Pressão arterial

PAM	Pressão arterial média
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
PSry3	Plasmídeo contendo o gene <i>Sry3</i>
PSryh	Plasmídeo contendo o gene <i>Sryh</i>
Rpm	Rotações por minuto
SD	<i>Sprague-Dawley</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SiRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SRA	Sistema renina angiotensina
SRY	<i>Sex related y chromosome gene</i>
TH	Tirosina hidroxilase
WKY	<i>Wistar Kyoto</i>

# SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	32
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL .....	32
1.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA .....	36
1.3. SRY (GENE DO CROMOSSOMO Y RELACIONADO À DIFERENCIAÇÃO SEXUAL) .....	47
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	53
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	55
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	59
4.1 ANIMAIS .....	59
4.2 AVALIAÇÃO DO <i>SRY3</i> E <i>SRYH</i> NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E NA INTERAÇÃO COM O SRA DE RATOS SD .....	61
4.2.1 Implante de pobre de telemetria .....	61
4.2.2 Eletroporação dos plasmídeos <i>Sry3</i> e <i>Sryh</i> .....	61
4.2.3 Transfecção dos plasmídeos <i>Sry3</i> e <i>Sryh</i> utilizando NTCPM .....	62
4.2.3.1 Análise da efetividade da transfecção .....	63
4.2.4 Transfecção em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos SD neonatos .....	64
4.2.4.1 Extração de RNA e análise da expressão gênica .....	66
4.3 INTERAÇÃO DOS GENES <i>SRY3</i> E <i>SRYH</i> E O SRA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS WISTAR NEONATOS E ANÁLISE MORFOFUNCIONAL PÓS TRANSFECÇÃO E INIBIÇÃO DO SRY. .....	69

4.3.1 Transfecção, extração de RNA e análise da expressão gênica em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar neonatos.....	69
4.3.2 Efeito inibitório do siSry e siMAS .....	69
4.3.2 Extração de proteínas e expressão proteica .....	70
4.3.3 Análise da frequência de batimentos e morfologia dos cardiomiócitos após o tratamento .....	74
4.3.3.1 – Análise da frequência de batimentos dos cardiomiócitos .....	74
4.3.3.2 Análise morfológica dos cardiomiócitos após o tratamento.....	75
4.3.3.2.1 Citometria de fluxo .....	75
4.3.3.2.2 Análise histológica .....	76
4.3.3.2.3 Método Imunofluorescência .....	76
4.3.4 Análise estatística .....	78
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>80</b>
5.1 AVALIAÇÃO DO <i>SRY3</i> E <i>SRYH</i> NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E NA INTERAÇÃO COM O SRA DE RATOS SD.....	80
5.1.1 Análise da efetividade da transfecção <i>in vivo</i> .....	80
5.1.2 Eletroporação e transfecção de P <i>Sry3</i> e P <i>Sryh</i> .....	87
5.1.3 Análise da efetividade da transfecção <i>in vitro</i> .....	91
5.1.4 Interação com os genes do SRA e TH.....	93
5.2 ESTUDO DO PAPEL DO SRY NOS EFEITOS CARDÍACOS E INTERAÇÃO COM O SRA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS WISTAR.....	98
5.2.1 Análise da viabilidade celular .....	98
5.2.2 Transfecção dos plasmídeos .....	99

5.2.3 Transfecção dos siRNAs.....	100
5.2.4 Interação Sry/MAS .....	104
5.2.5 Efeitos morfofisiológicos nos cardiomiócitos e no SRA.....	110
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>120</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>129</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>132</b>

# REVISÃO DE LITERATURA

---

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial, poligenética e ligada ao sexo, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA).

Frequentemente a HAS esta relacionada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo como: coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (RECKELHOFF, 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006; WILLIAMS, 2010; WOODS et al., 2010; MARANON e RECKELHOFF, 2013).

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), a hipertensão arterial sistêmica é um dos fatores de risco mais importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais; e é um problema grave de saúde pública no Brasil e no mundo, responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% das mortes por doença arterial coronariana.

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006), a mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente. Sendo as

DCV as principais responsáveis por internações, ocasionando custos socioeconômicos elevados.

No Brasil, inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30%, sendo 35,8% nos homens e 30% em mulheres (CESARINO et al., 2008; ROSÁRIO et al., 2009). Pereira et al. (2009), encontraram uma prevalência global relacionada ao gênero semelhante em outros 35 países: 37,8% em homens e 32,1% em mulheres.

Estudos também demonstram que existem diversos fatores de risco relacionados à HAS como:

- Idade - há uma relação direta e linear da PA com a idade, sendo a prevalência de HAS superior a 60% na faixa etária acima de 65 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006; CESARINO et al., 2008);

- Gênero - prevalência global de HAS entre homens e mulheres é semelhante, embora seja mais elevada nos homens até os 50 anos, invertendo-se a partir desta idade (LESSA, 2001; MARTINEZ e LATORRE, 2006; CESARINO et al., 2008);

- Cor - a HAS é duas vezes mais prevalente em indivíduos de cor não-branca. Estudos brasileiros com abordagem simultânea de gênero e cor demonstraram predomínio de mulheres negras com excesso de HAS de até 130% em relação às brancas (LESSA, 2001);

- Excesso de peso e obesidade - o excesso de peso se associa com maior prevalência de HAS desde idades jovens. Na vida adulta, mesmo entre

indivíduos fisicamente ativos, incremento de 2,4 kg/m<sup>2</sup> no índice de massa corporal (IMC) acarreta maior risco de desenvolver hipertensão (BRANDÃO et al., 2004);

- Ingestão de sódio - ingestão excessiva de sódio tem sido correlacionada com elevação da PA . A população brasileira apresenta um padrão alimentar rico em sal, açúcar e gorduras. Em contrapartida, em populações com dieta pobre em sal, como os índios brasileiros Yanomami, não são encontrados casos de HAS, e estudos também tem demonstrado que a restrição de sódio está relacionada à efeitos hipotensores (APPEL et al., 1997; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006; HE e MACGREGOR, 2009);

- Ingestão de álcool – a ingestão de álcool por períodos prolongados de tempo pode aumentar a PA e a mortalidade cardiovascular em geral (MARTINEZ e LATORRE, 2006);

- Sedentarismo – atividade física reduz a incidência de HAS, mesmo em indivíduos pré-hipertensos, bem como a mortalidade e o risco de DCV (PESCATELLO et al., 2004);

- Fatores socioeconômicos - a influência do nível socioeconômico na ocorrência da HAS é complexa e difícil de ser estabelecida (CONEN et al., 2009). De acordo com Cesarino et al. (2008), no Brasil a HAS é mais prevalente entre indivíduos com menor escolaridade;

- Genética - a contribuição de fatores genéticos para a gênese da HAS está bem estabelecida na população, porém, não existem, até o momento,

variantes genéticas que, possam ser utilizadas para predizer o risco individual de se desenvolver HAS (de OLIVEIRA et al., 2008).

Estudos clínicos relataram que a detecção, o tratamento e o controle da HAS são fundamentais para a redução dos eventos cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006). Mudanças no estilo de vida como: alimentação saudável, consumo moderado de sódio e álcool, ingestão de potássio, combate ao sedentarismo e tabagismo, podem ser uma mudança primária para a redução da HAS e da mortalidade por DCV (RAINFORTH et al., 2007). No entanto, para o manejo de indivíduos com comportamento limítrofe da PA recomenda-se considerar o tratamento medicamentoso apenas em condições de risco cardiovascular global alto ou muito alto (NEVES e OIGMAN, 2009).

Um dos componentes da complexa rede que regula a pressão arterial é o sistema renina angiotensina (SRA), que influencia a homeostase do sal e da água e o tônus vascular, e tem sido extensamente estudado na correlação com a HAS, bem como os genes que regulam a expressão de proteínas envolvidas nesse sistema (RIGATTO et al., 2004).

## 1.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O SRA desempenha importante função na regulação central e periférica da pressão arterial, da homeostasia hidro-eletrolítica, e tem sido descrito como um sistema endócrino e tecidual envolvido na patogênese de várias doenças cardiovasculares e renais (MORISHITA et al., 2000; OUDIT et al., 2003; ETELVINO et al., 2014).

As primeiras descobertas sobre o SRA já datam mais de um século, em que a renina uma aspartil protease produzida no rim e segregada para o fluxo sanguíneo foi descoberta, a partir do aumento da pressão arterial de animais anestesiados após aplicação de extratos de rim não purificados (INAGAMI, 1998).

Braun-Mendes et al. (1940) e Page e Helmer (1940), demonstraram que o aumento da pressão não era desencadeado apenas pela renina, mas pelo produto formado após sua ação enzimática sobre uma proteína plasmática, denominada angiotensinogênio -  $\alpha$ -2-globulina produzida principalmente pelo fígado, que quando clivado na sua porção amino-terminal pela renina, forma angiotensina I (BRAUN-MENENDEZ e PAGE, 1958; ETELVINO et al. 2014).

Posteriormente, Skeggs et al. (1954), relataram que haviam duas formas da angiotensina: angiotensina I e II; e Skeggs et al. (1956), elucidaram a cascata de formação da angiotensina II, demonstrando tratar-se de um octapeptídeo formado pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) sobre a Ang I.

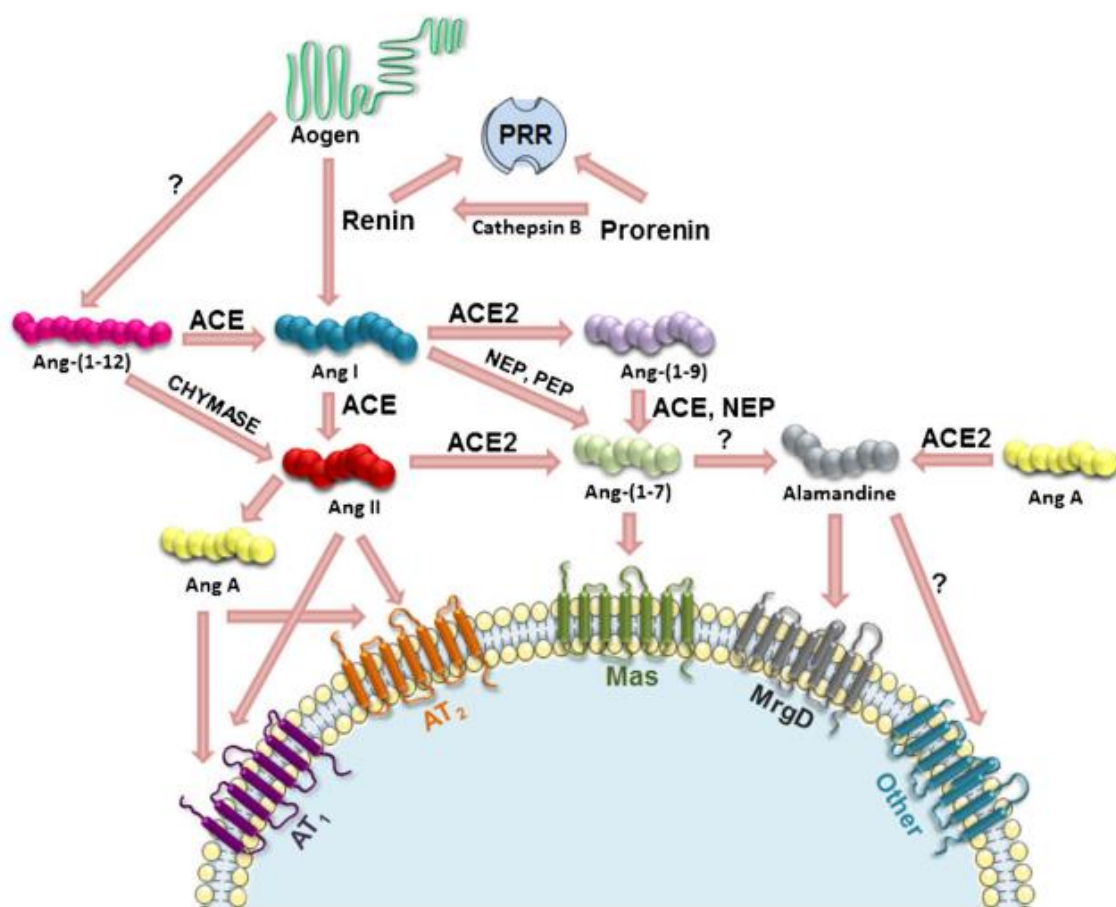
Em 2000, foi identificada a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) que converte ANG I em ANG 1-9, que pode ser convertida pela ECA em Angiotensina 1-7 (ANG 1-7). A ECA 2 também pode agir sobre a ANG II formando ANG 1-7 (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000).

A ANG 1-7 é um ligante endógeno do receptor Mas, que até pouco tempo era considerado um receptor órfão acoplado à proteína G. A ANG 1-7 quando associada ao receptor Mas desencadeia efeitos fisiológicos antagônicos aos observados pela ANG II em seu receptor AT1(SANTOS et al., 2003; KOSTENIS et al., 2005). E mais recentemente, também foi descrito o peptídeo endógeno alamandina [Ala<sup>1</sup>- ANG 1-7) ligante do receptor MrgD. A alamandina possui ações fisiológicas similares a ANG 1-7, como: efeitos anti proliferativos, vasodilatação, liberação de óxido nítrico, modulação da sensibilidade do baroreflexo, diminuição da pressão arterial e colágenos I, III e fibronectina (LAUTNER et al., 2013).

Todos os componentes do SRA já foram encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, ossos, pâncreas, tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dental, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores, permitindo distinguir um SRA local e um circulante (CAMPBELL, 1987; OBERMÜLLER et al., 2004; LEUNG, 2004; GOKER et al., 2005).

A desregulação deste sistema está relacionada ao surgimento de doenças cardiovasculares como: hipertensão, doenças coronarianas, miocardites e insuficiência cardíaca (DOSTAL et al., 1999), sendo que o surgimento da

hipertensão pode está relacionada com dois principais peptídeos ativos deste sistema: a Ang-II e ANG 1-7, que exercem, na maioria das vezes, ações antagônicas sobre a saúde cardiovascular (Figura 1) (MACHADO et al., 2002; BENTER et al., 1995; ETELVINO et al., 2014).



**Figura 1.** Ilustração simplificada da cascata proteolítica de formação e de degradação dos principais peptídeos angiotensinogênicos biologicamente ativos. Aogen – angiotensinogênio; PRR – receptor de pro renina; Ang – angiotensina; ACE – enzima conversora de angiotensina; ACE2 – enzima conversora de angiotensina 2; NEP – endopeptidase neutra; PEP – prolil-endopeptidase; AT1 – receptor tipo 1 de angiotensina; AT2 – receptor tipo 2 de angiotensina; Mas – receptor de ANG 1-7; MrgD – receptor acoplado à proteína G. Adaptado de Etelvino et al. (2014).

O SRA tem sido proposto como um dos principais componentes para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, sendo a ANG II e seus receptores AT1 e AT2 no coração, um dos principais motivos (MAZZOLAI et al., 1998; LORELL, 1999). Alguns estudos mostram que o tecido cardíaco tem uma alta eficiência em captar da circulação as enzimas e os demais componentes do sistema renina-angiotensina. Muller et al. (1998), relataram que a renina, por exemplo, parece ser facilmente captada na circulação coronariana. E diversos estudos já comprovaram a presença de um sistema renina-angiotensina local no coração (CAMPBELL, 1987; LINDPAINTER et al., 1990; HIRSCH et al., 1990).

A ANG II é o peptídeo mais conhecido deste sistema, e promove ações hipertensivas nos diferentes sistemas fisiológicos como: vasoconstrição, aumento da secreção de ADH pela hipófise posterior, aumento da secreção da aldosterona na zona glomerulosa renal, redução da sensibilidade dos barorreceptores, aumento do apetite por sódio e água, proliferação endotelial, inflamação, aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva e efeitos inotrópicos e cronotrópicos cardíacos (PEACH, 1997; FERRARIO et al., 1998; MACHADO et al., 2002; MEHTA e GRIENGLING, 2007).

A ANG II possui interações com os receptores AT1 e AT2. O AT1 é um membro da família de receptores ligados à proteína G, e medeia a angiogênese, vasoconstrição, liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, liberação de aldosterona e proliferação celular. O receptor AT2 também está ligado à proteína G e está relacionado a efeitos antagônicos ao do receptor AT1, como vasodilatação,

inibição da angiogênese e da proliferação celular (UNGER et al., 2002). No entanto, Macova et al. (2009), demonstraram que os receptores AT2 também estão relacionados na regulação das vias das catecolaminas, em que o bloqueio dos receptores AT2 no cérebro causa diminuição da síntese tirosina hidroxilase (TH). Macova et al. (2008), também demonstraram através do efeito da ovariectomia e reposição de estrogênio um aumento da expressão do receptor AT2 adrenal e TH. Armando et al. (2004), em estudos relacionados ao estresse, relataram um efeito sinérgico entre os receptores AT1 e AT2 no aumento da expressão de tirosina TH.

A ANG 1-7, na maioria das vezes, exerce ações antagônicas a ANG II (SANTOS et al., 2000). Campagnole-Santos et al. (1992), observaram que a Ang-(1-7) aumenta a sensibilidade do barorreceptor. Paula et al. (1995) e Lima et al. (1997), relataram que ela potencializa o efeito da bradicinina; assim com também do óxido nítrico (PÖRSTI et al., 1994; BROSNIHAN et al., 1996; HEITSCH et al., 2001).

Após vários autores demonstrarem que os efeitos da ANG-1-7 não eram inibidos pelo bloqueio dos receptores AT1 e AT2 (BENTER et al., 1993; PÖRSTI et al., 1994; BROSNIHAN et al., 1996), Santos et al. (2003), demonstram que este peptídeo atua no receptor Mas.

Diversos estudos têm mostrado que a ANG-1-7, via receptor Mas, tem efeitos anti-hipertrófico e anti-fibrótico no coração. Santos et al. (2006), utilizando um modelo de camundongos *knockout* para o receptor Mas mostraram baixa

reatividade da ANG-1-7 em fatias do ventrículo esquerdo destes animais. Além disso, foi mostrado que camundongos *knockout* para o receptor Mas apresentam aumento da síntese de colágeno I e III, fibronectina e redução do colágeno VI favorecendo assim o surgimento de disfunção sistólica e diastólica independentemente de alterações da pressão arterial. Tallant et al. (2005), identificaram a presença do receptor Mas em cardiomiócitos de ratos neonatos sugerindo que a ANG-1-7 pode agir diretamente através do seu receptor no processo contrátil e na hipertrofia dos miócitos.

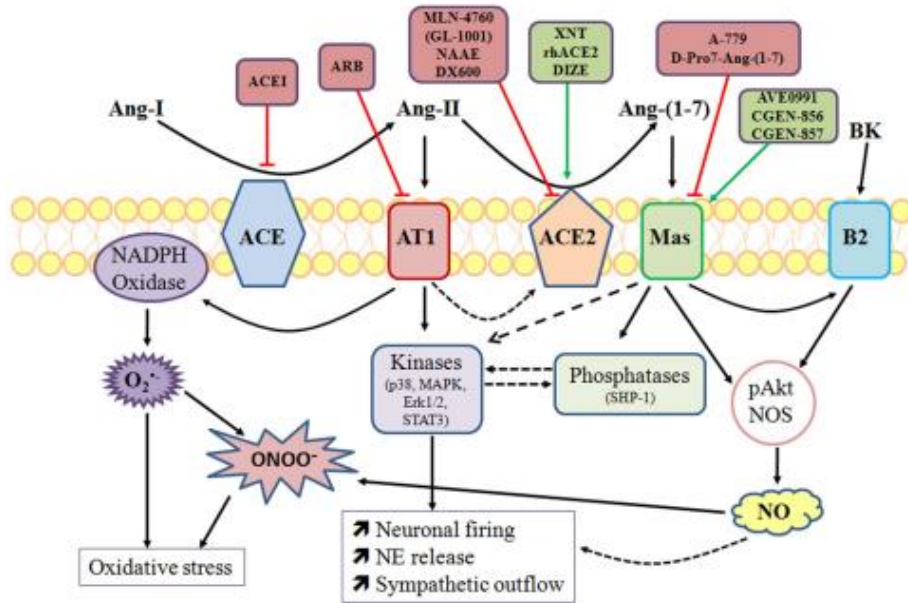
Os mesmos autores demonstraram em cardiomiócitos; assim como Tian et al. (2014), em estudos relacionados à atenuação dos danos aos podócitos durante a pré eclampsia; e Zhou et al. (2012), estudando a ação da ANG 1-7 também no rim, que o receptor Mas ativado pela ANG 1-7 inibem a atividade das MAP quinases ERK 1/2, p38 e JNK. Xu Ping e Lazartigues (2011), também verificaram uma atenuação da atividade destas MAP quinases no sistema nervoso central após administração de ANG 1-7 (Figura 2a).

As MAP quinases ERK 1/2, c-Jun quinases N-terminais (JNK1, 2, e 3) e p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), são clássicas quinases reguladas por sinais extracelulares, correlacionadas aos estudos sobre hipertrofia cardíaca e o SRA. Wei et al. (2014), demonstraram uma correlação direta entre o SRA e estas MAPK quando administraram ANG II e observaram níveis aumentados de ERK 1/2, JNK e p38. O papel do ANG II na musculatura vascular, sua correlação com a via das MAP quinases e hipertrofia, foi elucidado por Mehta e Griendling (2007) (Figura 2b).

Segundo Dorn et al. (1999) e Xiao et al. (2001), os níveis de ERK 1/2 também podem ser regulados pela ativação dos receptores de tirosina hidroxilase (TH).

A TH é uma enzima limitante da velocidade na biossíntese das catecolaminas, que participam da regulação da pressão arterial via sistema nervoso simpático (SNS). Os vasos sanguíneos possuem receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos regulados pelos níveis de catecolaminas circulantes. As catecolaminas são as principais responsáveis pela vasoconstrição; aumento do automatismo dos marcapassos cardíacos e da frequência cardíaca (SCHÜMANN, 1966).

