

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Gabriela Cavazza Cerri

Avaliação do efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre a expressão gênica no tecido adiposo marrom de camundongos C57BL6/J

Belo Horizonte

2021

Gabriela Cavazza Cerri

Avaliação do efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre a expressão gênica no tecido adiposo marrom de camundongos C57BL6/J

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto
Souza dos Santos

Belo Horizonte

2021

043

Cerri, Gabriela Cavazza.

Avaliação do efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre a expressão gênica no tecido adiposo marrom de camundongos C57BL6/J [manuscrito] / Gabriela Cavazza Cerri. – 2021.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia e Farmacologia. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Tecido Adiposo Marrom. 4. Metabolismo. 5. Cardiomiopatias. 6. Receptores de Angiotensina. I. Santos, Robson Augusto Souza dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



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

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 333 DE GABRIELA CAVAZZA CERRI

**"Avaliação do Efeito da Deleção Genética do Receptor MrgD Sobre a
Expressão Gênica no Tecido Adiposo Marrrom de Camundongos C57BL6/J"**

GABRIELA CAVAZZA CERRI

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **24 de março de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Almir de Sousa Martins, ICB/UFMG
Profa. Dra. Maria Luiza de Moraes Barreto de Chaves, ICB/USP
Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos, ICA/UFMG
Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen, InCor/USP
Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 24 de março de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Maria Luiza de Moraes Barreto de Chaves**, **Usuário Externo**, em 24/03/2021, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Claudia Costa Irigoyen**, **Usuário Externo**, em 24/03/2021, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson Augusto Souza dos Santos**, **Professor do Magistério Superior**, em 26/03/2021, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Sergio Henrique Sousa Santos**, **Professor do Magistério**



Superior, em 26/03/2021, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Almir de Sousa Martins, Membro de comissão**, em 27/03/2021, às 18:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0631892** e o código CRC **25768E50**.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Dr. Robson Santos pela brilhante e excelente orientação e pela confiança.

Agradeço aos meus colegas pela contribuição durante a minha trajetória no laboratório de hipertensão e pela amizade que levarei para toda a vida.

Agradeço ao Professor Dr. Michael Bader pela orientação e aos colegas do MDC pela colaboração, amizade e alegres momentos durante o período em que estive na Alemanha.

Agradeço à minha família por todo apoio e amor.

“We are the living planet, Sophie! We are the great vessel sailing around a burning sun in the universe. But each and every of us is also a ship sailing through life with a cargo of genes.”

“How terribly sad it was that people are made in such a way that they get used to something as extraordinary as living?!”

Jostein Gaarder

RESUMO

A Alamandina é um heptapeptídeo que faz parte do Sistema Renina-Angiotensina (SRA). A sequência de aminoácidos da alamandina se difere da sequência de aminoácidos da Ang-(1-7) apenas pela presença de alanina no lugar do aspartato. Além da estrutura, os dois peptídeos compartilham semelhanças entre seus efeitos. Entretanto, os efeitos da alamandina são mediados pelo receptor MrgD. Este receptor é expresso em diferentes tecidos tais como, artéria, cerebelo, coração e tecido adiposo. Os outros receptores do SRA (MAS, AT_{1R} e AT_{2R}) também são expressos em diversos órgãos, inclusive em tecidos adiposos branco e marrom. Essa expressão localizada em tecidos endócrinos proporciona grande influência do SRA ao metabolismo. No tecido adiposo marrom (TAM) a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7) promove aumento de gasto energético e da atividade de diversos marcadores como AMPK, UCP1 e PGC1a. Os nossos primeiros resultados nos indicaram que o receptor MrgD também pode ter influência sobre o TAM, pois observamos que os animais MrgD/KO possuem o TAM extremamente diminuído e que animais C57BL6/J obesos apresentam expressão diminuída de MrgD no TAM. Não à toa este tecido e este receptor nos chamou a atenção. Uma vez que, não temos estudos a respeito do efeito do eixo Alamandina/MrgD sobre o metabolismo, uma técnica que promova resultados abrangentes fornece dicas de focos de estudo, assim como diferentes linhas de trabalhos futuros. Neste sentido, a técnica de sequenciamento de RNA, para RNA extraído de TAM de animais MrgD/KO obesos e magros, foi utilizada. A obesidade foi induzida por uma dieta rica em glicose (HG) pelo período de 8 semanas. A expressão do receptor MrgD é essencial para uma resposta à dieta HG, visto que os animais MrgD/KO HG deixaram de regular mais de 1000 genes em comparação ao grupo MrgD/KO ST. Na ausência do receptor MrgD o TAM é regulado negativamente, diminuindo a expressão de mais 400 transcritos. Os animais MrgD/KO diminuem a expressão de marcadores termogênicos e aumentam a expressão de marcadores de fibrose na comparação entre MrgD/KO HG vs WT HG. Além disso, a ausência do receptor MrgD promove uma tendência para alteração em diversas vias tais quais, sinalização de cálcio, cadeia transportadora de elétrons, termogênese, cardiomiopatias, entre outras. De acordo com as análises encontramos alguns dos principais alvos do eixo alamandina/MrgD: AMPK, canais iônicos e componentes da matriz extracelular.