A



B

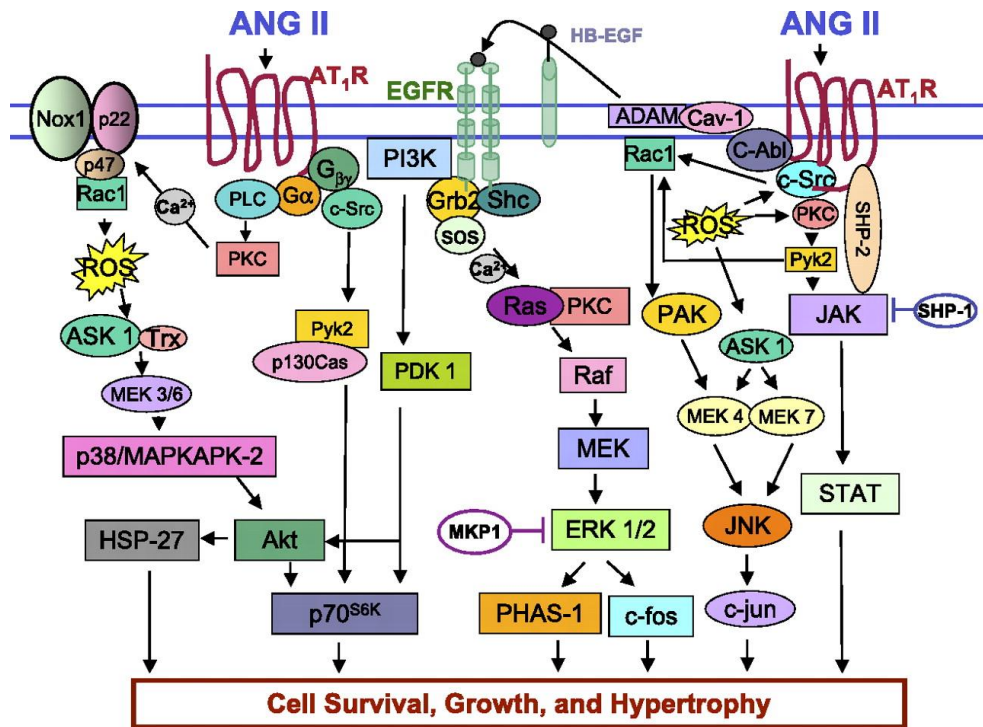
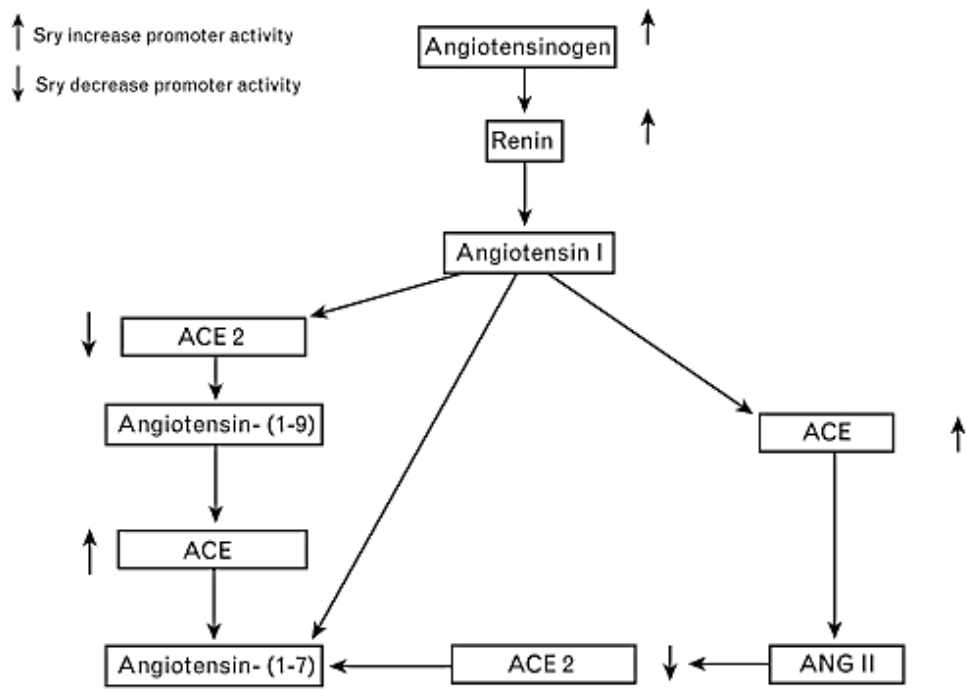


Figura 2. A. Relação da ANG 1-7 com a atenuação da via das MAP quinases no sistema nervoso central (Xu Ping et al., 2011). B. Interação da ANG II com a via das MAP quinases, sobrevivência, crescimento e hipertrofia na musculatura lisa vascular (Mehta e Griendling, 2007).

Recentemente, alguns estudos também tem demonstrado a participação do locus *Sry* na interação com alguns genes do SRA (Figura 3) (ELY e TURNER, 1990; TURNER et al., 2009; ELY et al., 2011; ELY et al., 2007; ELY et al., 2009; MILSTED et al., 2010; PROKOP et al., 2012; PROKOP et al. 2014).

Este locus pertence ao cromossomo Y e Garcia et al. (2003), observaram que há uma relação entre hipertensão, infarto do miocárdio e polimorfismos no *Sry* e que estas alterações estão correlacionadas à maior incidência de hipertensão e doenças cardiovasculares ocasionadas nos homens quando comparado às mulheres. Charchar et al. (2003) e Hilliard et al. (2013), relataram que nos machos o eixo ECA/ANGII/AT1 é mais pronunciado, enquanto nas fêmeas, o equilíbrio é deslocado para o eixo vasodilatador (ECA2/ANG 1-7/Mas e AT2).



**Figura 3.** Relação do Sry com o sistema renina antiotensina. Milsted et al. (2010).

### 1.3. SRY (GENE DO CROMOSSOMO Y RELACIONADO À DIFERENCIAÇÃO SEXUAL)

O cromossomo Y foi proposto como relacionado à diferenciação sexual masculina em 1959, e desde então alguns genes candidatos foram estudados como responsáveis pelas características masculinas, como o TDF (*testis-determining fator*) em humanos e Tdy em camundongos. Em 1990, o gene Sry foi descoberto no camundongo e em humanos (GUBBAY et al., 1990; SINCLAIR et al., 1990).

Atualmente, sabe-se que o locus *Sry* é o gene responsável pela formação gonadal e diferenciação sexual masculina no cromossomo Y de mamíferos, e codifica um fator de transcrição contendo um domínio altamente conservado de ligação no DNA característico de alguns grupos de proteínas (família Sox) chamado *HMG box (High Mobility Group)* (SEKIDO, 2010; Ely et al., 2009).

Dentro da família Sox estão inseridos diversos genes que codificam fatores de transcrição reguladores do desenvolvimento embrionário e diferenciação celular, e tem sido estudados em drosophila, aves, anfíbios, répteis, peixes e mamíferos (LAUDET et al., 1993; CORIAT et al., 1993; VRIZ et al., 1995; KAMACHI et al., 2000).

Nesta família já foram encontrados cerca de 30 genes em camundongos, ratos e humanos, os quais estão distribuídos em oito subfamílias

(A a H) de acordo com a similaridade de suas sequências de aminoácidos dos peptídeos: subfamília A – composta pelo gene *Sry*; subfamília B – *Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Sox14*, *Sox15* e *Sox19*; subfamília C – *Sox4*, *Sox11*, *Sox12* e *Sox20*; subfamília D – *Sox5*, *Sox6* e *Sox13*; subfamília E – *Sox8*, *Sox9* e *Sox10*; subfamília F – *Sox7*, *Sox17* e *Sox18*; subfamília G - *Sox15*; subfamília H – *Sox30* (PRIOR e WALTER, 1996; LEFEBVRE, 2002; SCHEPERS et al., 2002).

O *Sry* é um locus do cromossomo Y, *Sox3* está localizada no cromossomo X e os outros genes *Sox* são constituintes dos cromossomos autossômicos (BEHLKE et al., 1993; PRIOR e WALTER, 1996).

Estudos recentes têm demonstrado a participação do *Sry* também na regulação da pressão arterial (ELY e TURNER, 1990; TURNER et al., 2009; ELY et al., 2011; ELY et al., 2007; ELY et al., 2009)

Ely et al. (2007) e Ely et al. (2009), observaram que ratos SHR (*spontaneously hypertensive rat*) machos possuem cerca de 20 a 25 mmHg acima dos valores de pressão arterial das fêmeas SHR, e os mesmos autores demonstraram que estes animais apresentam maior expressão de *Sry* no rim e na adrenal. Em 2007, Ely a partir de estudos de eletroporação de vetores de expressão de *Sry* na glândula adrenal de ratos normotensos demonstraram claramente a participação do *Sry* no aumento da pressão arterial.

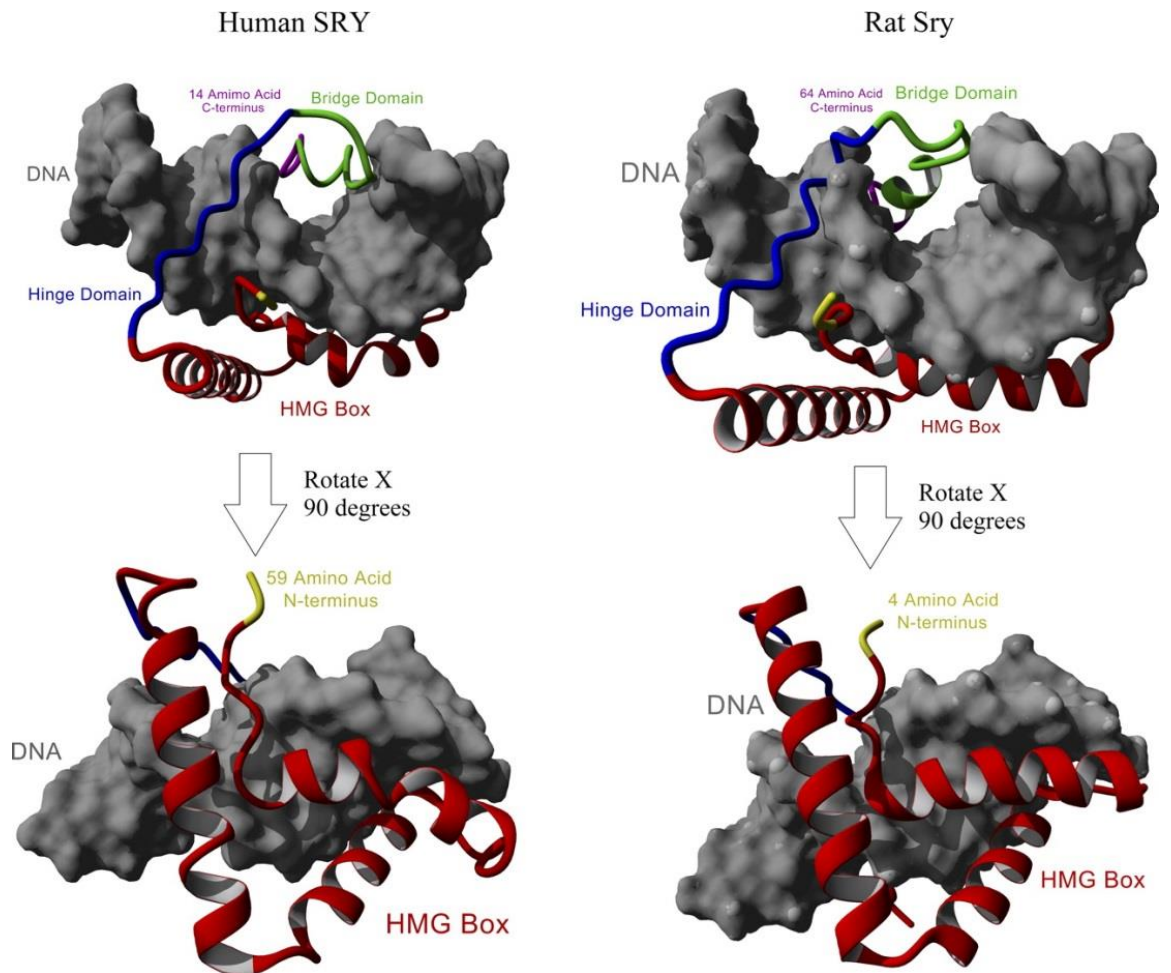
Turner et al. em 2009, demonstraram que o gene *Sry* de rato é constituído de vários *loci*, dependendo das espécies de mamíferos. Dentre estes *loci*, identificou-se o locus *Sry1* como sendo responsável pelo aumento da

transcrição da tirosina hidroxilase, pelo aumento da biossíntese de catecolaminas e pela consequente elevação da pressão arterial proveniente de hiperatividade do SNS em ratos (Ely et al., 2009). O locus *Sry 2* não tem atuação sobre a pressão arterial verificada até o momento e o *Sry3* aumenta a concentração plasmática de renina e angiotensina II com reabsorção renal de sódio, mas não altera as atividades do SNS (Ely et al., 2009).

Outros *loci* de *Srys* são expressos diferenciadamente, em vários tecidos e órgãos de ratos SHR, Wistar Kyoto (WKY), SD e Charles River, entretanto, suas funções não foram ainda descritas (Turner et al., 2009).

Em 2012, Prokop et al. relataram que o homem possui apenas uma cópia do *Sry* e a partir de estudos de sequenciamento e modelamento proteico, mostraram que esta cópia humana apresenta características semelhantes às cópias *Sry1* e *Sry3* do rato (Figura 4). Turner et al. (2011), demonstraram que o *Sry* é expresso em vários tecidos de mamíferos (Tabela 1).

No entanto, ainda não existem estudos fisiológicos que comprovem esta atividade do *Sry* humano.



**Figura 4.** Modelo apresentando a proteína Sry humana e de rato ligada ao DNA. Vermelho - alta mobilidade caixa de grupo (HMG); azul - domínio dobradiça; verde - domínio ponte; amarelo - NH<sub>2</sub> terminal, rosa - COOH terminal; e cinza - DNA. Ambos os terminais NH<sub>2</sub> e COOH são clivadas pela simplicidade, mas são rotulados para o comprimento total. Uma hélice no domínio ponte (verde) foi previsto no Sry de rato (direito), mas não é visualizado no Sry humano (à esquerda). Turner et al. (2011).

**Tabela 1.** Expressão de *Sry* em tecidos de mamíferos e formas de detecção.

Tissue	Source (A, F)	Detection Method
Adrenal gland	rat (A) human (F)	real-time RT-PCR, gel-based gel-based RT-PCR
Brain		
Amygdala	rat (A)	real-time RT-PCR
Brain	human (F)	gel-based RT-PCR
Brainstem	rat (A)	real-time RT-PCR
Cerebral cortex	rat (A)	gel-based and real-time RT-PCR
Cortex	rat (A)	in situ hybridization
Cortex	mouse (A)	gel-based RT-PCR
Diencephalon	mouse (A)	gel-based RT-PCR
Hypothalamus	rat (A)	real-time RT-PCR
Locus coeruleus	rat (A)	gel-based PCR
Medial mammillary bodies	rat (A)	in situ hybridization
Midbrain	mouse (A)	gel-based RT-PCR
Substantia nigra-	rat (A)	gel-based PCR
Substantia nigra	rat (A)	in situ hybridization (ISH)
Substantia nigra	rat (A)	immunohistochemistry (protein)
Ventral tegmental area	rat (A)	gel-based PCR
Celiac ganglion	rat (A)	real-time RT-PCR
Cultured cells		
Neonatal astrocytes	rat	real-time RT-PCR
Hep G2	human	gel-based RT-PCR
NTERA-2 cl.D1		gel-based PCR
Heart		
Aorta	rat (A)	real-time RT-PCR
Atrium	rat (A)	real-time RT-PCR
Heart	human (A)	gel-based RT-PCR
Heart	human (F)	gel-based RT-PCR
Ventricle	rat (A)	real-time RT-PCR
Kidney	rat (A)	real-time RT-PCR
	human (A)	gel-based RT-PCR
Liver	rat (A)	real-time RT-PCR
	human (A)	gel-based RT-PCR
	human (F)	gel-based RT-PCR
Pancreas	human (F)	gel-based RT-PCR
Skeletal muscle	rat (A)	real-time RT-PCR
Small intestine	human (F)	gel-based RT-PCR
Spleen	human (F)	gel-based RT-PCR
Superior cervical ganglia	rat (A)	real-time RT-PCR
Thymus	human (F)	gel-based RT-PCR
Testis	rat (A)	real-time RT-PCR
	bovine (A)	Northern blot
	mouse (A)	Northern blot, gel-based RT-PCR
	mouse (A)	Northern; nuclease protection; ISH
	human (A)	Northern blot
	human (A)	Northern; gel-based PCR
Gonadal ridge	mouse (F)	Northern; ISH; gel-based RT-PCR
Preimplantation embryo	mouse (F)	Gel-based RT-PCR
Male embryo	porcine (F)	Gel-based RT-PCR
Preimplantation embryo	human (F)	Gel-based RT-PCR

Fonte: Adaptado de Turner et al. (2011).

# JUSTIFICATIVA

---

## 2 JUSTIFICATIVA

O locus *Sry*, localizado no cromossomo Y, é evolutivamente conservado nos mamíferos e codifica a proteína Sry que é um fator de transcrição responsável pela formação gonadal e determinação sexual masculina durante o desenvolvimento embrionário (KOOPMAN, 1992; BERTA et al., 1990).

Estudos realizados em ratos nas últimas duas décadas também têm demonstrado a participação do *Sry* na regulação da pressão sanguínea (ELY e TURNER, 1990; TURNER et al., 2009; ELY et al., 2011; ELY et al., 2007; ELY et al., 2009)

Turner et al. (2007), identificaram diferentes loci de *Sry* em *Rattus norvegicus*, com diferentes funções como: diferenciação sexual masculina e participação na regulação da pressão arterial. A partir da técnica de eletroporação observou-se que o loci *Sry1* participa do aumento da pressão arterial, aumentando os índices da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) a partir do aumento da expressão de tirosina hidroxilase (TH) (ELY et al., 2007; ELY et al., 2009; MILSTED et al., 2004; CAPLEA et al., 2002); e também observou-se a partir do emprego do gene repórter da luciferase que o loci *Sry3* aumenta a reabsorção de sódio e a expressão de alguns genes da via vasoconstritora do sistema renina angiotensina (SRA) como: angiotensinogênio, ECA e renina, sem alterar a atividade do SNS (JIN et al., 2007; ELY et al., 2011).

Prokop et al. (2012), relataram que a regulação da pressão arterial mediada pelo *Sry* em humanos, pode ser parecido com o já elucidado em ratos, visto que ambas proteínas parecem funcionar de forma semelhante; e que a proteína *Sry* humana (*Sryh*) comporta-se de forma semelhante às proteínas *Sry1* e *Sry3* de rato na regulação dos promotores do RAS.

Contudo, são necessários mais estudos sobre a fisiologia do *Sryh* na regulação da pressão arterial e interação com o SRA; assim como elucidar as funções do *Sry3* em outra linhagem de *Rattus norvegicus*.

# OBJETIVOS

---

### 3 OBJETIVOS

Analisar o papel do gene *Sry* humano na regulação da pressão arterial e no sistema renina angiotensina de ratos das linhagens Sprague Dawley (SD); e avaliar em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos SD e Wistar sua interação com o sistema renina angiotensina.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca após transfecção de *Sry3* e *Sryh* em ratos SD, através da técnica de telemetria.
- Investigar, por PCR em tempo real, alterações na expressão dos genes do SRA: *angiotensinogênio*, *renina*, *receptor Mas*, *receptor AT1*, *receptor AT2*, *ECA* e *ECA2*, após a transfecção com plasmídeos contendo os genes *Sry3* (PSry3) e *Sryh* (PSryh), em cultivo de cardiomiócitos.
- Avaliar a expressão de *tirosina hidroxilase*, pela técnica de PCR em tempo real após a transfecção com P*Sry3* e P*Sryh*, em cultivo de cardiomiócitos.
- Avaliar pela técnica de siRNA a influência da inibição do mRNA de *Sry* na expressão do receptor Mas; e a influência da inibição do mRNA do receptor Mas na expressão do *Sry*, em cultivo de cardiomiócitos.
- Analisar os padrões da influência do siMas e do siSry sobre a via das MAPK quinases: ERK 1/2, JNK e p38, em cultivo de cardiomiócitos.

- Verificar através de citometria de fluxo e imunofluorescência em cultivo celular, o tamanho e a granulosidade; e a área dos cardiomiócitos, respectivamente, após transfecção com plasmídeo contendo os genes *Sryh* e *Sry3*.

# MATERIAL E MÉTODOS

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número: 44/2011.

Para avaliação do papel do *Sryh* com a regulação da pressão arterial e com os genes do SRA, foram utilizados ratos das linhagens SD e Wistar, fornecidos pelo biotério do Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG e pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG, respectivamente.

Os experimentos foram divididos em duas fases: [1] análise da regulação da pressão arterial em ratos SD pela interação do *Sry3* e *Sryh* e comparação das técnicas de eletroporação renal (Ely et al. 2007) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) para a liberação de plasmídeos contendo os genes *Sry3* e *Sryh* em ratos SD (YANG et al., 2007); [2] análise da interação do *Sryh* com os genes da SRA em cardiomiócitos de ratos SD e Wistar neonatos (três dias de vida).

Para a primeira fase deste trabalho, foram utilizados 20 ratos SD machos com 12 semanas de idade. O delineamento experimental desta fase consistiu em: [1] avaliar se o *Sry3* também aumenta a pressão arterial de ratos SD conforme demonstrado por Ely et al. (2011) em ratos Wistar Kyoto; [2] avaliar se o

*Sryh* também eleva a pressão arterial dos ratos SD; [3] comparar as técnicas de eletroporação renal de acordo com Ely et al. (2007) (n=9) e transfecção utilizando nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) (n=9) para a liberação dos plasmídeos contendo os genes *Sry3* (Sry3/pcDNA3.1(-)), *Sryh* (Sryh/pcDNA3.1(-)) e controle (pcDNA3.1(-)), produzidos na Universidade de Akron, USA (ELY et al., 2009; ELY et al., 2011); [4] avaliar a efetividade da transfecção dos NTCPM (n=2) utilizando as técnicas de microscopia de luz e de transmissão; e [5] avaliar em cardiomiócitos de ratos SD neonatos (n=16) (três dias de vida) a interação do *Sryh* com o SRA.

Na segunda fase foi avaliado em cultivo de cardiomiócitos de ratos Wistar neonatos (três dias de vida) (n=72), a interação do *Sryh* e *Sry3* com: o SRA, os efeitos cronotrópicos e morfológicos cardíacos.

## 4.2 AVALIAÇÃO DO *SRY3* E *SRYH* NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E NA INTERAÇÃO COM O SRA DE RATOS SD

### 4.2.1 Implante de probe de telemetria

Para registro simultâneo da pressão arterial e da frequência cardíaca foram implantados probes de telemetria (DSI modelo PA-C40, Arden Hills, MN) na aorta abdominal dos animais (n=18). A porção sensorial foi fixada à parede abdominal interna da cavidade peritoneal, segundo especificação do produtor (DSI Systems). Os animais foram deixados em recuperação por um período de 10 dias até o início dos procedimentos experimentais.

Após este período iniciou-se o registro contínuo da pressão arterial através de uma placa de conversão analógico/digital em sinais, enviados a uma placa de aquisição de dados da DSI systems conectada a um computador.

### 4.2.2 Eletroporação dos plasmídeos *Sry3* e *Sryh*

Nove animais com os probes inseridos foram submetidos à eletroporação dos plasmídeos contendo os genes para o *Sry3* (*PSry3*) de rato e o *Sry* humano (*PSryh*).

A técnica de eletroporação foi realizada de acordo com Ely et al. (2007) e foram utilizados os clones: *Sry3*/pcDNA3.1(-) (n=3); (*Sryh*/pcDNA3.1(-)) (n=3); (pcDNA3.1(-)) (n=3).

A pressão arterial dos animais foi medida simultaneamente por telemetria durante um período de 21 dias e os dados foram plotados diariamente.

Os resultados foram avaliados a cada 24 horas e considerou-se a pressão sistólica.

#### **4.2.3 Transfecção dos plasmídeos *Sry3* e *Sryh* utilizando NTCPM**

Para realização da transfecção dos clones utilizou-se nove animais com os probes implantados.

Os NTCPM conforme descrito por Ladeira et al. (2010), foram funcionalizados a partir da sonicação em ultrassom (Ultracelaner 800, Unique, Brasil) por 3 horas e em seguida foram sonicados novamente por 30 minutos com os respectivos clones.

Em seguida, canulou-se a carótida externa esquerda dos animais e administrou-se os clones funcionalizados com os NTCPM. Para cada animal foram utilizadas as seguintes concentrações: [1] 100 µg/ml de NTCPM + 50 µg de *Sry3* (*Sry3*/pcDNA3.1(-)) (n=3); [2] 100 µg/ml de NTCPM + 50 µg de *Sryh* (*Sryh*/pcDNA3.1(-)) (n=3); e [3] 100 µg/ml de NTCPM + 50 µg de vetor controle (pcDNA3.1(-)) (n=3).

Em seguida, a pressão arterial dos animais foi aferida simultaneamente por telemetria durante um período de 21 dias e os dados foram plotados diariamente.

#### 4.2.3.1 Análise da efetividade da transfecção

Para avaliar a efetividade da transfecção, foram utilizados dois animais: um transfectado com NTCPM funcionalizado com *Sry3* e um não transfectados como controle.

Após duas horas da transfecção, fragmentos de rim, coração e cérebro dos dois ratos foram coletados e fixados por imersão em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M, pH 7,2, por 24 horas, a 4°C.

Após este período, as amostras foram lavadas por três vezes (1 hora cada) com tampão fosfato a 0,05M e pH 7,2, e armazenadas a 4°C. Para microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis, infiltrados em parafina para posterior inclusão.

Posteriormente foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura, no micrótomo Reichert Jung (mod. 1140 / Autocut) e corados pelo método de Feulgen. Após a visualização de material genético extranuclear, foi realizada microscopia eletrônica de transmissão de acordo com Chiarini-Garcia e Meistrich (2008).

#### 4.2.4 Transfecção em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos SD neonatos

As culturas primárias de cardiomiócitos foram obtidas a partir de corações de ratos SD neonatos machos com até 72 horas de vida.

Para isso, os ratos foram decapitados em fluxo laminar, o tórax foi exposto e os corações removidos para uma placa de Petri contendo PBS 1X. A região ventricular dos corações foi separada da atrial e os ventrículos cortados em porções menores de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>.

Em seguida, os ventrículos foram digeridos enzimaticamente em solução contendo 0,2mg/mL de colagnase tipo II e 0,6 mg/mL de pancreatina diluídos em PBS 1X a 37°C sob agitação por 15 minutos.

Este passo foi repetido 3 vezes sendo que a cada digestão o sobrenadante foi recolhido para um tubo Falcon® contendo 3 mL de soro fetal bovino.

Após as digestões, os tubos foram centrifugados a 1000 RPM por 5 min, o sobrenadante descartado e o pellet de cada tubo ressuspensionado em 5 mL de meio de cultivo DMEM-F12 (Gibco, Estados Unidos) suplementado com 10% de soro de cavalo (Sigma-Aldrich, USA ) 5% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % de 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) a 10<sup>-2</sup>M (Sigma-Aldrich, USA) e 1% de penicilina 10.000UI e streptomicina 10mg/ml (Sigma-Aldrich, USA).

Uma nova centrifugação foi feita, as células foram ressuspensionadas em novo meio de cultivo e plaqueadas em garrafas de cultivo, as quais foram

mantidas em estufa incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora para aderência preferencial de fibroblastos. Em seguida, as células foram replaqueadas em novas garrafas e após 48 horas os cardiomiócitos apresentaram contratilidade característica deste tipo celular.

As células foram utilizadas para experimentos após 120 horas de incubação em estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Cada grupo experimental foi mantido em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com cerca de 70% de confluência e mantidas em 4 ml de meio DMEM-F12 (Gibco, Estados Unidos) suplementado.

Foram utilizados três grupos: vetor controle (pcDNA3.1(-))5 (n=5), Sry3 (Sry3/pcDNA3.1(-))5 (n=5) e Sryh (Sryh/pcDNA3.1(-))5 (n=5). Para análise da viabilidade celular, foi realizado o teste resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) em células transfectadas com NTCPM, plasmídios e NTCPM + plasmídios.

Em seguida, as células de cada n do grupo foram transfectadas com 50 ng do clone contendo o gene complexados a 0,0250 mg ml<sup>-1</sup> NTCPM de acordo com Ladeira et al. (2010).

Aproximadamente 48 horas após a transfecção, coletaram-se as amostras para análise da expressão dos genes: *Sry*, *renina*, *angiotensinogênio*, *ECA*, *ECA2*, *MAS*, *AT1* e *AT2*. Nas células tratadas como o Sryh também foi avaliado a expressão do gene para tirosina hidroxilase (TH) (Tabela 1) para confirmar se o Sryh também possui similaridade com o *Sry1* do rato.

#### 4.2.4.1 Extração de RNA e análise da expressão gênica

Para a extração de RNA total utilizou-se o reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA-USA) seguindo o protocolo do fabricante.

O RNA total foi quantificado em NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), utilizando-se 2 µl de cada amostra.

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA), e requantificadas.

A reação de transcrição reversa (RT) foi feita a partir de 733 ng de RNA total em 20,4 µL de volume final de reação, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1) para RT dos transcritos alvos.

O RNA total foi inicialmente desnaturado a 70°C por 10 minutos juntamente com os iniciadores reversos (10 pmols cada). Em seguida incubados com MMLV Reverse Transcriptase em tampão (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), 2 µL de dNTP mix (10 mM de cada) e água livre de RNase para completar o volume final. A reação foi incubada a 45°C por 1 hora, finalizada a 4°C e utilizada imediatamente para a PCR. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen™ (Life Technologies, Carlsbad, CA-USA).

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real realizada no equipamento de Sistema de PCR em tempo real ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied

Biosystems, USA), utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

As amostras foram aplicadas em placas de 384 poços (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em triplicata, em um volume final de reação de 10  $\mu\text{L}$ . Em cada poço foram pipetados 0,8  $\mu\text{L}$  de amostra, e adicionado posteriormente 9,8  $\mu\text{L}$  do Mix contendo 15  $\mu\text{L}$  do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 0,06  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (senso e anti-senso – Tabela 1) (10 pmols) e 4,08  $\mu\text{L}$  de água estéril filtrada . A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem foi realizada a curva de melting a 60°C por 1 minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar da especificidade dos fragmentos amplificados.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese e amplificação do cDNA.

Oligonucleotídeo	Senso	Anti-senso
Sry	5'GCGCCCCATGAATGCAT3'	5'TGGGATTCTGTTGAGCCAACT3'
Renina	5'CCACCTTCATCCGCAAGTTC3'	5'TGCGATTGTTATGCCGGTC3'
ECA	5'CTCTGCTAAGCAACATGAGC3'	5'TGTTGGTGAGCTCTGGGTC3'
ECA2	5'CAAAGTTCACCTTGCTTCTTGG3'	5'TCATAAAAGGCAGACCATTGG3'
Angiotensinogênio	5'GACGTGACCCTGAGCAGTCC3'	5'TGAGTCCCGCTCGTAGATGG3'
Mas	5'CCGAGAGGAGAGATGCTCATG3'	5'CCCACCCATTCCCATAGTGC3'
At1	5'ATGGCTGGCATTGTTGTCTGG3'	5'GTTGAGTTGGTCTCAGACAC3'
At2	5'ACTGGCACCAATGAGTCCG3'	5'CTTATCTGCCGGTTTGTGTGAG3'
TH	5'TCCCAGGACATTGGACTTGC3'	5'ACCAGTACACCGTGGAGAGT3'
S26	5'CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT3'	5'CGATTCCTGACAACCTTGCTATG3.

### 4.3 INTERAÇÃO DOS GENES SRY3 E SRYH E O SRA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS WISTAR NEONATOS E ANÁLISE MORFOFUNCIONAL PÓS TRANSFEÇÃO E INIBIÇÃO DO SRY

#### 4.3.1 Transfecção, extração de RNA e análise da expressão gênica em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar neonatos

Foram utilizados 72 animais e os procedimentos para o cultivo dos cardiomiócitos; e extração do RNA total e análise da expressão gênica foram realizados de acordo com os tópicos: 4.2.4, 4.2.4.1, respectivamente.

#### 4.3.2 Efeito inibitório do siSry e siMAS

Para os estudos de siRNA, potenciais sítios alvo dentro do gene *Sry* (NCBI: NM\_012772.1) e do receptor *Mas* (NCBI: NM\_012757.2) do *Rattus Novergicus*, foram selecionados.

Posteriormente, avaliou-se a especificidade de cada gene no NCBI Blast, sendo que os oligonucleotídeos desenhados para o gene *Sry* possui homologia para todos os *loci* do locus *Sry* de *Rattus Novergicus*.

Para a síntese dos siRNAs utilizou-se o kit Silencer® Select siRNAs (Ambion Inc., Austin, TX), utilizando os seguintes oligonucleotídeos: Sry senso 5'AAGTGCCACAGAGGAGTTATACCTGTCTC3', Sry anti senso

5'AATATAACTCCTCTGTGGCACCCCTGTCTC3', Mas senso 5'  
AAGCCATGAATACCTCCAGCACCTGTCTC e Mas anti senso 5'  
AATGCTGGAGGTATTCATGGCCCTGTCTC3'.

Em seguida, os siRNAs sintetizados foram transfectados em cultivo de cardiomiócitos, conforme descrito por Ladeira et al. (2010), sendo, resumidamente, 100 nM de siRNA funcionalizados com 0,025mg/mL de NTCPM.

Após o silenciamento, foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real a expressão dos genes *Sry* e do receptor *Mas*, e também foi avaliada a partir do Western blot a expressão das proteínas do receptor MAS, ERK 1-2, p38 e JNK.

#### 4.3.2 Extração de proteínas e expressão proteica

A técnica de *Western Blot* foi utilizada para determinar a influência da inibição dos genes *Mas* e *Sry*, e superexpressão do *Sry* na regulação das vias das MAP quinases: ERK 1/2, JNK e p38, bem como verificar a participação do receptor *Mas* na regulação destas vias e possível interação com o *Sry*.

Para isso, foram utilizados cardiomiócitos isolados de ratos neonatos Wistar transfectados com siMAS, siSry, P*Sryh* e P*Sry3*, conforme descrito no item 4.2.4.

Após o período de transfecção (48 horas) 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 Na<sub>2</sub> EDTA, 5mM de EGTA, 10mM de Hepes, 40µl/ml de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 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 50 µg de proteína total de cardiomiócitos. 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 β-mercaptoetanol, 2 g de SDS, 1mL de 1% azul de bromofenol) e todas as alíquotas foram padronizadas para um volume final de 15 µL completando o volume de cada uma com água Milli-Q, quando necessário. Depois de preparadas, as amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos. Protocolo semelhante foi feito utilizando testículo de rato Wistar como controle positivo para o receptor Mas. Neste caso, a quantidade de proteína total da amostra foi de 30 µg.

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 12% (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 1,5 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 (Tris 25mM, glicina 190mM e Metanol 20%), a qual foi mantida em aproximadamente 4°C durante todo processo 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-Erk1/2 (Cell signalling, Boston, Estados Unidos - diluição 1:500), Erk (Cell signalling, Boston, Estados Unidos - diluição 1:1000), p-P38 (Cell signalling, Boston, Estados Unidos – diluição 1:550),

P38 (Cell signalling, Boston, Estados Unidos – diluição: 1:1000) p-JNK (Cell signalling, Boston, Estados Unidos – diluição: 1:1000) 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 também pela proteína total no caso de proteína fosforilada.

### **4.3.3 Análise da frequência de batimentos e morfologia dos cardiomiócitos após o tratamento**

#### **4.3.3.1 – Análise da frequência de batimentos dos cardiomiócitos**

Após 48 horas do plaqueamento do cultivo celular, os cardiomiócitos apresentaram contratilidade característica deste tipo celular e foi realizado a transfecção com siSry. Quarenta e oito horas após o tratamento foi realizada a contagem do número de batimentos por minuto dessas células.

Para isso, seis grupos de cardiomiócitos foram definidos aleatoriamente em garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> para cada grupo de tratamento. Para contagem, utilizou-se microscópio invertido composto por uma platina aquecida, a qual foi mantida a 37°C durante todo o experimento.

O número de contrações de cada grupo de cardiomiócitos foi determinado durante 15 segundos. Utilizou-se 5 garrafas para cada grupo experimental, obtendo-se ao final, 30 grupos de cardiomiócitos por tratamento realizado. Os dados foram analisados multiplicando-se por quatro o número de contração de cada grupo de células para ter a frequência de batimento por minuto.

### 4.3.3.2 Análise morfológica dos cardiomiócitos após o tratamento

#### 4.3.3.2.1 Citometria de fluxo

Para a análise celular, verificou-se inicialmente a alteração de tamanho, granulosidade e auto fluorescência das células transfectadas com *P Sryh* e *P Sry3*, a partir da técnica de citometria de fluxo.

Como controle foram utilizadas células transfectadas com plasmídeo controle. Após 48 horas da transfecção, as células que foram tripsinizadas e a suspensão celular foi lavada uma vez com solução salina 0,9% e centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas em paraformaldeído 2% por 15 minutos, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas com solução salina 0,9% e novamente centrifugadas. Posteriormente as análises foram realizadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur BD, E.U.A.). As análises foram realizadas em gráficos pontuais ("dot blot"). Debris foram eliminados por "gate".

As aquisições foram realizadas obtendo os valores de FSC-H e SSC-H para medidas do tamanho e granulosidade, respectivamente, de 10.000 cardiomiócitos. As análises estatísticas e de histogramas foram realizadas no programa FlowJo (Three Star, Inc.).

#### 4.3.3.2.2 Análise histológica

A análise da área dos cardiomiócitos foi realizada de acordo com Araujo (2011), com algumas modificações. Resumidamente: utilizou-se aproximadamente  $2,4 \times 10^5$  células por mL. Então, distribuíram-se 2 mL do meio contendo as células, em lamínulas previamente autoclavadas.

Realizou-se a transfecção do *PSryh*, *PSry3* e controle, conforme descrito no tópico 4.2.4, e após 48 horas, as lamínulas foram transferidas para lâminas e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina.

Posteriormente as lâminas foram fotografadas no aumento de 40 vezes por uma microcâmera Olympus e transferidas para um analisador (Image Pro Plus, versão 6). Em seguida, as células tiveram sua área medida e calculada pelo programa Image J. Foram analisadas 10 lâminas e foram contadas 10 células por lâmina.

#### 4.3.3.2.3 Método Imunofluorescência

Para confirmação dos dados obtidos no item anterior, utilizou-se a técnica de imunofluorescência.

Os cardiomiócitos foram plaqueados em lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina (Sigma, Estados Unidos) e mantidas a 37°C em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%.

Após 48 horas, as células foram transfectadas com nanotubos contendo siMas, siSry e plasmídeos: controle, *Sryh* e *Sry3*; e o meio de cultivo foi substituído no dia seguinte. Após 48 horas da transfecção, as células tiveram o meio de cultivo completamente removido, foram lavadas com PBS1X e então fixadas em formaldeído 4% diluído 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 e mantidas em solução de bloqueio contendo albumina de soro bovino (BSA) 4% em PBS 1X por 1 hora. Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas com faloidina, um composto que se liga à actina F, conjugada com o fluoróforo alexafluor488 (Invitrogen, Estados Unidos – diluição 1:80) diluída em PBS 1X contendo BSA 1%. Para isso, as lamínulas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X. Selou-se, então, cada uma 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 de fluorescência (Zeiss, Axio Vision), equipado com lente objetiva com capacidade de aumento de 40x. A quantificação da fluorescência foi feita através do *software* Zen (Zeiss, Alemanha).

Para cada grupo de tratamento foram analisadas pelo menos 30 células. Cada cardiomiócito foi analisado individualmente e sua área determinada.

#### 4.3.4 Análise estatística

Para análise dos dados de PCR em tempo real, o Teste t não pareado foi utilizado para avaliar a expressão dos transcritos dos genes alvos. Os resultados expressos foram normalizados pelo  $\Delta$ CT do gene alvo –  $\Delta$ CT do normalizador (s26) e a expressão gênica relativa foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). *One-way* ANOVA com pós teste Newman Keuls foi utilizado para avaliar os grupos.

Utilizou-se para análise dos dados pressóricos e frequência cardíaca obtidos por telemetria; frequência cardíaca em cardiomiócitos; análise dos dados obtidos no Western blot; e análise de hipertrofia dos cardiomiócitos, o teste *One-way* ANOVA com pós teste Newman Keuls.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando p foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

# RESULTADOS

---

## 5 RESULTADOS

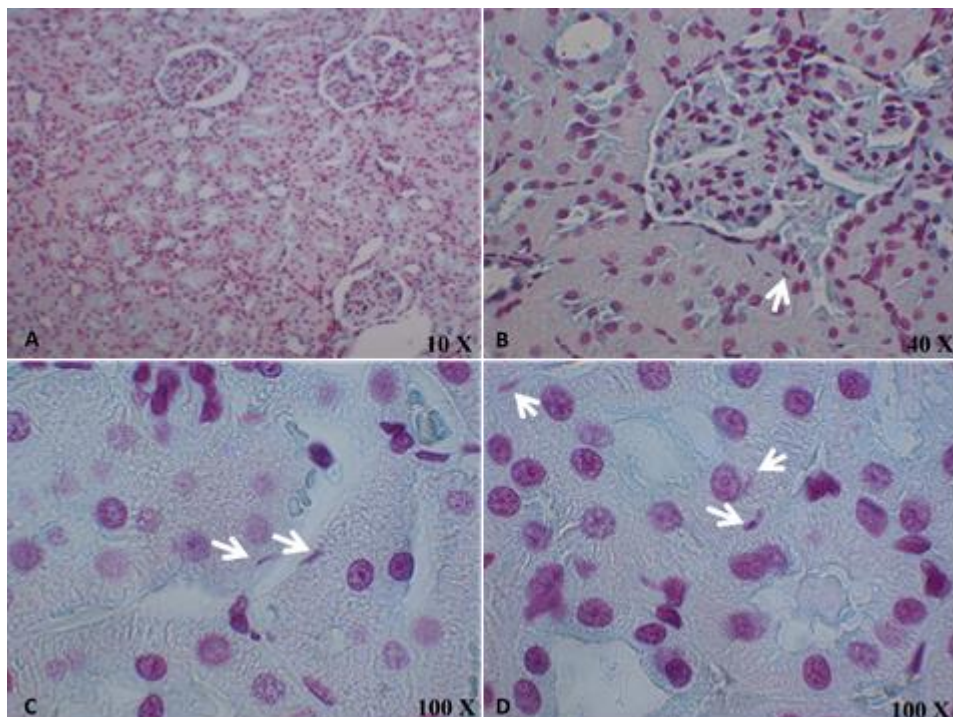
### 5.1 AVALIAÇÃO DO *SRY3* E *SRYH* NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E NA INTERAÇÃO COM O SRA DE RATOS SD

#### 5.1.1 Análise da efetividade da transfecção *in vivo*

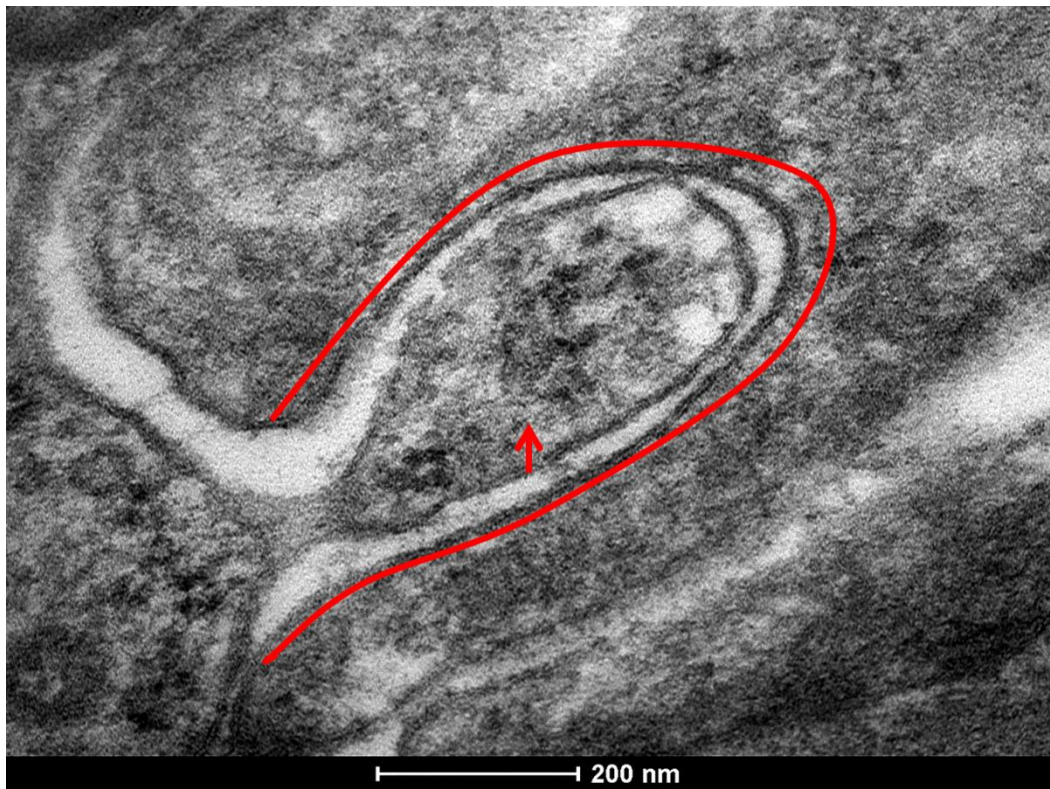
A partir dos resultados obtidos na microscopia de luz e eletrônica, foi possível verificar a efetividade da transfecção utilizando os NTCPM (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Na microscopia de luz observou-se material extracromossômico no citoplasma das células dos túbulos contorcidos proximais, indicando a efetividade da transfecção (Figura 5).

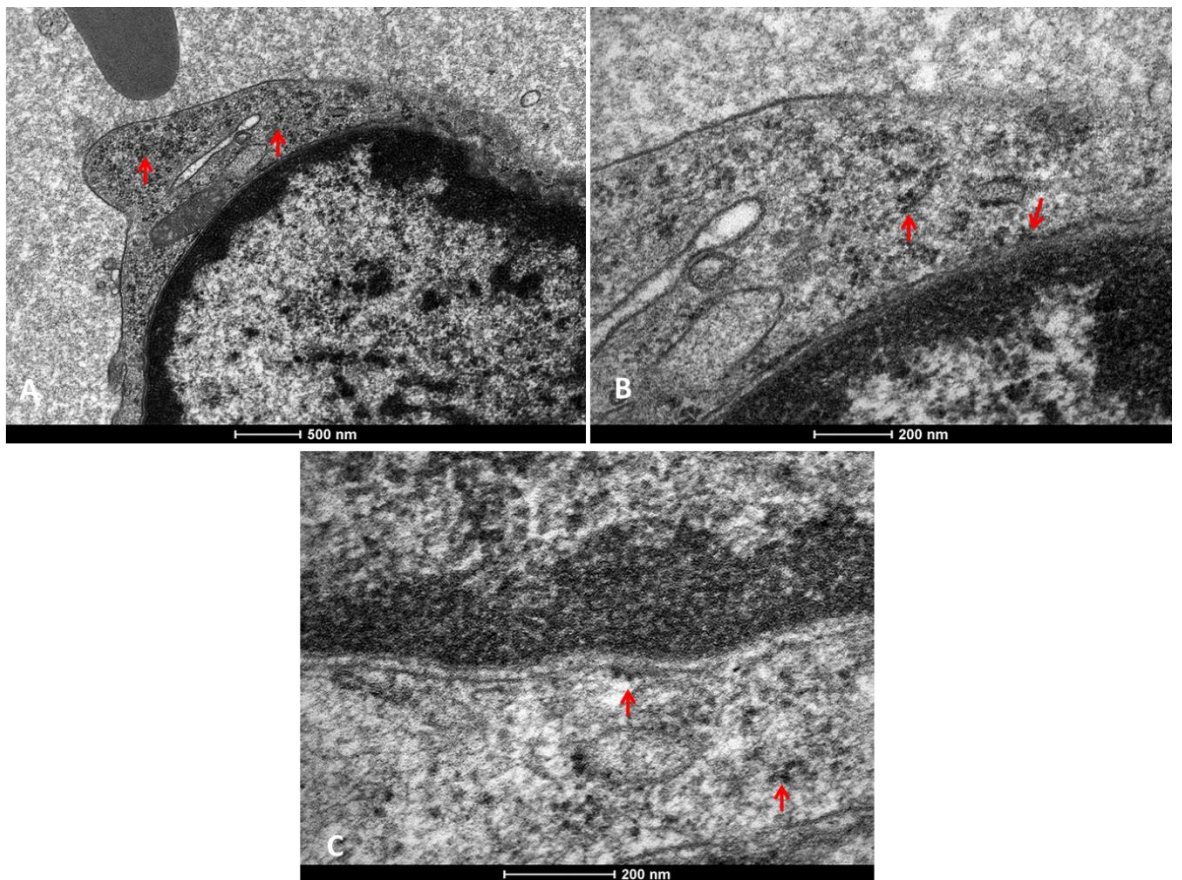
E a microscopia eletrônica de transmissão permitiu a visualização de grumos de nanotubos de carbonos sendo endocitados pelo endotélio dos capilares glomerulares (Figura 6), dentro das células epiteliais da coronária (Figura 8) e do cérebro (Figura 9 e 10).