Palavras-chave: Receptor MrgD, alamandina, sistema renina-angiotensina, tecido adiposo marrom, metabolismo e cardiomiopatia.

ABSTRACT

Alamandine is a heptapeptide part of the renin-angiotensin system (RAS). The amino acid sequence of alamandine (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) is similar to the amino acid sequence of ANG-(1-7) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), except for the presence of alanine in the place of aspartate. In addition to the structure, the effects of alamandine are also similar to the effects of Ang-(1-7). Despite the similarities, the effects of alamandine are mediated by the MrgD receptor. The MrgD receptor is expressed in a variety of tissues e.g. dorsal root ganglia, artery, bladder, cerebellum, heart, and adipose tissue. The other RAS receptors (MAS, AT1R and AT2R) are also expressed in a wide variety of organs, including white and brown adipose tissues. This localized expression in endocrine tissues provides a great influence of the RAS to the metabolism. In the brown adipose tissue (BAT), the ECA2/Ang-(1-7) axis activity promotes increased energy expenditure and activity of several markers such as AMPK, UCP1 and PGC1a. Our first results indicated that the alamandine receptor, MrgD, may also have an influence on BAT, as we observed that MrgD/KO animals have extremely decreased BAT and obese C57BL6/J mice show decreased expression of MrgD in BAT. Therefore, this tissue and this receptor caught our attention. Since we have no studies on the effect of the alamandine/MrgD axis on metabolism, a technique that promotes comprehensive results allows for a better north and can provide different lines for future work. In this sense, the RNA sequencing technique for RNA extracted from BAT of obese and lean MrgD/KO mice was performed. Obesity was induced by a high-glucose diet (HG) for 8 weeks. Obesity induced transcriptional changes in the BAT of WT HG animals related to increased metabolism and adaptive thermogenesis. The expression of the MrgD receptor is essential for a HG diet response, since the MrgD/KO HG group failed in regulating more than 1000 genes compared to the MrgD/KO ST group. In the absence of the MrgD receptor BAT transcripts are deeply downregulated decreasing the expression of over 400 genes. MrgD/KO animals decreased the expression of thermogenic markers and increased the expression of fibrosis markers in the comparison between MrgD/KO HG vs WT HG. In addition, the absence of the MrgD receptor promotes a tendency to regulate several pathways e.g., calcium signaling, electron transport chain, thermogenesis, and cardiomyopathies. According to the analysis we found some of the main targets of the alamandine/MrgD axis: AMPK, ion channels and components of the extracellular matrix.

Keywords: MrgD receptor, alamandine, renin-angiotensin system, brown adipose tissue, metabolism, and cardiomyopathy.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	1
1.2 ALAMANDINA E MRGD	3
1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E OBESIDADE	8
1.4 TECIDO ADIPOSEO MARROM	9
2. OBJETIVOS	14
3. MÉTODOS	15
3.1 ANIMAIS	15
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	15
3.3 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR	15
3.4 PESO DOS TECIDOS	16
3.5 TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E DE SENSIBILIDADE À INSULINA	16
3.6 PRESSÃO SANGUÍNEA	16
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ALAMANDINA E ANGIOTENSINAS	17
3.8 COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	17
3.9 HISTOLOGIA	18
3.10 PCR EM TEMPO REAL	18
3.11 ESTATÍSTICA	19
3.12 SEQUENCIAMENTO DE RNA	19
4. RESULTADOS	20
4.1 TECIDO ADIPOSEO MARROM	20
4.2 PESO CORPORAL	21
4.3 PRESSÃO SANGUÍNEA	22
4.4 ADIPOSIDADE	23
4.5 PESO DO CORAÇÃO, FÍGADO E PÂNCREAS	25
4.6 COLESTEROL TRIGLICERÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	25
4.7 PERFIL DA GLICEMIA	26
4.8 NÍVEIS CIRCULANTES DE ALAMANDINA E ANGIOTENSINAS I, II E I-7	27
4.9 EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO SRA NOS TECIDOS ADIPOSOS	28
4.10 TRANSCRIPTOMA	29
4.10.1. A obesidade induz mudanças de expressão gênica no TAM	29
4.10.2. A ativação do eixo alamandina/MrgD é importante para uma resposta convencional à dieta HG	30
4.10.3. A ausência do receptor MrgD levou a uma regulação negativa do padrão de transcritos no TAM e enriqueceu vias de cardiomiopatias	34
4.10.4. Camundongos MrgD/KO HG diminuem a expressão de marcadores de recrutamento do TAM e aumentam a expressão de genes da MEC	38
5. DISCUSSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	50
7. APÊNDICE	57