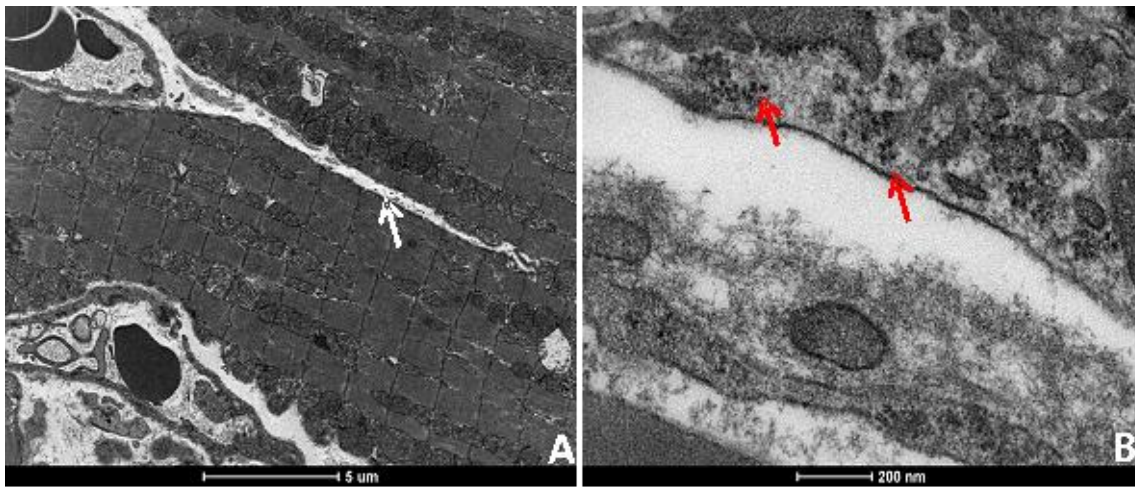
**Figura 5.** Microscopia de luz do rim de ratos SD corados por técnica citoquímica específica para DNA (reação de Feulgen), após inoculação dos NTCPM complexados com clones Sry. A. Corte de menor aumento apresentando o parênquima renal. B. Detalhes do parênquima renal (glomérulo). C e D. As setas brancas indicam presença de DNA extra cromossômico no citoplasma das células dos túbulos contorcidos proximais. A. Aumento 10X. B. Aumento 40X. C e D. Aumento 100X.



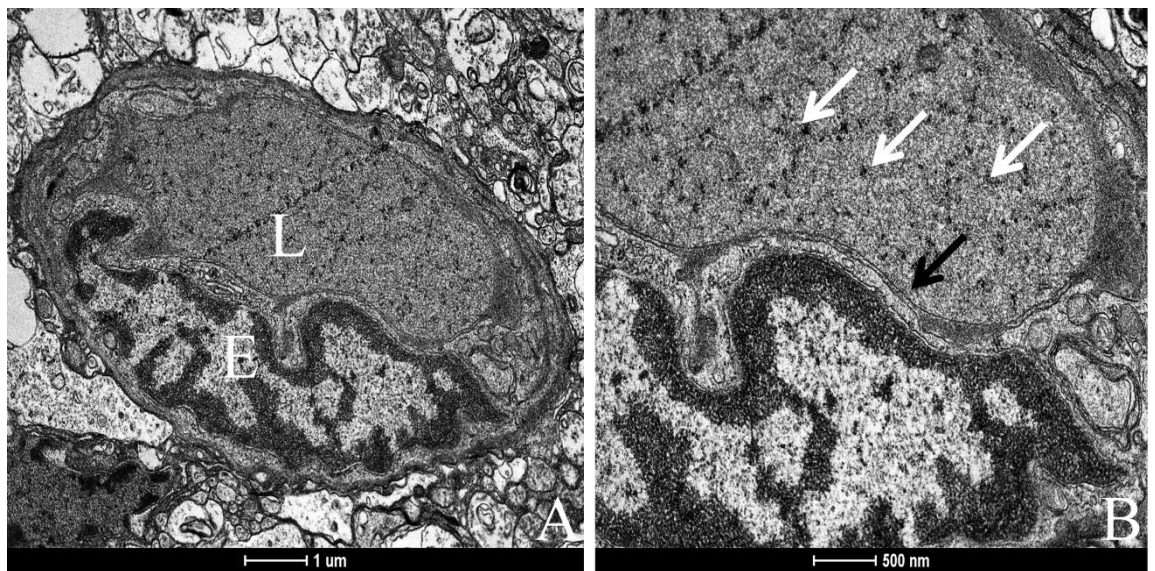
**Figura 6.** Eletromicrografia eletrônica apresentando endocitose de grumos de NTCPM no endotélios dos capilares glomerulares.



**Figura 7.** Eletromicrografias das células endoteliais do capilar glomerular. A. Apresentando pequenos grumos de NTCPM (setas vermelhas) no citoplasma. B. Eletromicrografia de maior aumento de A, as setas indicam os grumos de NTCPM. C. Maior aumento de B, apresentando os grumos de NTCPM dispersos no citoplasma e aderidos à membrana externa nuclear das células endoteliais dos vasos glomerulares.



**Figura 8.** Eletromicrografia de tecido muscular e vascular cardíaco. Em A eletromicrografia de tecido muscular cardíaco. Seta branca indica vaso coronariano. A letra B, evidencia detalhes das células epiteliais da borda do vaso coronariano. As setas vermelhas apresentam grumos de NTCPM.



**Figura 9.** A microscopia eletrônica de transmissão de cérebro de rato, apresentando unidade neurovascular. (A) com célula endotelial (E) e lume do vaso (L). Este complexo inclui células endoteliais dos microvasos (E), com sua respectiva lâmina basal (seta preta) em (B). As setas brancas em (B) apresentam grumos de (NTCPM).



**Figura 10.** A microscopia eletrônica de transmissão de cérebro de rato, apresentando detalhes do núcleo (N) da célula endotelial da unidade neurovascular e lume do vaso (L). As setas pretas apresentam lâmina basal. As setas brancas apresentam grumos de (NTCPM) dentro do lume e no citoplasma da célula endotelial.

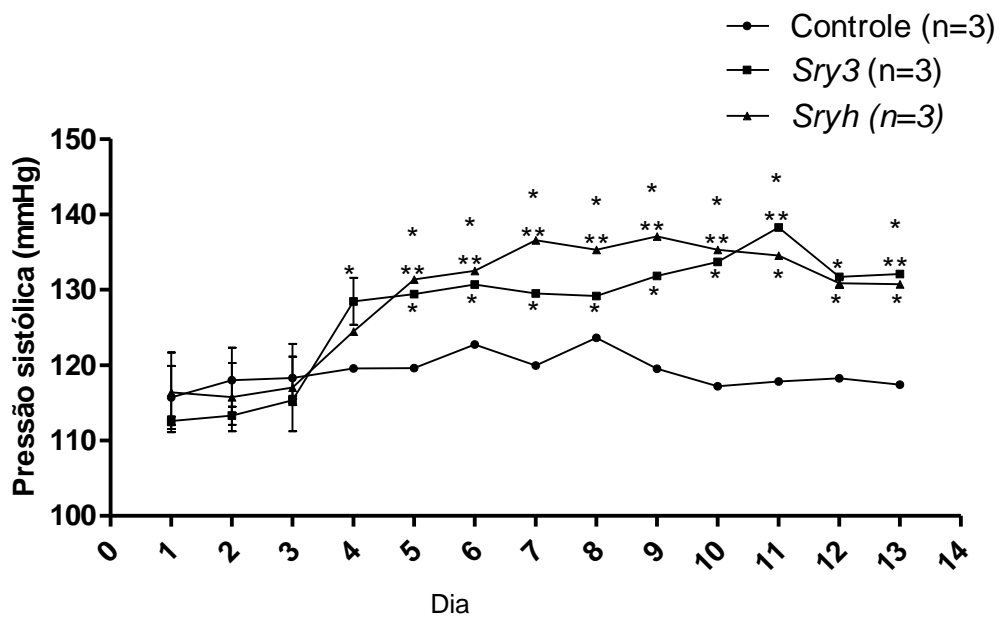
### 5.1.2 Eletroporação e transfecção de P *Sry3* e P *Sryh*

Após a eletroporação (dia três) observou-se um aumento significativo da pressão arterial, mantendo-se até o 13º dia (Figura 11), tanto para o P *Sry3* (130,89 mmHg  $\pm$  1.295 (Média  $\pm$  Erro padrão da média, respectivamente)), quanto para o P *Sryh* (132,87 mmHg  $\pm$  1.365), quando comparado ao grupo controle (119,56 mmHg  $\pm$  0.5427). No 14º dia a pressão dos animais voltou ao valor basal.

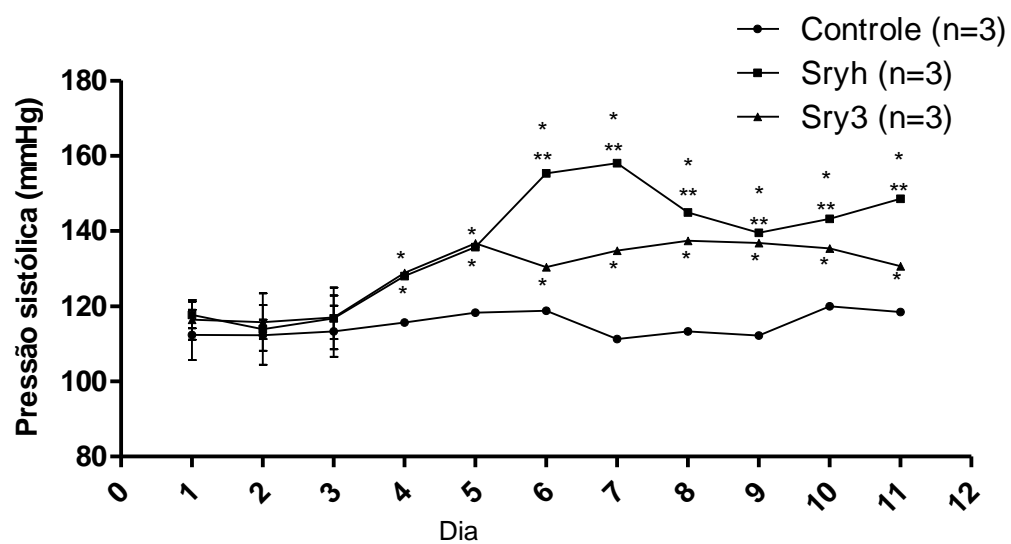
Após a transfecção (terceiro dia) de NTCM complexados com clones de *Sry3* e *Sryh*, também observou-se um aumento significativo na pressão e frequência cardíaca dos animais transfectados P *Sry3* (144,17 mmHg  $\pm$  2.801) e P *Sryh* (133,87 mmHg  $\pm$  1.610), quando comparados aos animais controle (115,99 mmHg  $\pm$  0.9550) (Figura 12 e 13). A pressão dos animais voltou ao valor basal no 12º dia.

Não houve diferença significativa entre o aumento da pressão arterial obtido entre as duas técnicas utilizadas para liberação dos clones.

A partir destes dados foi possível verificar que o *Sry* participa da regulação da pressão arterial e também possui um efeito cronotrópico positivo.



**Figura 11.** Pressão sistólica dos ratos SD após eletroporação com clones de *Sry3*, *hSry* e vetor controle. \*vs controle, \*\**Sry3* ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Pressão sistólica dos ratos SD após inoculação de NTCPM complexados com clones de *Sry3*, *hSry* e vetor controle. \*vs controle, \*\*Sry3 ( $p < 0,05$ ).

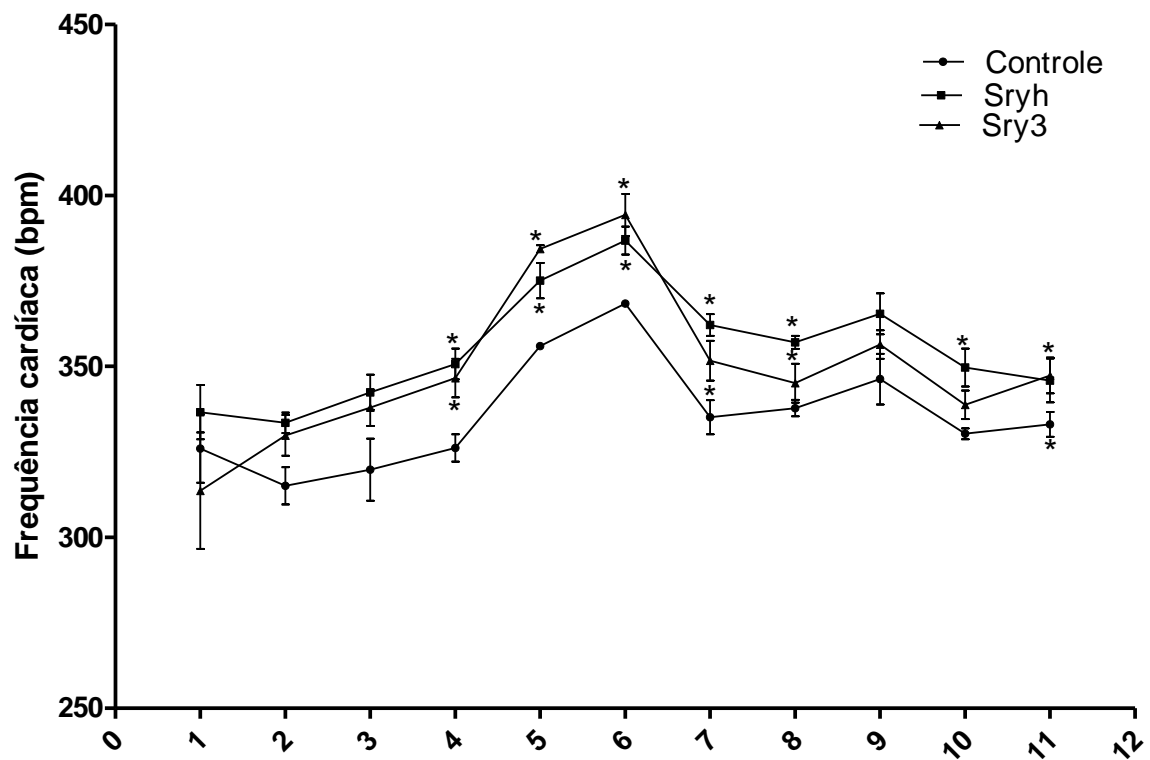
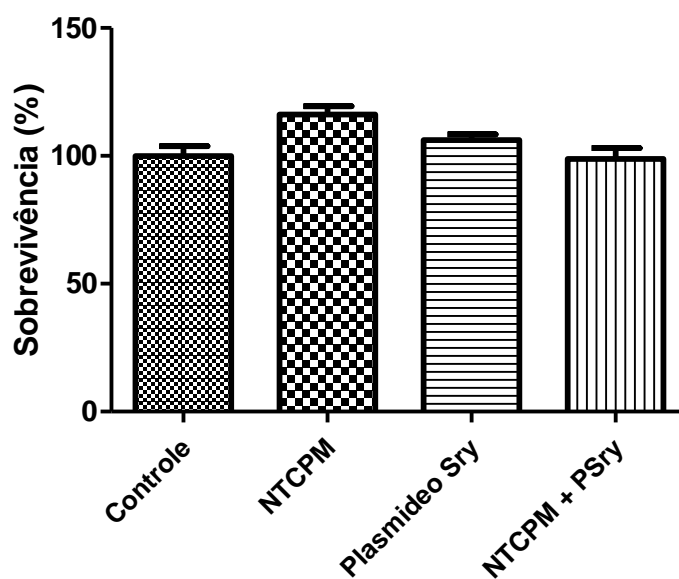


Figura 13. Análise da frequência cardíaca em ratos SD após transfecção de P*Sry3* e P*Sryh* com NTCPM. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).

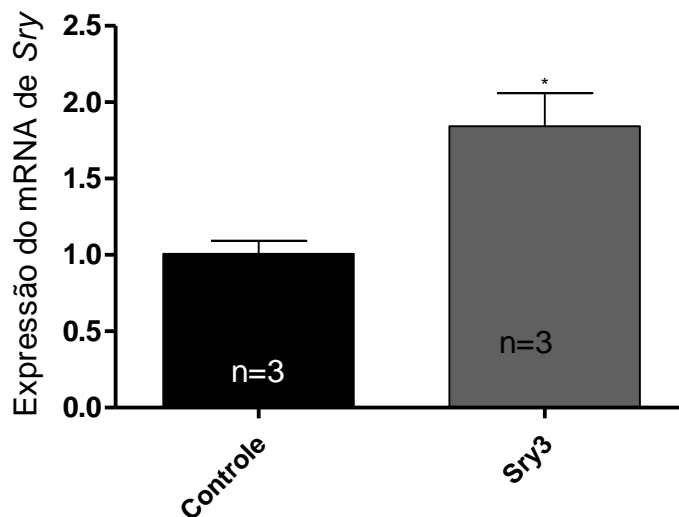
### 5.1.3 Análise da efetividade da transfecção *in vitro*

Ao avaliar a viabilidade celular, observou-se que os NTCPM, plasmídeos e associação dos dois, não apresentaram toxicidade (Figura 14).

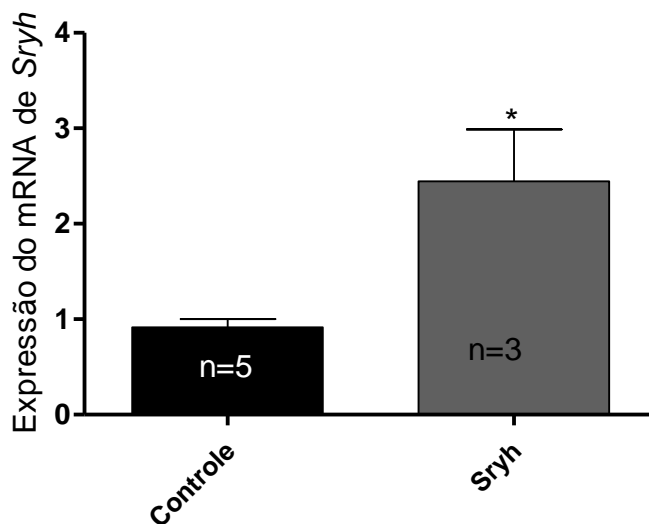


**Figura 14.** Análise da citotoxicidade dos NTCPM, do plasmídeo contendo o gene *Sryh* e dos NTCPM complexados ao plasmídeo contendo o gene *Sryh*, transfectados em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos SD.

Pela técnica de PCR em tempo real confirmou-se a efetividade da transfecção dos clones para *Sry3* e *Sryh* (Figuras 15 e 16).



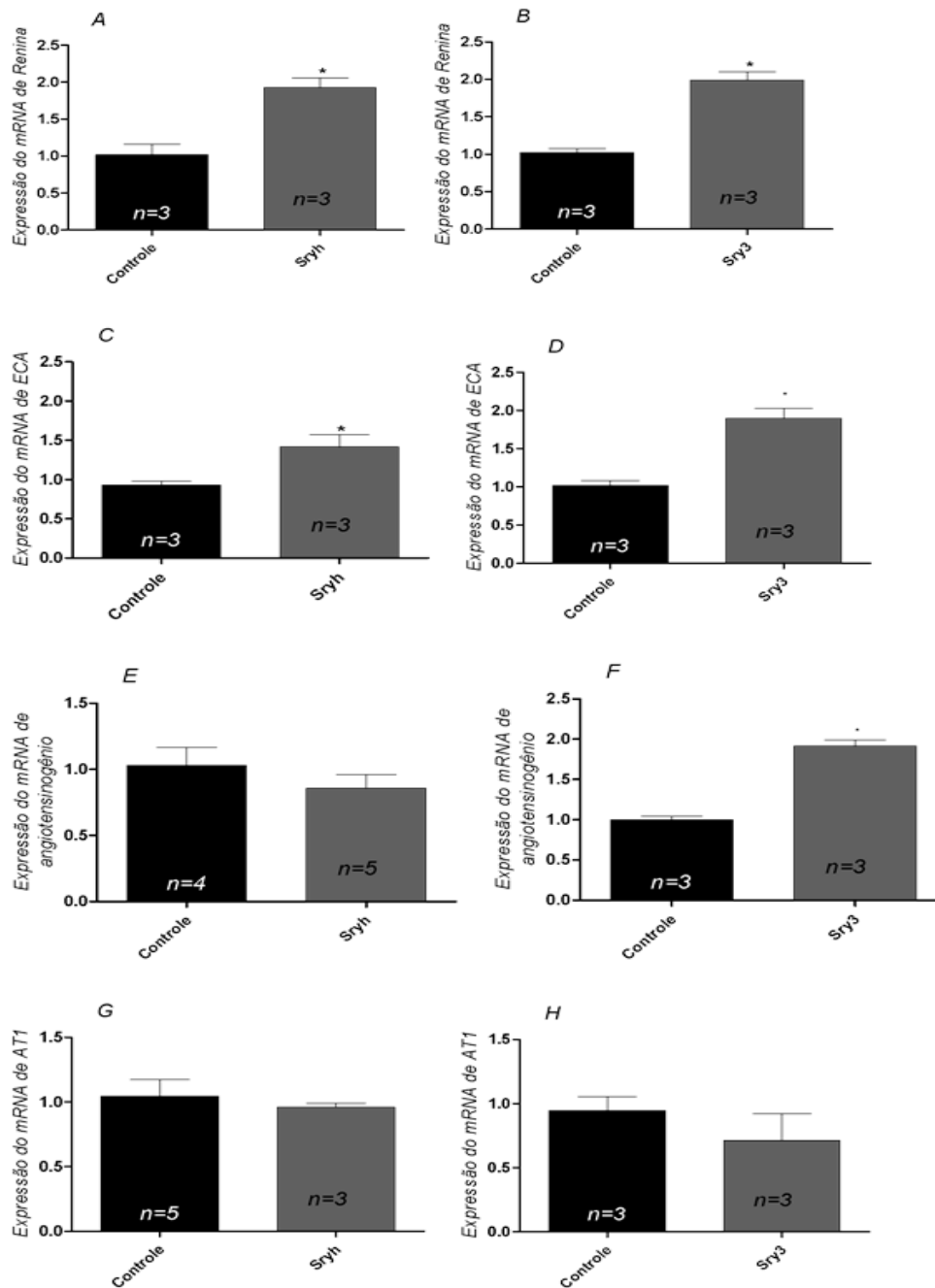
**Figura 15.** Análise da expressão de Sry em cultivo de cardiomiócitos de ratos SD após transfecção de Sry3. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16.** Análise da expressão de Sry em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos SD após transfecção de *Sryh* funcionalizados com NTCPM. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).

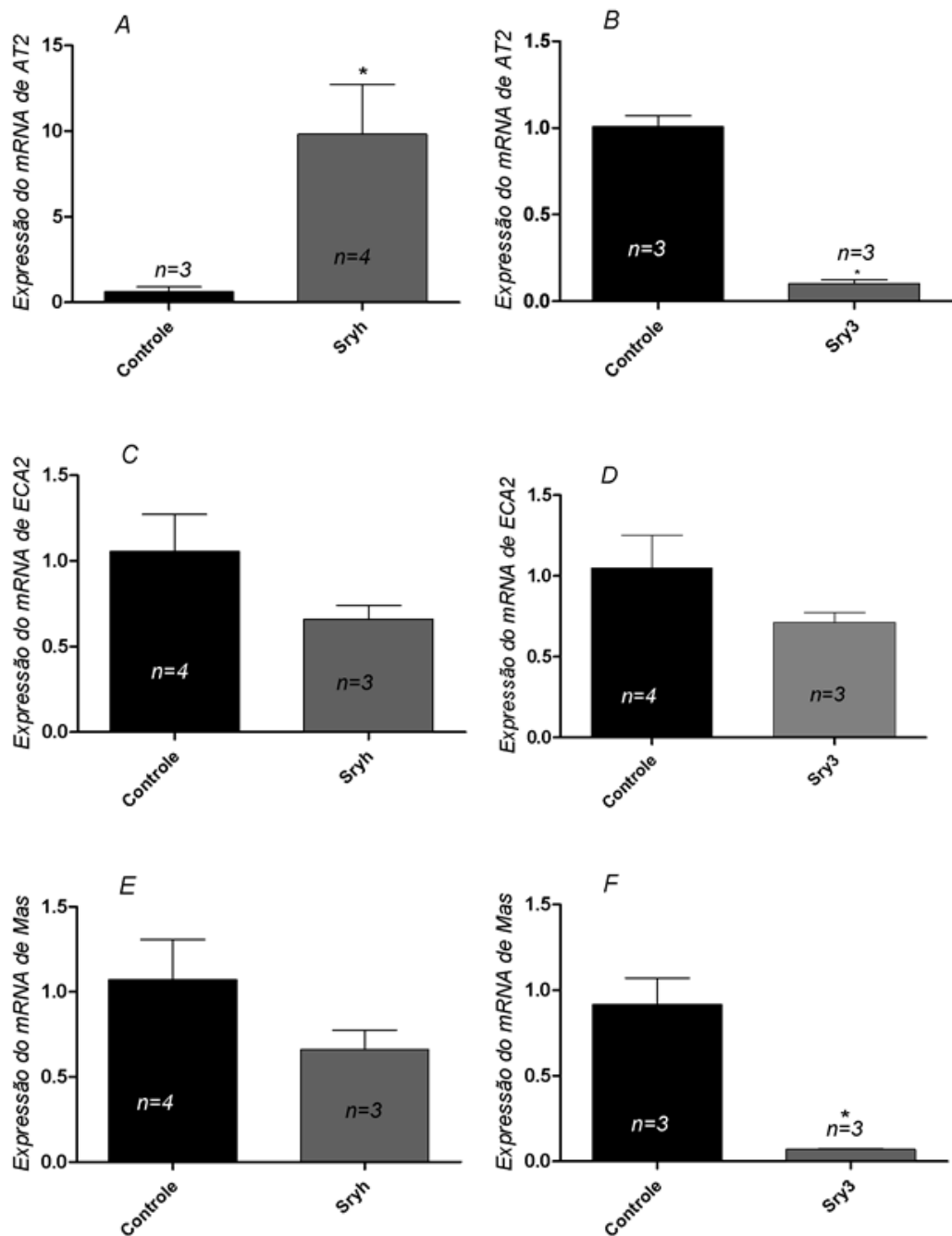
#### 5.1.4 Interação com os genes do SRA e TH

Ao avaliar a expressão dos genes da via vasoconstritora do SRA em cultivo de cardiomiócitos, após a transfecção com *Sryh* observou-se um aumento significativo da expressão dos genes: *renina* ( $p= 0,0059$ ) e *ECA* ( $p=0,0380$ ); e ao avaliar a expressão após transfecção de *Sry3*, também observou-se um aumento significativo da expressão de *renina* ( $p= 0,0014$ ), *ECA* ( $p= 0,0033$ ) e *angiotensinogênio* ( $p= 0,0004$ ); não foram encontradas alterações significativas na expressão do receptor AT1(Figura 17).



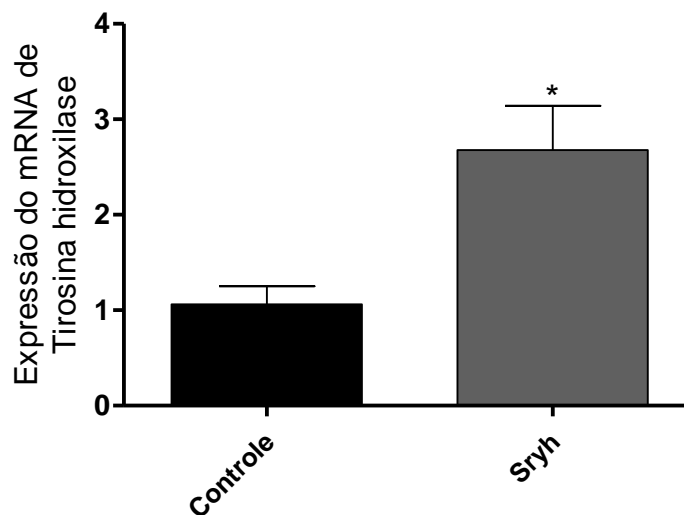
**Figura 17.** Análise da expressão dos genes relacionados à via vasoconstritora do SRA após a transfecção de *Sryh* e *Sry3* em cardiomiócitos de ratos SD. A, C, E e G - Análise da expressão dos genes *renina* ( $p=0,0059$ ), *ECA* ( $p=0,0380$ ), *angiotensinogênio* e *receptor AT1*, respectivamente, após transfecção de *Sryh*. B, D, F e H - Análise da expressão dos genes *renina* ( $p= 0,0014$ ), *ECA* ( $p= 0,0033$ ), *angiotensinogênio* ( $p= 0,0004$ ) e *receptor AT1*, respectivamente, após transfecção de *Sry3*. \*vs controle ( $p<0,05$ ).

Após a análise da expressão dos genes da via vasodilatadora, observou-se aumento significativo da expressão do *receptor AT2* ( $p=0,0440$ ) e não houve alteração significativa na expressão dos genes *ECA2* e *MAS*, após transfecção com *Sryh* (Figura 18). Após a transfecção com *Sry3*, observou-se diminuição significativa na expressão dos genes *MAS* ( $p= 0,0055$ ) e *AT2* ( $p= 0,0002$ ); não havendo alteração significativa na expressão de *ECA2* (Figura 18).



**Figura 18.** Análise da expressão dos genes relacionados à via vasodilatadora do SRA após a transfecção de *Sryh* e *Sry3* em cardiomiócitos de ratos SD. A, C e E - Análise da expressão dos genes *receptor AT2* ( $p=0,0440$ ), *ECA2* e *receptor MAS*, respectivamente, após transfecção de *Sryh*. B, D e F - Análise da expressão dos genes *receptor AT2* ( $p= 0,0002$ ), *ECA2* e *receptor MAS* ( $p=0,0055$ ), respectivamente, após transfecção de *Sry3*. \*vs controle ( $p<0,05$ ).

Ao avaliar a expressão a expressão da tirosina hidroxilase observou-se um aumento na expressão do grupo tratado com *Sryh* quando comparado ao grupo controle (Figura 19).

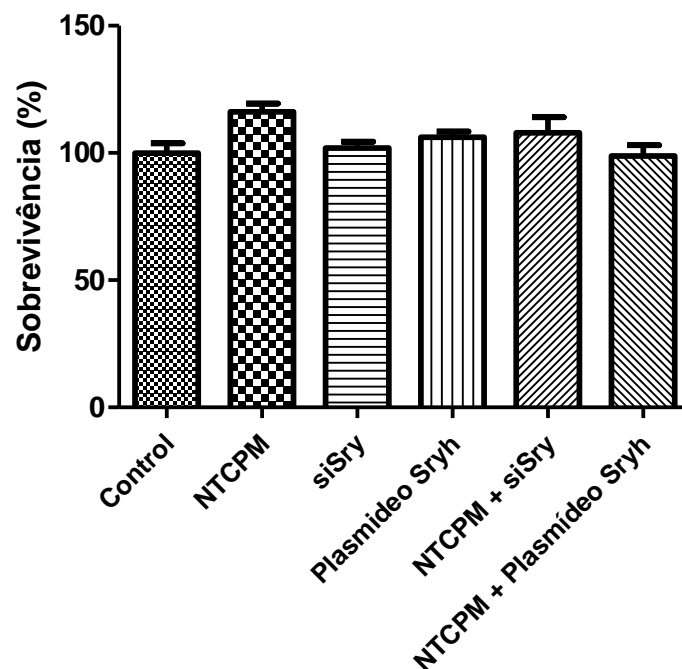


**Figura 19.** Análise da expressão de tirosina hidroxilase após transfecção com *Sryh* ( $p= 0,0102$ ).  
\*vs controle ( $p<0,05$ ).

## 5.2 ESTUDO DO PAPEL DO SRY NOS EFEITOS CARDÍACOS E INTERAÇÃO COM O SRA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS WISTAR

### 5.2.1 Análise da viabilidade celular

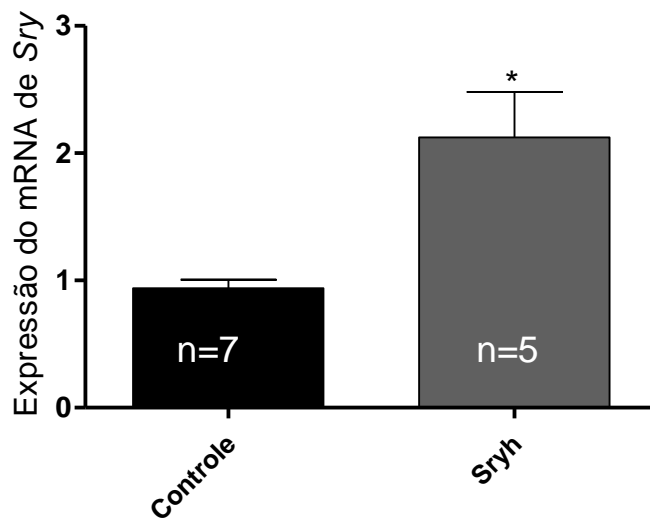
Após a análise da viabilidade celular, observou-se que os NTCPM, os plasmídeos e os siRNAs não apresentaram toxicidade aos cardiomiócitos (Figura 20).



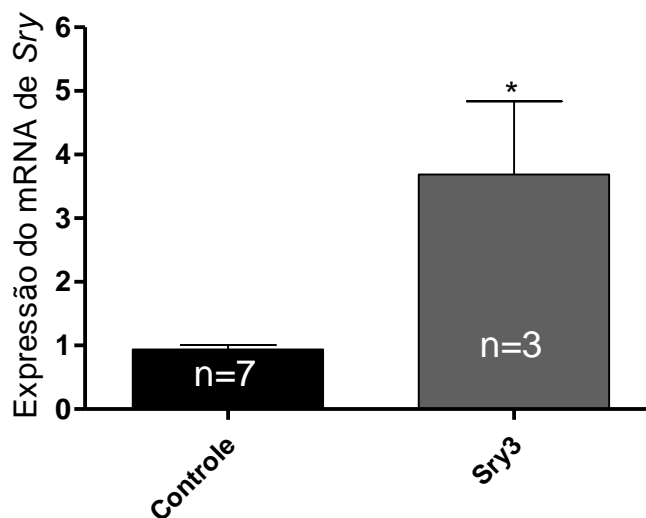
**Figura 20.** Análise da citotoxicidade dos NTCPM, siSry, plasmídeos *Sryh*, NTCPM complexados com siSry e NTCPM com plasmídeo *Sryh*, transfectados em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar.

## 5.2.2 Transfecção dos plasmídeos

A transfecção dos plasmídeos *Sryh* (n=5) e *Sry3* (n=3) foi efetiva e observou-se um aumento significativo da expressão destes genes quando comparados ao grupo controle transfectado com plasmídeo controle (n=7) (Figuras 21 e 22).



**Figura 21.** Análise da expressão de Sry em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar após transfecção de *Sryh* funcionalizados com NTCPM. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).

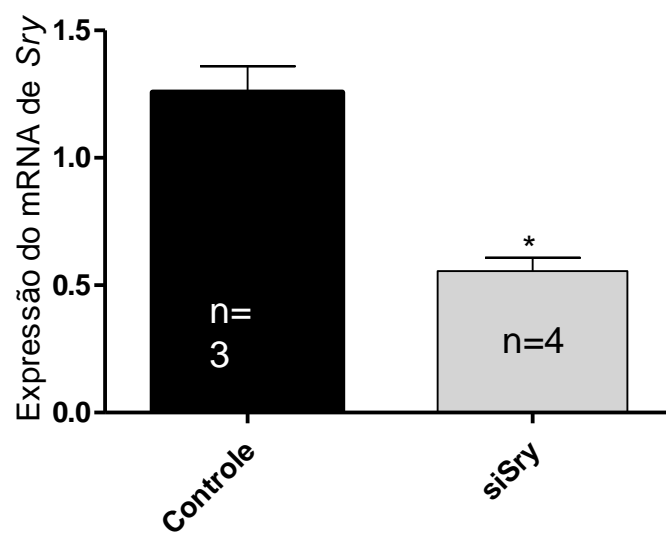


**Figura 22.** Análise da expressão de Sry em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar após transfecção de *Sryh* funcionalizados com NTCPM. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).

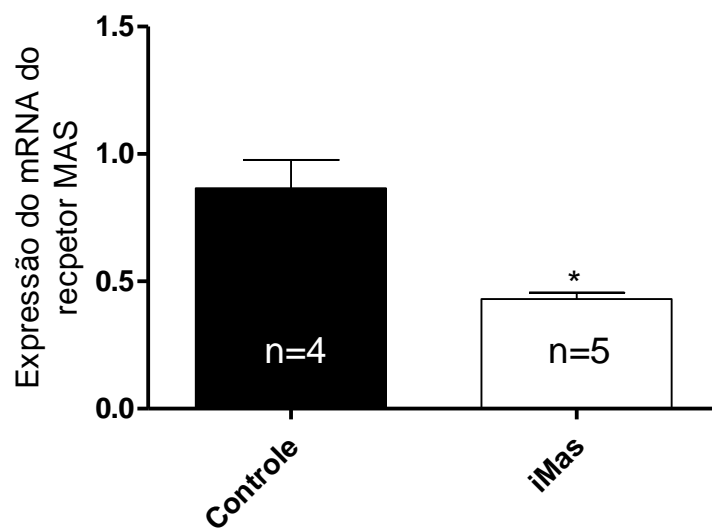
### 5.2.3 Transfecção dos siRNAs

A síntese dos siRNAs funcionou corretamente como descrito pelo *kit* utilizado.

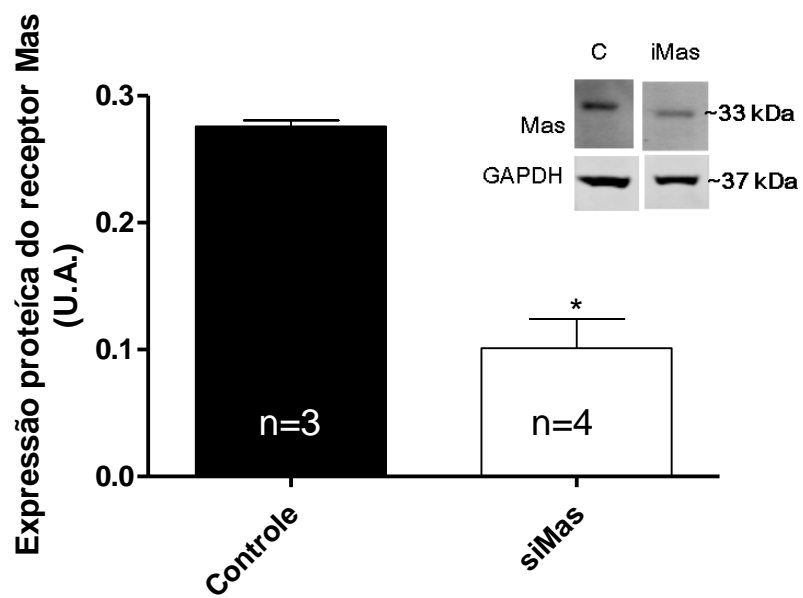
E após a transfecção dos siRNAs complexados aos NTCPM, observou-se pela técnica de PCR em tempo real, uma redução de 58,89 % ( $p = 0,0012$ ) na expressão do *Sry* (Figura 23) e 62.14% para o *receptor MAS* ( $p = 0,0038$ ) (Figura 24); e de 73,31% ( $p = 0,0071$ ) da proteína do receptor MAS pela técnica de Western blot (Figura 25).



**Figura 23.** Análise da expressão de *Sry* em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar, após o silenciamento do mRNA do *Sry*. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).



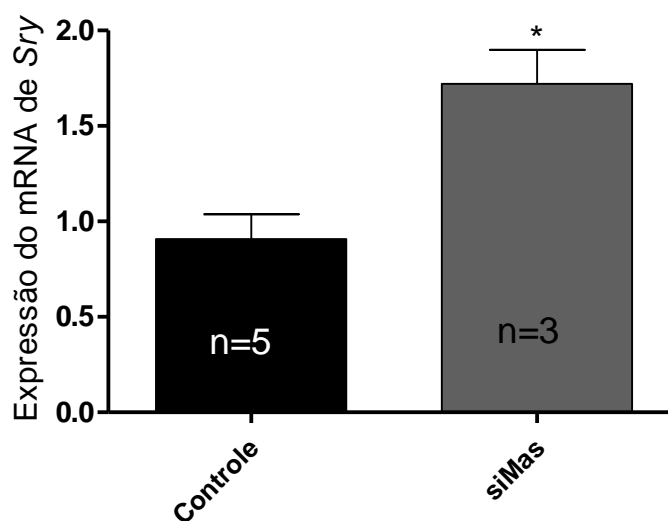
**Figura 24.** Análise da expressão do mRNA do *receptor Mas* em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar, após o silenciamento do mRNA do *receptor Mas*. \*vs controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 25.** Análise da expressão da proteína do receptor Mas em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar, após o silenciamento do mRNA do receptor Mas. \* vs controle ( $p < 0,05$ ). C – controle.

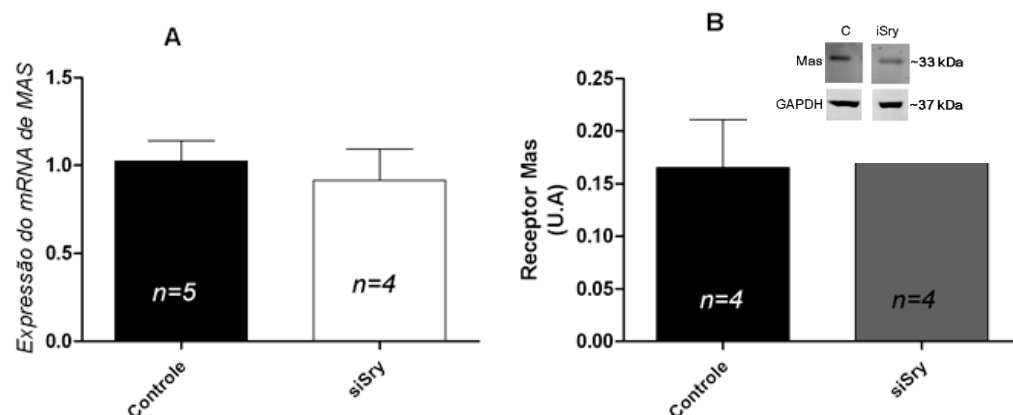
#### 5.2.4 Interação Sry/MAS

Quando silenciou-se o receptor Mas, verificou-se que houve um aumento da expressão do gene *Sry* ( $p= 0,0097$ ) (Figura 26).



**Figura 26.** Análise da expressão do *Sry* após a transfecção do siMas, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar \*vs controle ( $p<0,05$ ).

Ao analisar a expressão do receptor Mas após o silenciamento do *Sry*, observou-se que não houve alteração significativa na expressão gênica e proteica do mesmo (Figura 27).

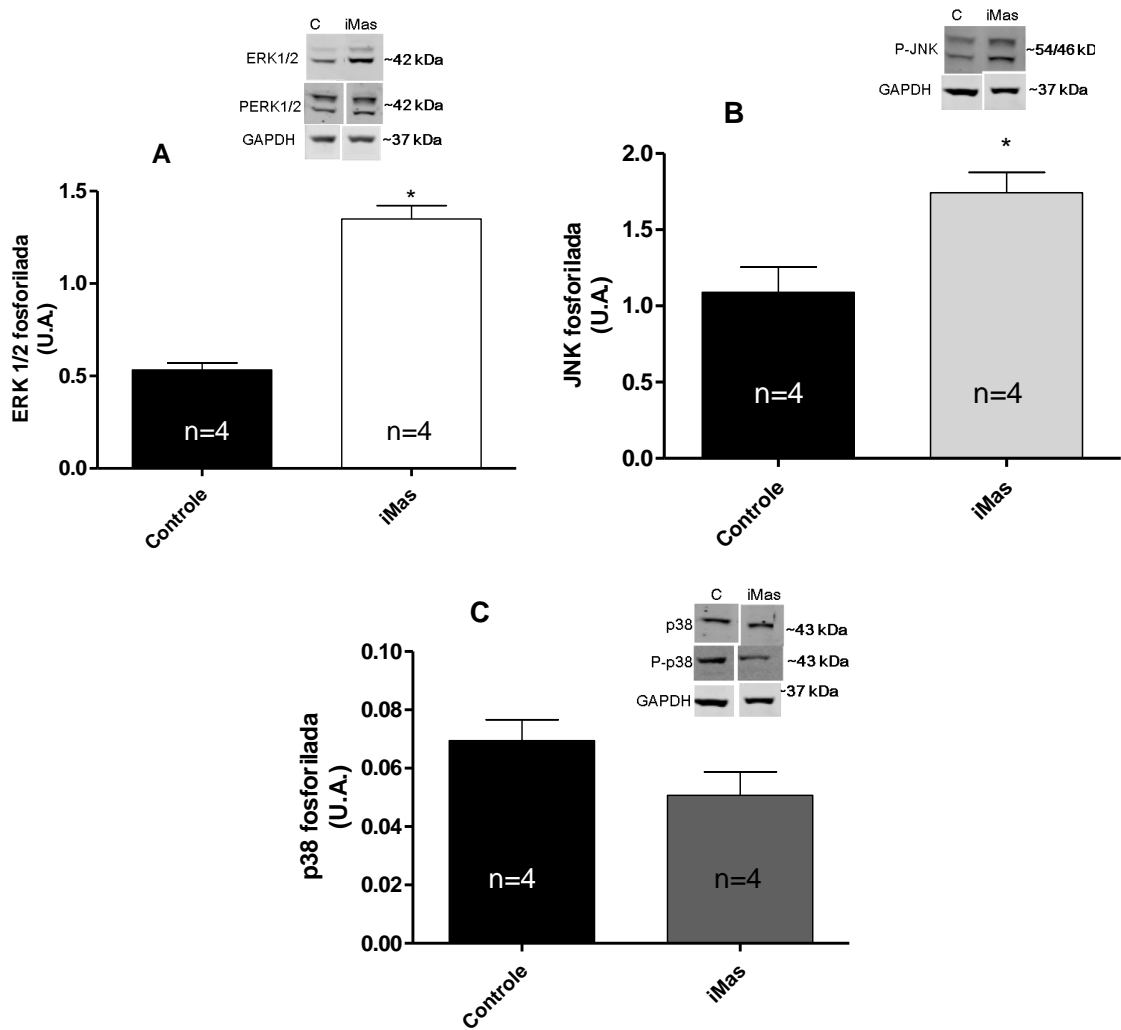


**Figura 27.** Análise da expressão do receptor Mas após a transfecção do siSry, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. A – Técnica de PCR em Tempo Real ( $p= 0,6036$ ). B. Western blot ( $p= 0,8756$ ). \*vs controle (C) ( $p<0,05$ ).

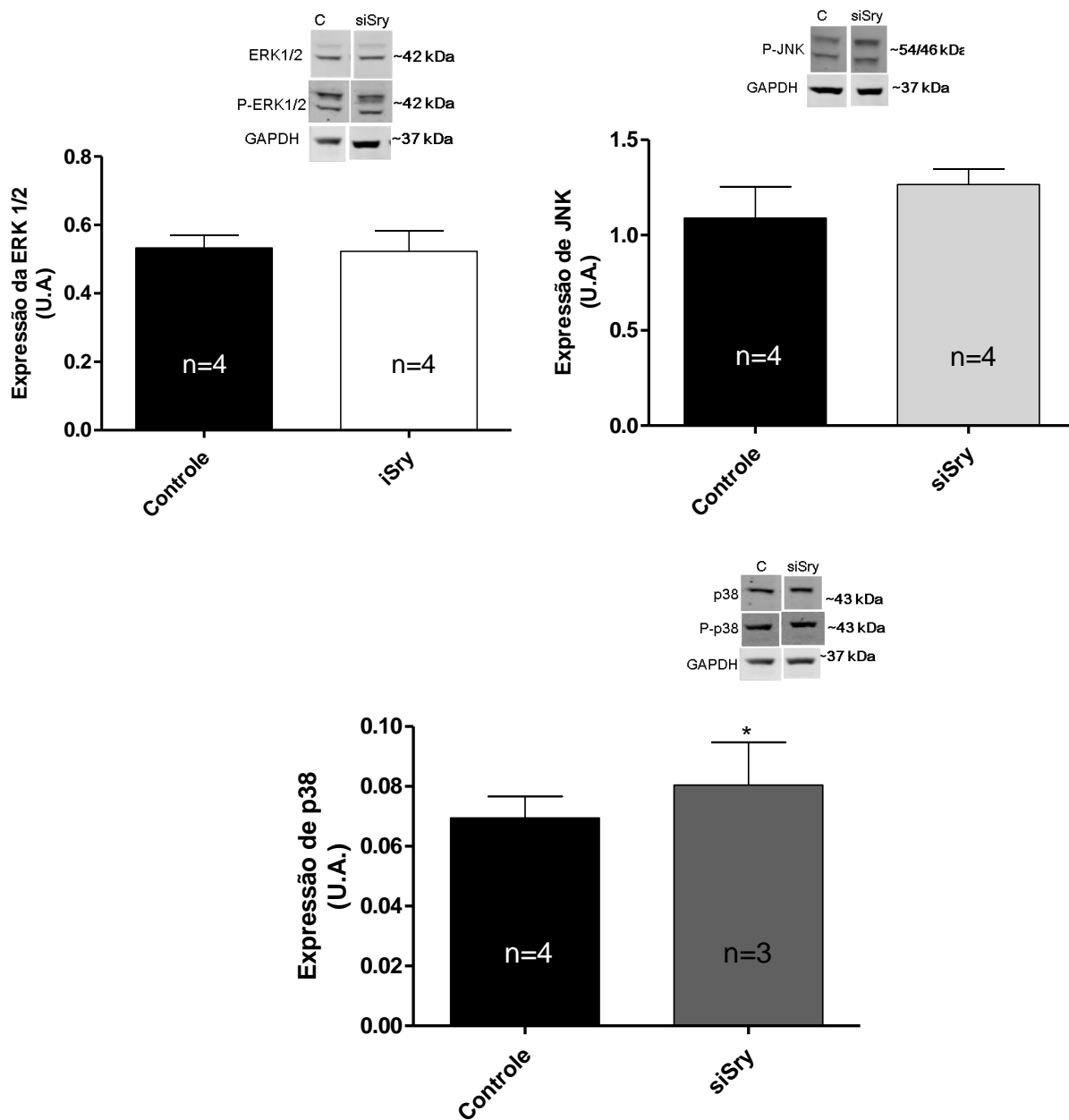
Estes dados sugerem que o *receptor Mas* regula o *Sry*. Então, foi avaliada a expressão das proteínas ERK 1/2, JNK e p38, nas células transfectadas com siMAS, siSry e plasmídeos contendo os genes *Sryh* e *Sry3*, para verificar a provável via desta regulação.

Observou-se que houve um aumento significativo da ERK1/2 ( $p= 0.0001$ ) e JNK ( $p=0,0217$ ) e não houve alteração significativa na expressão de p38 ( $p=0,1314$ ), nas células transfectadas com siMas (Figura 28).

Quando avaliado os dados relacionados à expressão das MAP quinases após o silenciamento do *Sry* verificou-se que não houve alteração significativa de ERK 1/2 e JNK, mas houve um aumento significativo de p38 ( $p= 0,0456$ ) (Figura 29).



**Figura 28.** Análise da expressão das proteínas ERK 1/2, p38 e JNK após a transfecção do siMAS, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. A – ERK 1/2 ( $p= 0.0001$ ), B - JNK ( $p=0,0217$ ) e C p38 ( $p=0,1314$ ). \*vs controle (C) ( $p<0,05$ ).

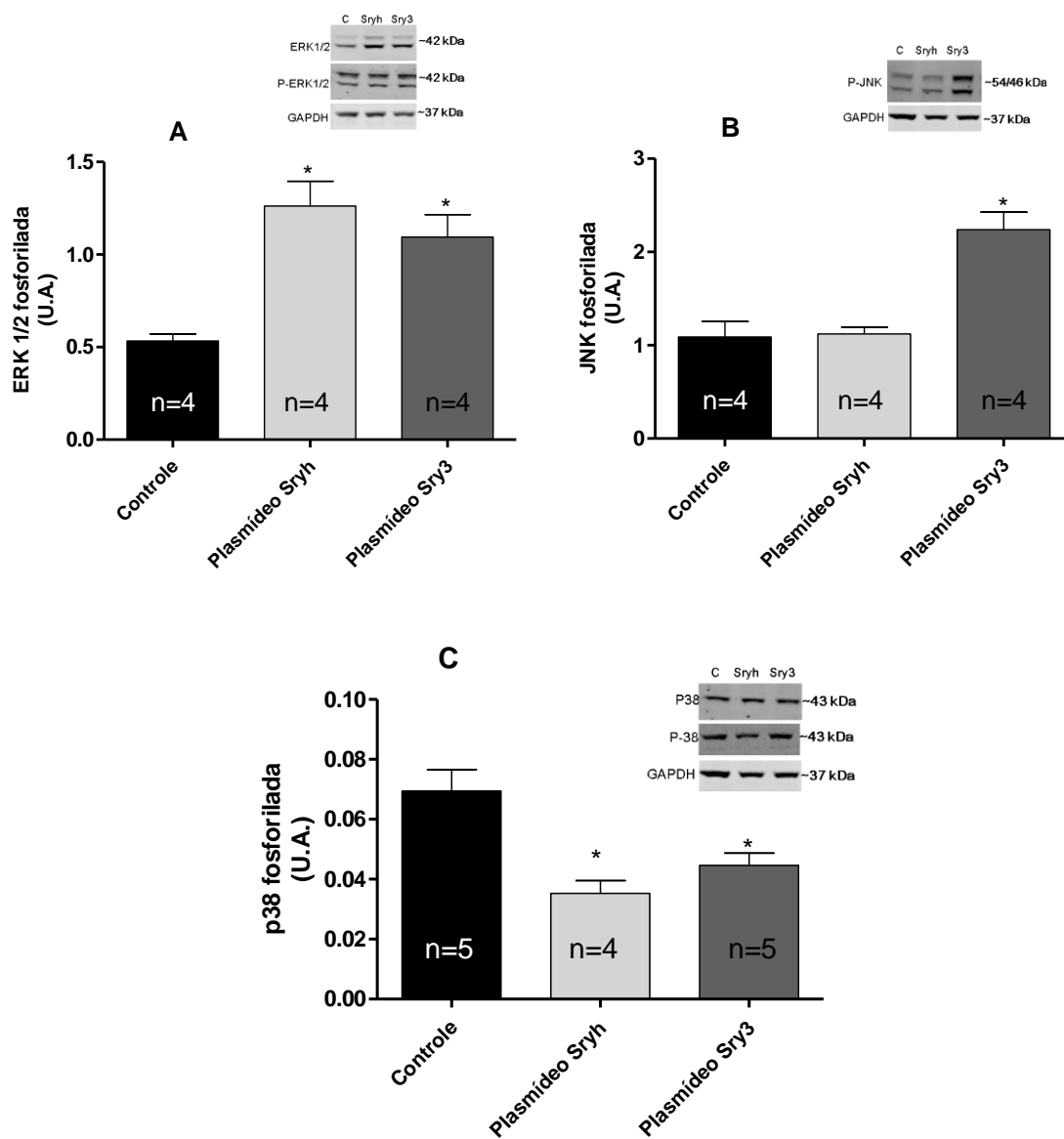


**Figura 29.** Análise da expressão das proteínas ERK 1/2, p38 e JNK após a transfecção do siSry, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. A – ERK 1/2 ( $p= 0,8904$ ), B - JNK ( $p= 0,3758$ ) e C p38 ( $p= 0,0456$ ). \*vs controle (C) ( $p<0,05$ ).

Após a transfecção do *Sryh* e *Sry3*, também verificou-se alterações fisiológicas significativas. Ocorreu um aumento da expressão da proteína ERK 1/2 quando avaliados o *Sryh* ( $p=0,0019$ ) e o *Sry3* ( $p=0,0044$ ); e da JNK quando avaliado o *Sry3* ( $p=0,0059$ ) e houve uma diminuição significativa na expressão da proteína p38 nos grupos *Sryh* ( $p= 0,0133$ ) e *Sry3* ( $p= 0,0229$ ) (Figura 30).

Estes resultados sugerem que o receptor Mas regula o *Sry* provavelmente através inibição da expressão das proteínas ERK 1/2 e JNK. E que a super expressão ou silenciamento do *Sry*, parece regular a expressão de p38 por *feedback* negativo, visto que esta proteína está relacionada à diferenciação sexual masculina e indiretamente na manutenção das características fenotípicas masculinas.

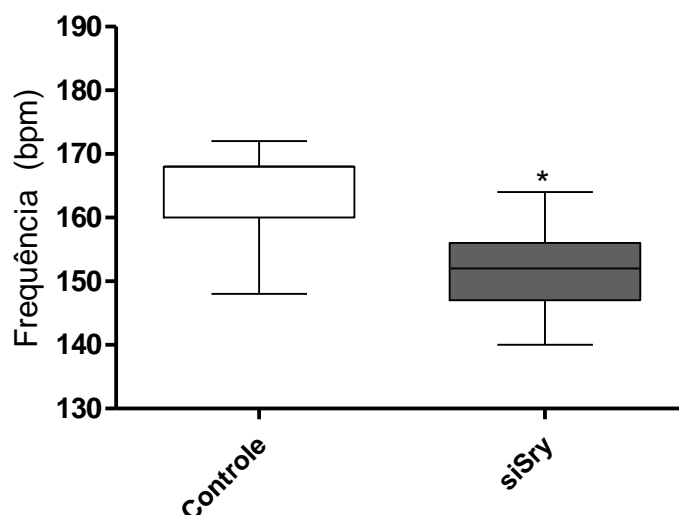
A partir dos dados obtidos, também verificou-se que a expressão de *Sry* parece estar relacionada à regulação do SRA e provavelmente das MAP quinases analisadas.



**Figura 30.** Análise da expressão das proteínas ERK 1/2, p38 e JNK após a transfecção dos P.Sryh e P.Sry3, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. A – ERK 1/2 x Sryh ( $p = 0,0019$ ) e ERK 1/2 x Sry3 ( $p = 0,8904$ ), B – JNK x Sryh ( $0,8599$ ). \*vs controle (C) ( $p < 0,05$ )

### 5.2.5 Efeitos morfofisiológicos nos cardiomiócitos e no SRA

Verificou-se após a interferência do gene *Sry*, um efeito cronotrópico negativo significativo ( $p=0.0001$ ) nos cardiomiócitos, mostrando que o *Sry* participa da regulação da frequência cardíaca (Figura 31); neste estudo também foi demonstrado *in vivo*, após a transfecção de *PSry3* e *PSry*, que o *Sry* possui atividade cronotrópica positiva sobre o coração (Figura 13).

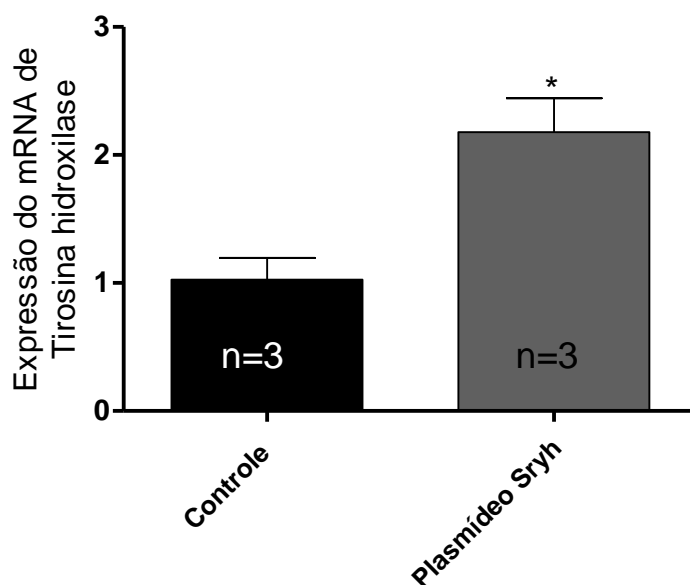


**Figura 31.** Análise da frequência de batimentos dos cardiomiócitos após a transfecção do siSry. \* vs controle ( $p<0,05$ ).

Estes dados ficam mais claros ao comparar os resultados obtidos a partir da transfecção do plasmídeo contendo o gene *Sryh*, que possui conforme descrito por Prokop et al. (2012), semelhanças bioquímicas com as cópias de *Sry1* e *Sry3* do rato.

No presente estudo, o *Sryh* também apresentou atividade na regulação da expressão de TH ( $p= 0,0212$ ) (Figura 32), conforme também já demonstrado neste estudo em ratos SD (Figura 19).

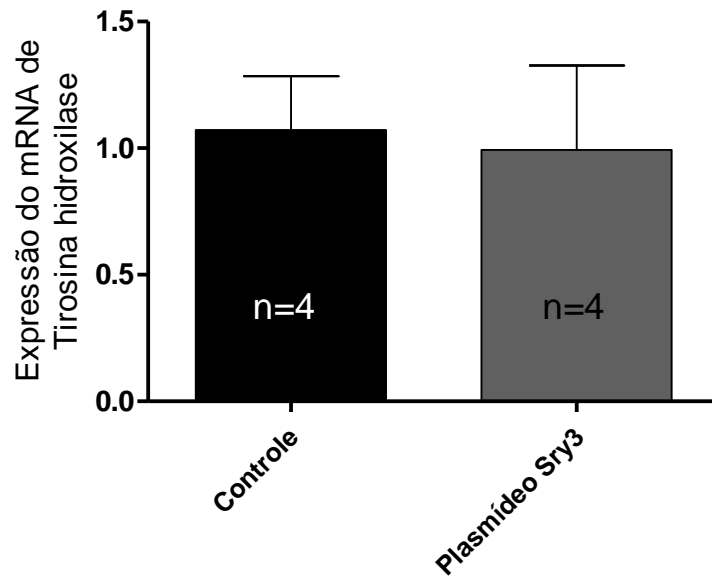
Confirmando que fisiologicamente o *Sryh* apresenta similaridade com o *Sry1* do rato e participa da regulação da via das catecolaminas que estão diretamente correlacionadas com as funções cardíacas.



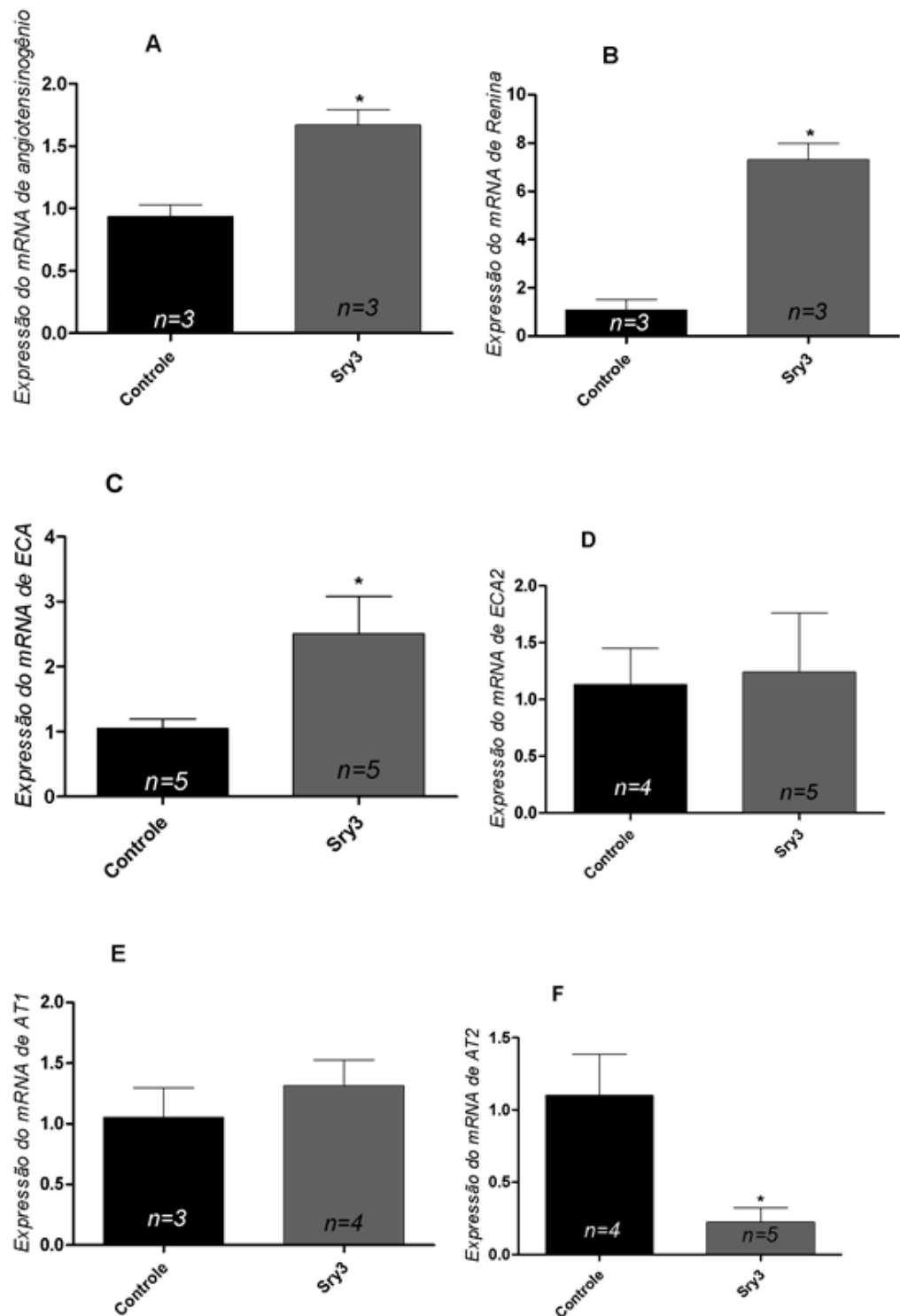
**Figura 32.** Análise da expressão de tirosina hidroxilase após a transfecção do *Sryh*, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar. \* vs controle ( $p<0,05$ ).

No entanto, o gene *Sry3* não alterou a expressão de tirosina hidroxilase ( $p= 0,8413$ ) (Figura 33), mas interagiu com alguns genes do SRA, aumentando a expressão dos genes relacionados à via vasoconstritora e diminuindo a expressão dos genes da via vasodilatadora (Figura 34), conforme também visualizado no cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos SD (Figuras 17 e 18). Estes

dados demonstram que o *Sry3*, possui atividades fisiológicas conservadas sobre o SRA nas duas linhagens estudadas.



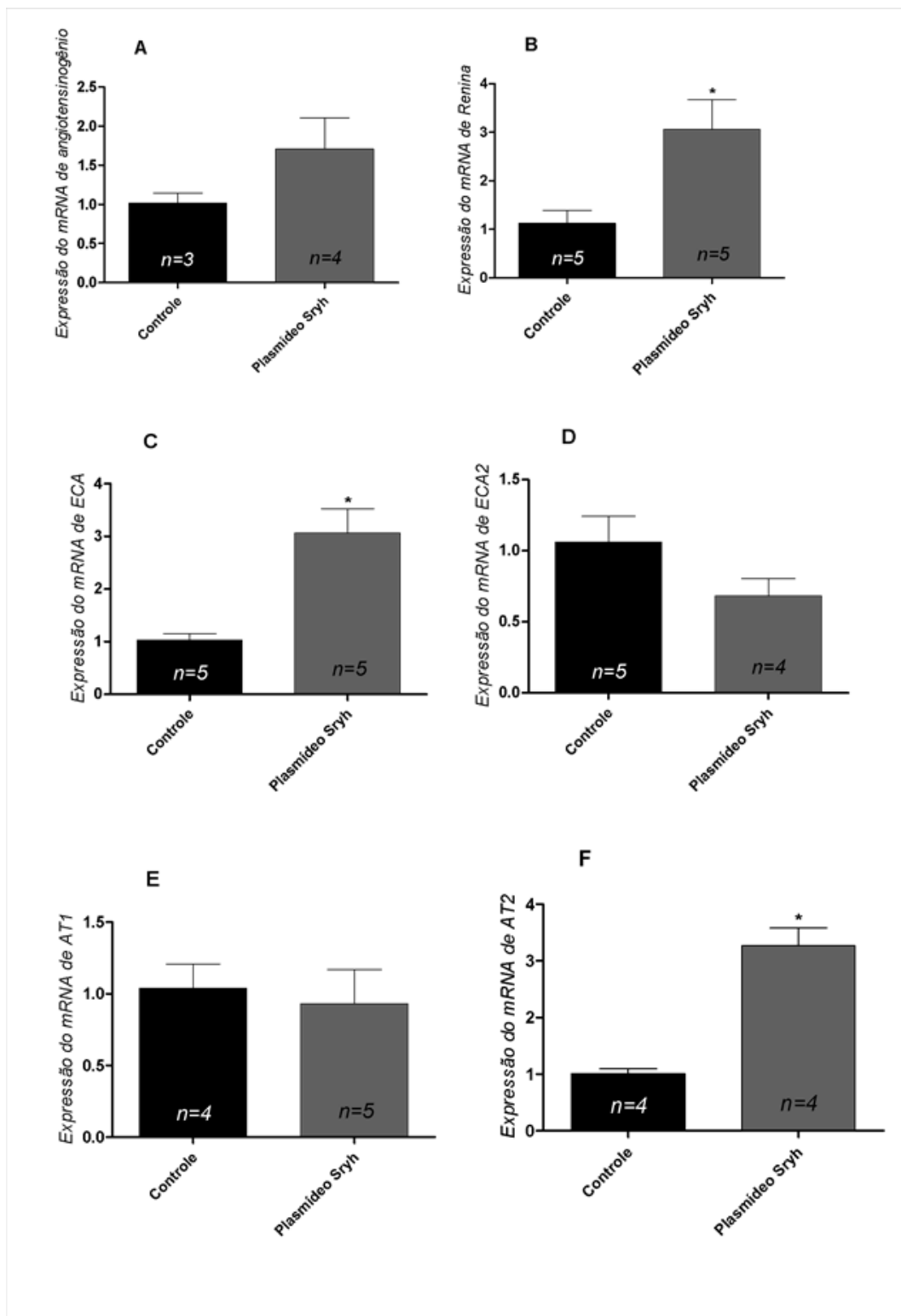
**Figura 33.** Análise da expressão de tirosina hidroxilase após a transfecção do *Sry3*, em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos Wistar.



**Figura 34.** Análise da expressão dos genes relacionados ao SRA após a transfecção de *Sry3* em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar. A  $p = 0,0083$ , B  $p = 0,0016$ , C  $p = 0,0387$ , D  $p = 0,8738$ , E  $p = 0,4616$  e F  $p = 0,0151$ . \* vs controle ( $p < 0,05$ ).

O *Sryh* também demonstrou atividade na regulação dos genes do SRA (Figura 35), demonstrando que este gene possui atividade fisiológica, semelhante ao *Sry1* e *Sry3* de rato, conforme também descrito neste trabalho para ratos SD.

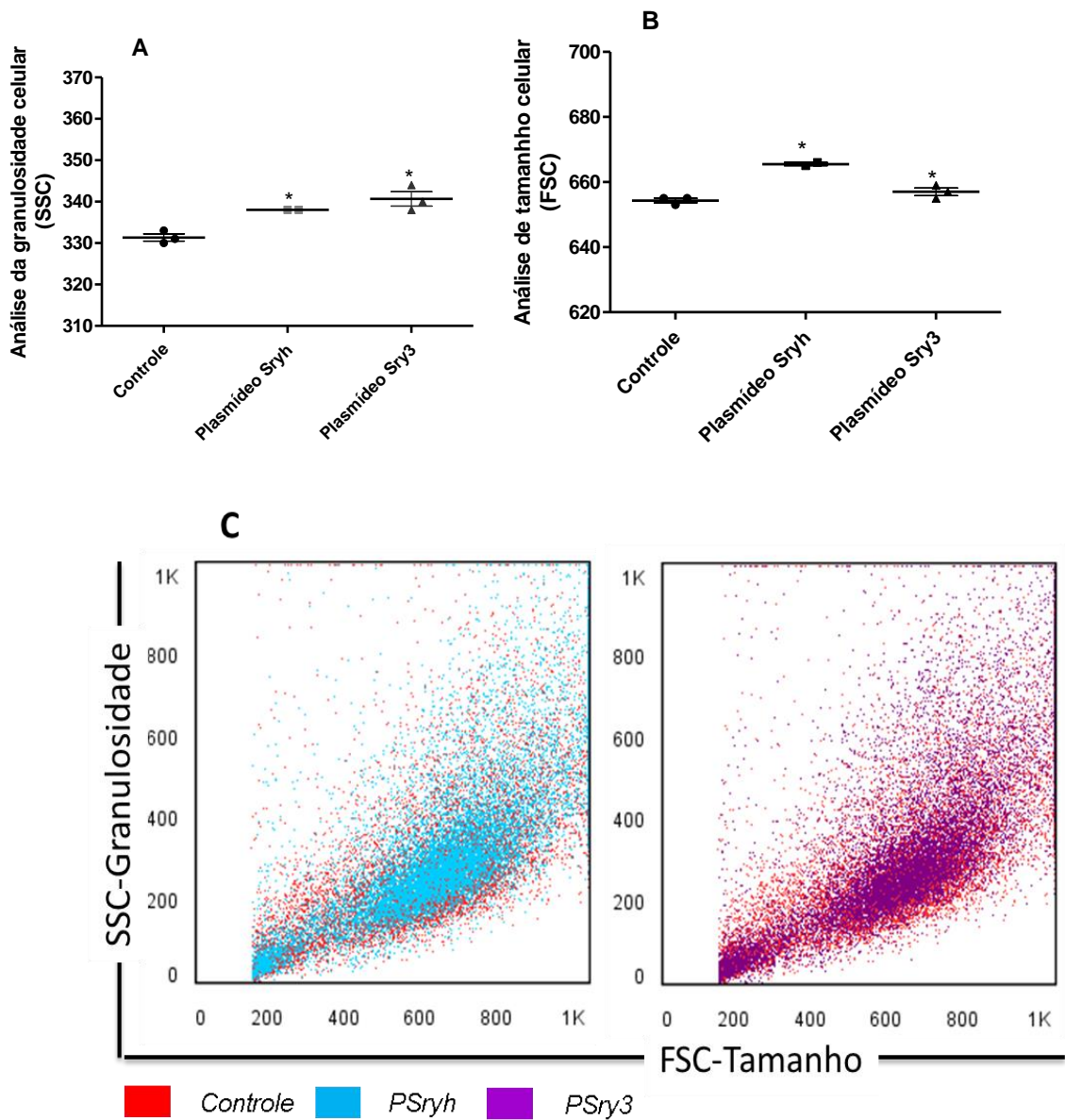
Assim como o *Sry3*, o *Sryh* apresenta atividade fisiológica conservada sobre os genes do SRA, nas linhagens estudadas.



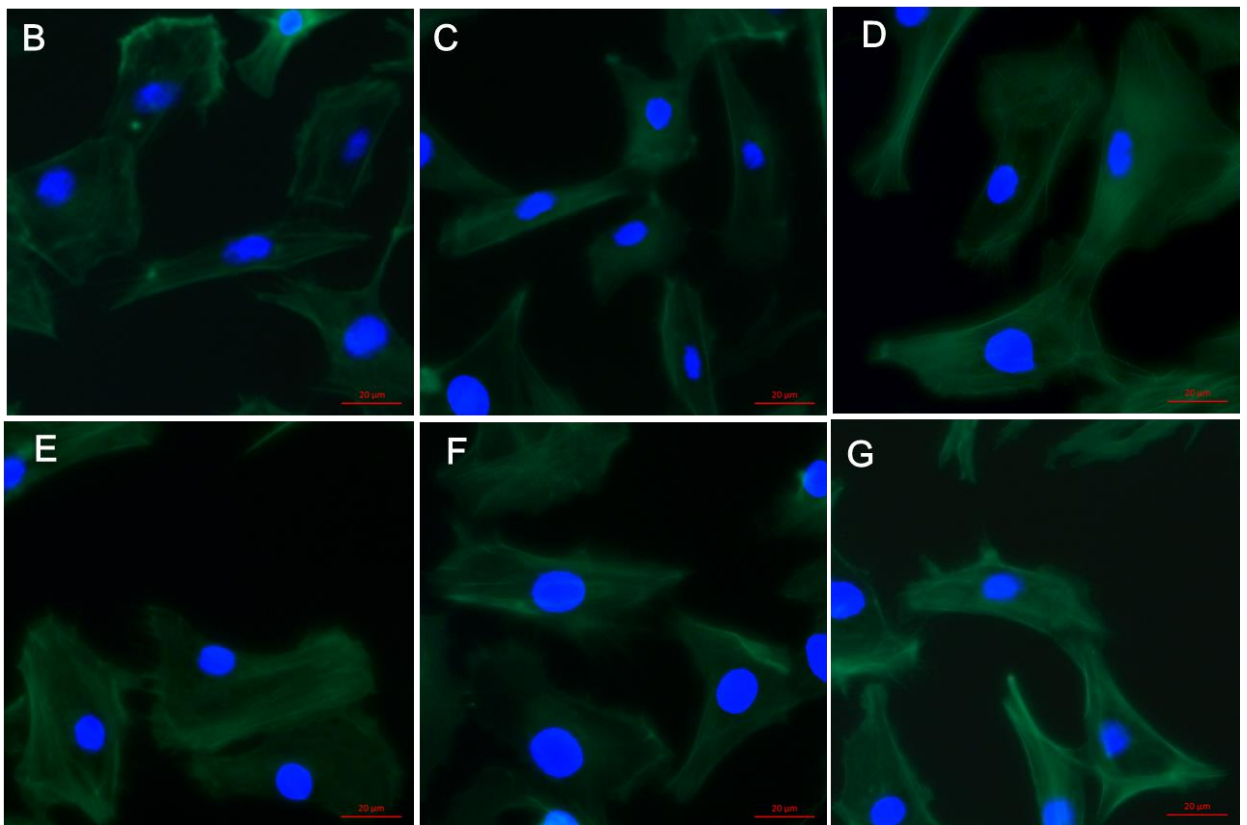
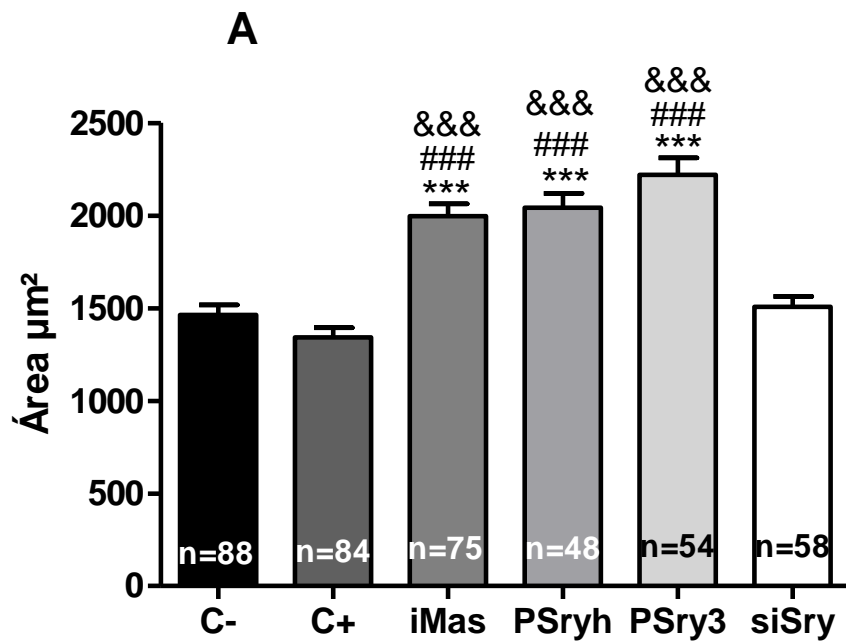
**Figura 35.** Análise da expressão dos genes relacionados ao SRA após a transfecção de *Sryh* em cultivo primário de cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar. A  $p= 0,2093$ , B  $p=0,0200$ , C  $p= 0,0025$ , D  $p= 0,1434$ , E  $p= 0,7424$  e F  $p= 0,0005$ . \* vs controle ( $p<0,05$ ).

Após o tratamento com *PSryh* e *PSry3* observou-se aumento significativo da granulosidade e tamanho dos cardiomiócitos pela técnica de citometria de fluxo (Figura 36).

Estes resultados sugeriram um aumento da área dos cardiomiócitos após o tratamento, quando comparado ao grupo controle, que foram confirmados pelas técnicas de HE (dados não mostrados) e imunofluorescência (Figuras 37). Não houve diferença significativa entre as técnicas.



**Figura 36.** Análise do tamanho e granulosidade dos cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar através da técnica de citometria de fluxo. **A.** Análise da granulosidade. **B.** Análise do tamanho. \* vs controle ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$ . **C.** Análise do tamanho e granulosidade.



**Figura 37. A.** Análise da área dos cardiomiócitos pela técnica de imunofluorescência. \*\*\*vs controle sem NTCPM (C-); ###vs controle com NTCPM (C+) e plasmídeo controle; &&&vs siSry; (p<0,05); **B.** C-; **C.** C+; **D.** iMas (controle positivo para hipertrofia); **E.** *PSryh*; **F.** *PSry3*; **G.** siSry.

# DISCUSSÃO

---

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de transmissão condizem com os dados obtidos por Neves et al. (2012), que encontraram os complexos de nanotubos em vesículas de clatrina, no início de endosomos, seguida de maturação vesicular, e localizados posteriormente nos lisossomos.

Yehia et al. (2007), também afirmam que os NTCPM são grandes e podem ser inequivocamente identificados em células por observação visual.

Assim como descrito também por Yehia et al (2007), não foi possível concluir que os NTCPM penetraram no núcleo a partir da microscopia eletrônica de transmissão, mas Pantarotto et al (2004), demonstraram por microscopia eletrônica de transmissão que os nanotubos de carbono atravessam a membrana nuclear, assim como Klumpp et al (2006).

Os dados obtidos neste estudo também indicam que há passagem dos NTCPM pela membrana nuclear, pois a partir dos dados obtidos por telemetria, observou-se um aumento significativo da pressão arterial e frequência cardíaca dos animais experimentais (Figura 11, 12 e 13) condizendo com os dados obtidos pela eletroporação (Figura 11) e já comprovados na literatura para a eletroporação de *Sry3* em ratos Wistar Kyoto (WKY) (ELY et al., 2011; ELY et al., 2007; Ely et al. 2009a; Milsted et al., 2004). O que também pode ser comprovado pelas alterações fisiológicas observadas após a transfecção dos plasmídeos e dos siRNAs.

Diversos estudos em ratos demonstraram a participação das cópias *Sry1* e *Sry3* no aumento da pressão arterial de ratos machos, sendo, portanto, uma das explicações pela diferença da pressão arterial entre os gêneros (ELY e TURNER, 1990; TURNER et al., 2009; ELY et al., 2011; ELY et al., 2007; ELY et al. 2009a; ELY et al., 2009b; Milsted et al., 2004).

Garcia et al. (2003), demonstraram em humanos, que há uma relação entre hipertensão, infarto do miocárdio e polimorfismos no cromossomo Y, mais precisamente no gene *Sry*.

Assim como Charchar et al. (2003), também relatam informações correlacionando o cromossomo Y com a hipertensão e a provável explicação para a maior incidência de doenças cardiovasculares nos homens quando comparado às mulheres.

De acordo com Hilliard et al. (2013), as diferenças sexuais existem na regulação da pressão arterial e da função renal pelo SRA, sendo nos machos, o eixo ECA/AngII/AT1 mais pronunciados, ao passo que, no sexo feminino, o equilíbrio é deslocado para o eixo ECA2/ANG 1-7/Mas e AT2.

No presente estudo foi possível observar após a transfecção de *Sry3* e *Sryh* em cardiomiócitos de ratos SD e Wistar machos, um aumento significativo da expressão de genes relacionados ao eixo ACE/ANG II/AT1 (Figuras 17, 34 e 35), comprovando, a relação destes genes na regulação da pressão arterial em machos. Também verificou-se que a expressão de *Sry* está diretamente relacionada ao aumento dos genes responsáveis pela biossíntese de ANG II.

Mullins et al. (2006), relataram que uma das características marcantes dos ratos SHR é a hiperatividade do SRA, a qual resulta em produção aumentada de ANG II. Ely e Turner (1990), demonstraram a partir de cruzamento entre linhagens normotensas e hipertensas que a hipertensão dos ratos SHR estava relacionada ao cromossomo Y e Turner et al. (2009), verificaram que ratos adultos machos SHR apresentam maior expressão de Sry quando comparado à WKY.

Dickey et al. (2012), também relacionaram o cromossomo Y às diferenças cardiovasculares, endócrinas e comportamentais observadas entre as linhagens SHR e WKY.

Até então, em humanos, foi descrita apenas uma cópia de Sry, a qual apresenta grande semelhança bioquímica com as cópias *Sry1* e *Sry3* encontradas em *Rattus norvegicus* (PROKOP et al., 2012). Os mesmos autores também demonstraram *in vitro* que a atividade reguladora do Sry humano sobre os promotores do SRA é bem semelhante à atividade da cópia *Sry3* como demonstrado por Milsted et al. (2010), também *in vitro*.

No presente trabalho, demonstrou-se que o *Sry3* produziu um aumento significativo na pressão sanguínea de ratos SD, do mesmo modo como já foi demonstrado em ratos WKY (ELY et al., 2009), e pela primeira vez foi demonstrada a participação do *Sryh* na regulação da pressão arterial e na modulação do RAS, semelhantemente à da cópia *Sry3* encontrada em ratos, visto que não houve diferença significativa entre o aumento de pressão induzida pela

liberação de clones de *Sry3* e *hSry* pelas duas técnicas desenvolvidas neste estudo.

Assim como sugerido por Prokop et al. (2012), os dados deste estudo também indicam que as proteínas de rato e humana parecem ter seus domínios conservados e funcionam como moduladores do RAS, favorecendo a via constritora deste sistema.

Também foi possível observar que o *Sryh* atua na regulação da pressão arterial via modulação dos genes do SRA (Figuras 17, 18, e 35) e por aumento da via das catecolaminas a partir da modulação da expressão do gene da TH, do receptor AT2 e ERK 1/2 (Figuras 17, 18, 31 e 32).

Macova et al. (2009), demonstraram que os receptores AT2 participam do aumento da expressão de TH e Dorn et al. (1999) observaram que a MAP quinase ERK 1/2 regula a ativação dos receptores de TH. Armando et al. (2004), em estudos relacionados ao estresse, observaram um efeito sinérgico entre os receptores AT1 e At2 no aumento da expressão de TH. Milsted et al. (2004); Ely et al. (2007), e Ely et al. (2009), também observaram aumento de TH em ratos WKY eletroporados com *Sry1*.

Czech et al. (2012), relataram que o *Sry* humano localizado em neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo regula vários componentes da síntese de catecolaminas e do metabolismo. Os mesmos autores também demonstraram que em linhagens de células de neuroblastoma humano, M17 *knockdown* para *Sry* apresentaram redução de TH e outros componentes da via da dopamina.

Contudo, a partir dos dados apresentados neste estudo é possível determinar que o *Sry humano* possui atividade fisiológica semelhante ao *Sry1* e *Sry3* de rato, participando da regulação da pressão arterial através da modulação de genes relacionados ao SRA e modulação da via das catecolaminas.

Segundo Dorn et al. (1999) e Xiao et al. (2001), a ativação dos receptores de tirosina hidroxilase e adrenérgicos estão relacionados ao aumento da hipertrofia cardíaca via ERK 1/2.

Neste estudo, observou-se que após a transfecção de *Sryh* houve aumento na expressão de TH provavelmente via AT2, que pode estar relacionada ao aumento dos níveis de ERK 1/2, condizendo com a hipertrofia observada após a transfecção dos plasmídeos contendo os genes *Sryh* e *Sry3* (Figuras 36 e 37).

Diversos estudos demonstram relação entre os membros da família relacionadas ao *Sry* e as MAPK quinases: ERK 1/2, JNK e p38.

Perera et al. (2010), em extratos de condrócitos, demonstraram que a ERK1/2 fosforilada atua na ativação da proteína Sox 9 relacionando ao *Sry*, induzindo a proliferação celular e Mitsugi et al. (2012), também utilizando cultivos de condrócitos observaram que a actvina-A inibe a fosforilação de JNK e Akt e suprime a expressão de Sox9, diminuindo a proliferação celular. Egea et al. (2011), realizaram estudos em células mesenquimais e observaram que a inibição de ERK 1/2 aumenta a expressão de TNF- $\alpha$  que atua na regulação para cima de SOX2.

Após a transfecção dos *P<sub>Sryh</sub>* e *P<sub>Sry3</sub>* observou-se aumento significativo da expressão das proteínas ERK 1/2 e JNK, assim como a expressão dos genes relacionados à via vasoconstritora do SRA, como por exemplo, *renina*, *angiotensinogênio* e *ECA*, que são precursores da angiotensina II. Wei et al. (2014) avaliando o papel da administração central de angiotensina II e do TNF- $\alpha$ , observaram um aumento dos níveis de ERK 1/2, JNK e p38 fosforiladas.

Após a inibição do receptor Mas, observou-se uma diminuição da expressão de ERK1/2 e JNK (Figura 28); aumento da expressão de *Sry* (Figura 26) e do tamanho da área dos cardiomiócitos (Figura 37).

Na literatura já é claro a participação do receptor Mas e da ANG 1-7 na diminuição dos níveis de ERK 1/2, JNK e p38, assim como na melhora da hipertrofia cardíaca e atenuação de danos à tecidos renais (Tallant et al., 2005; Tian et al., 2014; Zhou et al., 2012). Estes dados sugerem que o Mas quando expresso, através da inibição da ERK 1/2 e JNK regula a expressão do *Sry* para baixo.

Verificou-se no presente estudo que ao transfectar os cardiomiócitos com *P<sub>Sryh</sub>* e *P<sub>Sry3</sub>*, diminuiu a expressão de p38 e ao silenciar o gene *Sry* houve um aumento na expressão de p38. Gazel et al. (2008), ao avaliar as funções da p38 verificou que o *Sry* é um dos principais alvos destas quinases.

Gierl et al. (2012), demonstraram que em camundongos mutantes para o gene *Gadd45g* a expressão de *Sry* é reduzida e atrasada, ocorrendo uma completa reversão sexual masculino para o feminino durante o período

embrionário. O *Gadd45g* e *Sry* tem um padrão de expressão semelhante na crista genital, e são co-expressos em células somáticas gonadais.

Os mesmos autores também relataram que nestes animais mutantes, a sinalização de p38 MAPK é prejudicada assim como o fator de transcrição GATA4 dependente de quinase, que é necessária para a expressão *Sry*. Sugerindo, portanto, que há uma cascata de sinalização, envolvendo GADD45G → p38 MAPK → GATA4 → *Sry* para a regulação da determinação do sexo masculino. Warr et al. (2012), também relatam que a p38 participa da via de ativação do *Sry* e que sua inibição também ocasiona inversão sexual durante o período embrionário. No presente estudo, sugere-se que há uma retroalimentação negativa entre o gene *Sry* e os níveis de p38.

Contudo, os resultados apresentados na literatura para a ação da p38 no sistema cardíaco são altamente controversos, alguns estudos relatam que sua expressão está ligada à hipertrofia cardíaca (ZECHNER et al., 1997; WANG et al., 1998) e outros mostram demonstram que sua ativação não gera nenhum tipo de hipertrofia (LIAO et al., 2001), e BRAZ et al. (2003), demonstraram que camundongos transgênicos *knockout* para p38 apresentam hipertrofia cardíaca.

No presente estudo verificou-se que a hipertrofia observada não foi dependente de p38, visto que quando super expressou o *Sry* *houve* diminuição dos níveis de p38 e quando silenciou-se o gene *Sry* aumentou a p38, mas não houve hipertrofia.

Contudo, neste estudo verificou-se que o *Sry* interage com o sistema renina angiotensina, com a via das catecolaminas e sua super expressão induz hipertrofia cardíaca, provavelmente pelo aumento de ANGII, ERK 1/2 e JNK.

# CONCLUSÃO

---

## 7 CONCLUSÃO

Neste estudo observou-se que a técnica de transfecção utilizando NTCPM apresentou a mesma eficiência que a eletroporação já utilizada na literatura para liberação de plasmídeos contendo os genes *Sry*.

Também foi possível verificar pela primeira vez, que o *Sryh* aumenta a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos transfectados. E possui atividades fisiológicas semelhantes às atividades do *Sry1* e *Sry3* de rato, pois interage com o sistema renina angiotensina, principalmente com a via vasoconstritora, aumentando a expressão dos mRNAs do genes: *angiotensinogênio*, *renina* e *ECA*; e atua na regulação da via das catecolaminas, provavelmente via interação com o receptor AT2, mas ainda são necessários mais estudos para elucidar melhor esta via.

Assim como o *Sry3*, o *Sryh* apresentou atividades fisiológicas conservadas sobre os genes do SRA, nas linhagens estudadas.

A partir dos dados obtidos, observou-se que a expressão do *Sry* parece ser dependente da ativação das MAP quinases ERK 1/2 e JNK, e provavelmente é regulada para baixo pelo receptor Mas, que inibe a via destas quinases.

A super expressão de *Sry* induz o aumento de ERK 1/2 e JNK, provavelmente pelo aumento de ANGII, induzida pelo *Sry*. Mas ainda são necessários mais estudos para elucidar todas as vias envolvidas nestes processos.

Pode-se concluir ainda, que o *Sry* parece ter uma relação direta na regulação dos níveis de ANG II, pois aumenta a expressão dos genes relacionados à síntese da mesma.

Os níveis de *Sry* estão diretamente relacionados à expressão de p38 e neste estudo foi possível verificar que a hipertrofia observada, não foi dependente de p38.

A super expressão de *Sry3* e *Sryh* induzem o aumento do tamanho e granulosidade dos cardiomiócitos, indicando também sua participação na hipertrofia cardíaca, provavelmente pelo aumento de ANG II, TH, ERK 1/2 e JNK.

# REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

APPEL, L.J., MOORE, T.J., OBARZANEK, E., VOLLMER, W.M., SVETKEY, L.P., SACKS, F.M., et al. **A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. Dash Collaborative Research Group.** N Eng J Med., 336(16): 117–124, 1997.

ARAUJO, C.M. **Ação direta da aldosterona em cardiomiócitos de ratos.**Dissertação de mestrado. UFOP, 102, 2011.

ARMANDO, I.; JEZOVA, M.; BREGONZIO, C.; BAIARDI, G.; SAAVEDRA, J.M. **Angiotensin II AT1 and AT2 receptor types regulate basal and stress-induced adrenomedullary catecholamine production through transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase.** Ann N Y Acad Sci., 1018:302-9, 2004.

BEHLKE, M.A.; BOGAN, J.S.; BEER-ROMERO, P.; PAGE, D.C. **Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome.** Genomics., 17, 736-739, 1993.

BENTER, I.F.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. **Cardiovascular actions of angiotensin(1-7).** Peptides.,14(4):679-84, 1993.

BENTER, I.F.; FERRARIO, C.M.; MORRIS, M.; DIZ, DI. **Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats.** Am J Physiol., 269(1 Pt 2):H313-9, 1995.

BERTA P, HAWKINS JB, SINCLAIR AH, TAYLOR A, GRIFFITHS BL, GOODFELLOW PN, FELLOUS M. **Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor.** Nature, 348:448-450, 1990.

**BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 7;72:248-54, 1976.**

**BRANDÃO, A.A., POZZAN, R., FREITAS, E.V., POZZAN, R., MAGALHÃES, M.E.C., BRANDÃO, A.P. Blood pressure and overweight in adolescence and their association with insulin resistance and metabolic syndrome. J Hypertens.; 22, 111S, 2004.**

**BRAUN-MENENDEZ, E.; FASCIOLO, J. C.; LELOIR, L. F.; MUNOZ, J. M. The substance causing renal hypertension. J Physiol 98, 283-298, 1940.**

**BRAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. Science, 127, 242, 1958.**

**BRAZ JC, BUENO OF, LIANG Q, WILKINS BJ, DAI YS, PARSONS S, BRAUNWART J, GLASCOCK BJ, KLEVITSKY R, KIMBALL TF, HEWETT TE, MOLKENTIN JD. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. J Clin Invest., 111:1475–1486, 2003.**

**BROSNIHAN, K.B.; LI, P.; FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. Hypertension., 27(3 Pt 2):523-8, 1996.**

**CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; HERINGER, S.B.; BATISTA, E.N.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. Am J Physiol., 263(1 Pt 2):R89-94, 1992.**

**CAMPBELL, D.J. Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. J Cardiovasc Pharmacol., 10 Suppl 7:S1-8. Review, 1987.**

CAPLEA, A.; SEACHRIST, D.; DANESHVAR, H.; DUNPHY, G.; ELY, D. **Noradrenergic content and turnover rate in kidney and heart shows gender and strain differences.** J Appl Physiol.,92:2:567-71, 2002.

CESARINO, C.B., CIPULLO, J.P., MARTIN, J.F.V., CIORLIA, L.A., GODOY, M.R.P., CORDEIRO, J.A., RODRIGUES, I.C. **Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto.** Arq Bras Card.; 91(1): 31–35, 2008.

CHARCHAR FJ, TOMASZEWSKI M, STRAHORN P, CHAMPAGNE B, DOMINICZAK AF. **Y is there a risk to being male?** Trends Endocrinol Metab., 14(4):163-8, 2003.

CHIARINI-GARCIA, H.; MEISTRICH, M.L. **High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia.** Methods Mol Biol., 450:95-107, 2008.

CONEN, D; GLYNN, R.J.; RIDKER, P.M.; BURING, J.E.; ALBERT, M.A. **Socioeconomic status, blood pressure progression, and incident hypertension in a prospective cohort of female health professionals.** Eur Heart J., 30: 1378–1384, 2009.

CORIAT, A.M.; MULLER, U.; HARRY, J.L., UWANOGHO, D.; SHARPE, P.T. **PCR Amplification of Sry-related sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif.** PCR Methods Appl., 2: 218-222. 1993.

CZECH, D.P.; LEE, J.; SIM, H.; PARISH, C.L.; VILAIN, E.; HARLEY, V.R. **The human testis-determining factor SRY localizes in midbrain dopamine neurons and regulates multiple components of catecholamine synthesis and metabolism.** J Neurochem. 122(2):260-71, 2012.

DE OLIVEIRA, C.M.; PEREIRA, A.C.; DE ANDRADE, M.; SOLER, J.M.; KRIEGER, J.E. **Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study** BMC Medical Genetics, 9: 32, 2008.

DICKEY, C.; TOOT, J.; TERWILLIGER, M.; PAYNE, R.; TURNER, M.; ELY, D. **The SHR Y chromosome increases cardiovascular, endocrine, and behavioral responses to stress compared to the WKY Y chromosome.** Physiol Behav., 15;106(2):101-8, 2012.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.** Circ Res., 87, E1-9, 2000.

DORN, G.W.; TEPE, N.M.; LORENZ, J.N.; KOCH, W.J.; LIGGETT, S.B. **Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice.** Proc Natl Acad Sci U S A., 5;96(11):6400-5, 1999.

DOSTAL, D.E.; BAKER, K.M. **The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function?** Circ Res., 1;85(7):643-50, 1999.

EGEA V; VON BAUMGARTEN, L.; SCHICHOR, C.; BERNINGER, B.; POPP, T.; NETH, P.; GOLDBRUNNER, R.; KIENAST, Y.; WINKLER, F.; JOCHUM, M.; RIES, C. **TNF- $\alpha$  respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma.** Cell Death Differ., 18(5):853-63, 2011.

ELY, D.L.; TURNER, M.E. **Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome.** Hypertension, 16:277-81, 1990.

ELY, D.; MILSTED, A.; BERTRAM, J.; CIOTTI, M.; DUNPHY, G.; TURNER, M.E. **Sry delivery to the adrenal medulla increases blood pressure and adrenal medullary tyrosine hydroxylase of normotensive WKY rats.** *BMC Cardiovasc Disord.*, 7:6, 2007.

ELY, D.; MILSTED, A.; DUNPHY, G.; BOEHME, S.; DUNMIRE, J.; HART, M.; TOOT, J.; TURNER, M. **Delivery of sry1, but not sry2, to the kidney increases blood pressure and sns indices in normotensive wky rats.** *BMC Physiol.*;9:10, 2009.

ELY, D.; BOEHME, S.; DUNPHY, G.; HART, M.; CHIARAPPA, F.; MILLER, B.; MARTINS, A.S.; TURNER, M.; MILSTED, A. **The Sry3 Y chromosome locus elevates blood pressure and renin-angiotensin system indexes.** *Genet Med.*, 8:126-38, 2011.

ETELVINO, G.M.; PELUSO, A.A.; SANTOS, R.A. **New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D.** *Curr Hypertens Rep.*, 16(6):433, 2014.

FERRARIO, C. M.; AND IYER, S. N. **Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system.** *Regul Pept* 78, 13-18, 1998.

GARCÍA EC, GONZÁLEZ P, CASTRO MG, ALVAREZ R, REGUERO JR, BATALLA A, CORTINA A, ALVAREZ V. **Association between genetic variation in the Y chromosome and hypertension in myocardial infarction patients.** *Am J Med Genet A.*, 15;122A(3):234-7, 2003.

GAZEL, A.; NIJHAWAN, R.I.; WALSH, R.; BLUMENBERG, M. **Transcriptional profiling defines the roles of ERK and p38 kinases in epidermal keratinocytes.** *J Cell Physiol.*, 215(2):292-308, 2008.

GIERL, M.S.; GRUHN, W.H.; VON SEGGERN, A.; MALTRY, N.; NIEHRS, C. **GADD45G functions in male sex determination by promoting p38 signaling and Sry expression.** Dev Cell., 13;23(5):1032-42, 2012.

GOKER H, HAZNEDAROGLU IC, BEYAZIT Y, AKSU S, TUNCER S, MISIRLIOGLU M, BAYRAMOGLU F, KEKILLI M, BÜYÜKASIK Y, SAYINALP N, OZCEBE O, DUNDAR S, MOLLAMAHMUTOGLU L. **Local umbilical cord blood renin-angiotensin system.** Ann Hematol., 84(5):277-81, 2005.

GUBBAY, J.; COLLIGNON, J.; KOOPMAN, P.; CAPEL, B.; ECONOMOU, A.; MÜNSTERBERG, A.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. **A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes.** Nature., 19;346(6281):245-50,

HE, F.J.; MACGREGOR, G.A. **A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes.** J Hum Hypertens., 23(6):363-84, 2009.

HEITSCH, H.; BROVKOVYCH, S.; MALINSKI, T.; WIEMER, G. **Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells.** Hypertension., 37(1):72-76, 2001.

HILLIARD LM1, SAMPSON AK, BROWN RD, DENTON KM. **The "his and hers" of the renin-angiotensin system.** Curr Hypertens Rep.;15(1):71-9, 2013.

HIRSCH, A.T.; PINTO, Y.M.; SCHUNKERT, H.; DZAU, V.J. **Potential role of the tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of congestive heart failure.** Am J Cardiol. 2;66(11):22D-30D; discussion 30D-32D, 1990.

INAGAMI, T. **A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery.** Hypertension, 32, 953-957, 1998.

JIN, V.X.; O'GEE.N, H.; IYENGAR, S.; GREEN, R.; FARNHAM, PJ. **Identification of an OCT4 and SRY regulatory module using integrated computational and experimental genomics approaches.** *Genome Res.*,17:807-17, 2007.

KAMACHI,Y.; UCHIKAWA, M.; KONDOH, H. **Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development.** *Trends Genet.*, 16, 182±187, 2000.

KOOPMAN P. **Mammalian sex-determining genes.** *Current Opinion in Biotechnology*, 603-606, 1992.

KOSTENIS, E.; MILLIGAN, G.; CHRISTOPOULOS, A.; SANCHEZ-FERRER, C. F.; HERINGER-WALTHER, S.; SEXTON, P. M.; GEMBARDT, F.; KELLETT, E.; MARTINI, L.; VANDERHEYDEN, P.; SCHULTHEISS, H. P.; WALTHER, T. **G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor.** *Circulation*, 111, 1806-1813, 2005.

LADEIRA, M.S.; ANDRADE, V.A.; GOMES, E.R.; AGUIAR, C.J.; MORAES, E.R.; SOARES, J.S.; SILVA, E.E.; LACERDA, R.G.; LADEIRA, L.O.; JORIO, A.; LIMA, P.; LEITE, M.F.; RESENDE, R.R.; GUATIMOSIM, S. **Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes.** *Nanotechnology.*, 24;21(38):385101, 2010.

LAUDET, V.; STEHELIN, D.; CLEVERS, H. **Ancestry and diversity of the HMG box superfamily.** *Nucleic Acids Res.*, 21: 2493-2501, 1993.

LAUTNER RQ, VILLELA DC, FRAGA-SILVA RA, SILVA N, VERANO-BRAGA T, COSTA-FRAGA F, JANKOWSKI J, JANKOWSKI V, SOUSA F, ALZAMORA A, SOARES E, BARBOSA C, KJELDSSEN F, OLIVEIRA A, BRAGA J, SAVERGNINI S, MAIA G, PELUSO AB, PASSOS-SILVA D, FERREIRA A, ALVES F, MARTINS A, RAIZADA M, PAULA R, MOTTA-SANTOS D, KLEMPIN F, PIMENTA A, ALENINA N, SINISTERRA R, BADER M, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SANTOS

RA. **Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system.** *Circ Res.*, 12;112(8):1104-11, 2013.

LEFEBVRE V. **Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes.** *J Bone Miner Metab.*, 20(3), 121-30, 2002.

LESSA I. **Epidemiologia da insuficiência cardíaca e da hipertensão arterial sistêmica no Brasil.** *Rev Bras de Hipertens.*, 8: 383–392, 2001.

LEUNG, P.S. **The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs.** *Curr Protein Pept Sci.*, 5(4):267-73, 2004.

LIAO P, GEORGAKOPOULOS D, KOVACS A, ZHENG M, LERNER D, PU H, SAFFITZ J, CHIEN K, XIAO RP, KASS DA, WANG Y. **The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98:12283–12288, 2001.

KLUMPP, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M.; BIANCO, A. **Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics.** *Biochim Biophys Acta.*, 1758(3):404-12, 2006.

KOSTENIS, E.; MILLIGAN, G.; CHRISTOPOULOS, A.; SANCHEZ-FERRER, C. F.; HERINGER-WALTHER, S.; SEXTON, P. M.; GEMBARDT, F.; KELLETT, E.; MARTINI, L.; VANDERHEYDEN, P.; SCHULTHEISS, H. P.; WALTHER, T. **G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor.** *Circulation*, 111, 1806-1813, 2005.

LIMA, C.V.; PAULA, R.D.; RESENDE, F.L.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. **Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats.** *Hypertension*, 30(3 Pt 2):542-8, 1997.

LINDPAINTNER K, JIN MW, NIEDERMAIER N, WILHELM MJ, GANTEN D. **Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart.** *Circ Res.*, 67(3):564-73, 1990.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)).** *Method.*, 25, 4, 402-8, 2001.

LORELL, B.H. **Role of angiotensin AT1, and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and disease.** *Am J Cardiol.*, 17;83(12A):48H-52H, 1999.

MACHADO, R. D.; FERREIRA, M. A.; BELO, A. V.; SANTOS, R. A.; ANDRADE, S. P. **Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature.** *Regul Pept.*, 107, 105-113, 2002.

MACOVA, M.; ARMANDO, I.; ZHOU, J.; BAIARDI, G.; TYURMIN, D.; LARRAYOZ-ROLDAN, I.M.; SAAVEDRA, J.M. **Estrogen reduces aldosterone, upregulates adrenal angiotensin II AT2 receptors and normalizes adrenomedullary Fra-2 in ovariectomized rats.** *Neuroendocrinology.*, 88(4):276-86, 2008.

MACOVA, M.; PAVEL, J.; SAAVEDRA, J.M. **A peripherally administered, centrally acting angiotensin II AT2 antagonist selectively increases brain AT1 receptors and decreases brain tyrosine hydroxylase transcription, pituitary vasopressin and ACTH.** *Brain Res.*, 23;1250:130-40, 2009.

MARANON R, RECKELHOFF JF. **Sex and gender differences in control of blood pressure.** *Clin Sci (Lond).*; (7):311-8, 2013.

MARTINEZ, M.C.; LATORRE, M.R.D.O. **Fatores de Risco para Hipertensão Arterial e Diabete Melito em Trabalhadores de Empresa Metalúrgica e Siderúrgica.** *Arq Bras Cardiol.*, 87: 471–479, 2006.

MAZZOLAI, L.; NUSSBERGER, J.; AUBERT, J.F.; BRUNNER, D.B.; GABBIANI, G.; BRUNNER, H.R.; PEDRAZZINI, T. **Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system.** Hypertension., 31(6):1324-30, 1998.

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. **Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system.** Am J Physiol Cell Physiol., 292(1):C82-97, 2007.

MILSTED, A.; SEROVA, L.; SABBAN, EL.; DUNPHY, G.; TURNER, M.E.; ELY, D.L. **Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by *Sry*.** Neurosci Lett., 369:3:203-7, 2004.

MILSTED, A.; UNDERWOOD, A.C.; DUNMIRE, J.; DELPUERTO, H.L.; MARTINS, A.S.; ELY, D.L.; TURNER, M.E. **Regulation of multiple renin-angiotensin system genes by *Sry*.** J Hypertens. 28(1):59-64, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de atenção básica. **Hipertensão arterial.** Brasília, DF, 2006.

MITSUGI, S.; ARIYOSHI, W.; OKINAGA, T.; KANEUJI, T.; KATAOKA, Y.; TAKAHASHI, T.; NISHIHARA, T. **Mechanisms involved in inhibition of chondrogenesis by activin-A.** Biochem Biophys Res Commun., 6;420(2):380-4, 2012.

MORISHITA, R.; AOKI, M.; OGIHARA, T. **Functional analysis of cardiovascular renin-angiotensin system using a gain or loss of function approach.** Hypertens Res., 23(2):137-41, 2000.

MÜLLER, D.N.; FISCHLI, W.; CLOZEL, J.P.; HILGERS, K.F.; BOHLENDER, J.; MENARD, J.; BUSJAHN, A.; GANTEN, D.; LUFT, F.C. **Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake.** Circ Res., v. 82, n. 1, p. 13-20,

1998.

MULLINS, L. J.; BAILEY, M. A.; MULLINS, J. J. **Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective.** *Physiol Rev.*, Apr;86(2):709-46, 2006.

NEVES, M.F.; OIGMAN, W. **Pré-hipertensão: uma visão contra o tratamento medicamentoso.** *Rev Bras Hipertens.* 16(2): 112–115, 2009.

NEVES, V.; GERONDOPOULOS, A.; HEISTER, E.; TÎLMACIU, C.; FLAHAUT, E.; SOULA, B.; SILVA, S. R. P., MCFADDEN, J.; COLEY, M. H.. **Cellular localization, accumulation and trafficking of double-walled carbon nanotubes in human prostate cancer cells.** *Nano Research.*, 5, 4,223-234, 2012.

OBERMÜLLER, N.; GENTILI, M.; GAUER, S.; GRETZ, N.; WEIGEL, M.; GEIGER, H.; GASSLER N. **Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary.** *J Histochem Cytochem.*, 52(4):545-8, 2004.

OUDIT, G.Y.; CRACKOWER, M.A.; BACKX, P.H.; PENNINGER, J.M. **The role of ACE2 in cardiovascular physiology.** *Trends Cardiovasc Med.*, 3(3):93-101, 2003.

PAGE, I., AND HELMER, O. **A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from reaction between rennin activation.** *The Journal of Experimental Medicine*, 71, 29, 1940.

PANTAROTTO, D.; SINGH, R.; MCCARTHY, D.; ERHARDT, M.; BRIAND, J.P.; PRATO, M.; KOSTARELOS, K.; BIANCO, A. **Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery.** *Angew Chem Int Ed Engl.*, 4;43(39):5242-6, 2004.

PAULA, R.D.; LIMA, C.V.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. **Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats.** *Hypertension.* 26(6 Pt 2):1154-9, 1995.

PEACH, M. J. **Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action.** *Physiol Rev.*, 57, 313-370, 1977.

PEREIRA M, LUNET N, AZEVEDO A, BARROS H. **Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries.** *J Hypertension*; 27(5): 963–975, 2009.

PERERA, P.M., WYPASEK, E., MADHAVAN, S., RATH-DESCHNER, B., LIU, J., NAM, J., RATH, B., HUANG, Y., DESCHNER, J., PIESCO, N., WU, C., AGARWAL, S. **Mechanical signals control SOX-9, VEGF, and c-Myc expression and cell proliferation during inflammation via integrin-linked kinase, B-Raf, and ERK1/2-dependent signaling in articular chondrocytes.** *Arthritis Res Ther.*,12(3):R106, 2010.

PESCATELLO LS, FRANKLIN BA, FAGARD R, FARQUHAR WB, KELLEY GA, RAY CA. **American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension.** *Med Sci Sports Exerc.*, 36: 533–553, 2004.

PÖRSTI, I.; BARA, A.T.; BUSSE, R.; HECKER, M. **Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor.** *Br J Pharmacol.*, 111(3):652-4, 1994.

PRIOR, H.M.; WALTER, M.A. **SOX genes: architects of development.** *Mol Med.*,2(4):405-12, 1996.

PROKOP, J.W.; WATANABE, I.K.; TURNER, M.E.; UNDERWOOD, A.C.; MARTINS, A.S.; MILSTED, A. **From rat to human: regulation of Renin-Angiotensin system genes by sry.** *Int J Hypertens.*,2012:724240, 2012.

PROKOP, J.W.; RAUSCHER, F.J.; PENG, H.; LIU, Y.; ARAUJO, F.C.; WATANABE, I. REIS, F.M.; MILSTED, A. **MAS promoter regulation: a role for Sry**

and tyrosine nitration of the KRAB domain of ZNF274 as a feedback mechanism. Clin Sci (Lond). 126(10):727-38, 2014.

RAINFORTH, M.V.; SCHNEIDER, R.H.; NIDICH, S.I.; GAYLORD-KING, C.; SALERNO, J.W.; ANDERSON, J.W. **Stress reduction programs in patients with elevated blood pressure: a systematic review and meta-analysis.** Curr Hypertens Rep., 9: 520-528, 2007.

RECKELHOFF, J. F. **Gender differences in the regulation of blood pressure.** Hypertension. 37, 1199–1208, 2001.

RIGATTO, K.V.; BOHLKE, M.; IRIGOYEN, M.C. **Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento.** Rev Soc Cardiol do Rio Grande do Sul. 3: 1-5, 2004.

ROSÁRIO, T.M., SCALA, L.C.N.S., FRANÇA, G.V.A., PEREIRA, M.R.G., JARDIM, P.C.B.V. **Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT.** Arq Bras Card., 93(6): 672–678, 2009.

SANTOS, R., CAMPAGNOLE-SANTOS, M., ANDRADE, S. **Angiotensin-(1 – 7): na update.** Regulatory Peptides, 91, 45 – 62, 2000.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. **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.

SANTOS, R.A.S.; CASTRO, C.H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S.V.; ALMEIDA, A.P.; PAULA, R.D.; CRUZ, J.; RAMOS, A.S.; ROSA, K.; IRIGOYEN, M.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G.; FERREIRA, A. **Impairment of In Vitro and In Vivo Heart**

**Function in Angiotensin-(1-7) Receptor Mas Knockout Mice.** Hypertension. 47:996-1002, 2006.

SCHEPERS, G.E.; TEASDALE, R.D.; KOOPMAN, P. **Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families.** Dev Cell, 3, 167–170, 2002.

SCHÜMANN, H.J. **Second symposium on catecholamines. Properties of adrenergic tissues. Medullary particles.** Pharmacol Rev., 18(1):433-8, 1966.

SKEGGS, L.T. Jr.; MARSH, W.H.; KAHN, J.R.; SHUMWAY, N.P. **The existence of two forms of hypertensin.** J Exp Med., 99(3):275-82, 1954.

SKEGGS, L.T. Jr.; KAHN, JR.; SHUMWAY, N.P. **The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.** J Exp Med., 1;103(3):295-9, 1956.

SEKIDO, R. **SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination.** Int J Biochem Cell Biol., 42(3):417-20, 2010.

SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS, HAWKINS JR, GRIFFITHS BL, SMITH MJ, FOSTER JW, FRISCHAUF AM, LOVELL-BADGE R, GOODFELLOW PN. **A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif.** Nature, 19;346(6281):240-4, 1990.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.** Arq Bras Cardiol, 1–48, 2006.

TALLANT, E. A.; FERRARIO , C. M.; GALLAGHER, P. E. **Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor,”** American Journal of Physiology, 289, 4, H1560–H1566, 2005.

TIAN, J.; ZHANG, L.; ZHOU, Y.; XIAO, J.; LI, S.; CHEN, Y.; QIAO, Z.; NIU, J.; GU, Y. **Angiotensin-(1-7) attenuates damage to podocytes induced by preeclamptic serum through MAPK pathways.** *Int J Mol Med.*, 34(4):1057-64, 2014.

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. **A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.** *J Biol Chem.*, 275, 33238-33243, 2000.

TURNER, M.E.; MARTIN, C.; MARTINS, A.S.; DUNMIRE, J.; FARKAS, J.; ELY, D.L.; MILSTED, A. **Genomic and expression analysis of multiple Sry loci from a single *Rattus norvegicus* Y chromosome.** *BMC Genet.*, 8:11, 2007.

TURNER, M.E.; FARKAS, J.; DUNMIRE, J.; ELY, D.; MILSTED, A. **Which Sry locus is the hypertensive Y chromosome locus?** *Hypertension.*, 53:430-5, 2009.

TURNER, M.E.; ELY, D.; PROKOP, J.; MILSTED, A. **Sry, more than testis determination?** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 301(3):R561-71, 2011.

UNGER, T. **The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease.** *Am J Cardiol.*, 89, 2A, 3A-9A; . 2002.

VRIZ, S.; LOVELL-BADGE, R. **The zebrafish Zf-Sox 19 protein: A novel member of the Sox family which reveals highly conserved motifs outside of the DNA-binding domain.** *Gene.*, 153: 275-276, 1995.

XIAO, L.; PIMENTAL, D.R.; AMIN, J.K.; SINGH, K.; SAWYER, D.B.; COLUCCI, W.S. **MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes.** *J Mol Cell Cardiol.*, 33(4):779-87, 2001.

XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 300(4):R804-17, 2011.

ZECHNER D, THUERAUF DJ, HANFORD DS, MCDONOUGH PM, GLEMBOTSKI CC. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol.*, 139:115–127, 1997.

ZHOU, L.; XUE, H.; WANG, Z.; NI, J.; YAO, T.; HUANG, Y.; YU, C.; LU, L. Angiotensin-(1-7) attenuates high glucose-induced proximal tubular epithelial-to-mesenchymal transition via inhibiting ERK1/2 and p38 phosphorylation. *Life Sci.*, 90(11-12):454-62, 2012.

WANG Y, HUANG S, SAH VP, ROSS J JR, BROWN JH, HAN J, CHIEN KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.*, 273:2161–2168, 1998.

WARR N., CARRE GA, SIGGERS P, FALEATO JV, BRIXEY R, POPE M, BOGANI D, CHILDERS M, WELLS S, SCUDAMORE CL, TEDESCO M, DEL BARCO BARRANTES I, NEBREDA AR, TRAINOR PA, GREENFIELD A. Gadd45y and Map3k4 interactions regulate mouse testis determination via p38 MAPK-mediated control of Sry expression. *Dev Cell.*, 13;23(5):1020-31, 2012.

WEI, S.G.; ZHANG, Z.H.; YU, Y.; FELDER, R.B. Central SDF-1/CXCL12 Expression and Its Cardiovascular and Sympathetic Effects: The Role of Angiotensin II, TNF- $\alpha$  and MAPK Signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2014

WILLIAMS, B. The year in hypertension. *JACC*, 55(1): 66–73, 2010.

WOODS LL, MORGAN TK, RESKO JA. **Castration fails to prevent prenatally programmed hypertension in male rats.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.; 298(4), 1111-6, 2010.

YANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, S.; CAI, Z.; JIA, Y.; MA, Y.; ZHENG, C.; LU, Y.; RODEN, R.; CHEN, Y. Retraction. **Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells.** Gene Ther., 14(11):920, 2007.

YEHIA, H.N.; DRAPER, R.K.; MIKORYAK, C.; WALKER, E.K.; BAJAJ, P.; MUSSELMAN, I.H.; DAIGREPONT, M.C.; DIECKMANN, G.R.; PANTANO, P. **Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells.** J Nanobiotechnology., 23;5:8, 2007.