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) consiste em eixos endócrinos que formam um potente mecanismo de controle da pressão arterial. A primeira enzima do sistema é a renina, descoberta em 1898 por Tigerstedt e Bergman. Esses pesquisadores perceberam o aumento da pressão arterial após injeção de extrato de rim em coelhos. A molécula pressora deste extrato foi identificada como *renin*^{1,2 e 3}. A renina é uma proteína sintetizada pelo aparelho justaglomerular e é secretada em resposta à diminuição da pressão arterial ou à queda de concentração de Na⁺ no túbulo distal. A renina também é conhecida como angiotensinogenase, uma vez que é responsável por clivar o angiotensinogênio dando início assim à formação das angiotensinas. O aumento da concentração de renina circulante significa aumento da ativação do SRA. A partir da quebra do angiotensinogênio pela renina é liberado o decapeptídeo conhecido como angiotensina I, que apesar de inativa, é a precursora para a produção de todas as angiotensinas ativas (Fig.1).

A enzima conversora da angiotensina (ECA) é uma proteína transmembrana mais localizada na superfície de células endoteliais do pulmão. Entretanto, sua localização não se restringe ao pulmão, também é encontrada em abundância em outros órgãos tais como rins, cérebro, coração, músculo esquelético e tecidos adiposos. A Angiotensina I é clivada pela ECA e dessa forma o decapeptídeo é transformado em um octapeptídeo biologicamente ativo, a angiotensina II (Ang II), conhecida pelo seu potente efeito vasoconstritor^{4,5}.

A AngII é o principal peptídeo vasoconstritor do SRA e compõe o eixo ECA/ AngII/ AT1_R. Os efeitos da AngII são mediados pelos receptores AT1 e AT2, no entanto seus principais efeitos ocorrem por meio do receptor AT1, por exemplo: (i) atua como potente vasoconstritor de forma direta ou por meio do aumento da liberação de norepinefrina, (ii) promove a secreção

de aldosterona e vasopressina, significando o aumento da retenção de sódio e água (iii) aumenta a contração e proliferação celular no músculo liso vascular, influenciando o remodelamento vascular e a ação angiogênica, (iv) tem efeito trófico, aumentando o inotropismo e o cronotropismo cardíaco e (v) favorece os perfis pró inflamatório e pró trombótico^{6,7,8}. Os efeitos do receptor AT₂ mediados por AngII são comumente sutis e mais observados durante a vida fetal, período em que se tem elevada expressão deste receptor. Muitas vezes os efeitos do AT_{2R} se opõem aos efeitos de AT_{1R}, tal como o efeito de diminuição da pressão arterial ⁸.

Anteriormente a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) era reconhecida apenas como um metabólito da Ang I ⁹. Entretanto, Santos e colaboradores descobriram que a Ang-(1-7) também podia ser formada na ausência de ECA, uma vez que no cérebro e na medula espinhal de cães tratados com enalaprilato (inibidor de ECA) ainda ocorria aumento na produção de Ang-(1-7) via Ang I ¹⁰. Após essa descoberta aumentou a curiosidade para a identificação de moléculas responsáveis pela produção de Ang-(1-7), assim como para os possíveis efeitos da Ang-(1-7) no organismo. Um dos primeiros estudos que aponta a Ang-(1-7) como um peptídeo biologicamente ativo foi um estudo *in vitro* em sistema hipotálamo-neuro-hipofisário de ratos. Este estudo demonstrou que a Ang-(1-7), assim como a Ang II, contribui para a liberação de vasopressina ¹¹. Mais tarde, com o trabalho de Campagnole-Santos M.J. e colaboradores concluiu-se a existência de efeito *in vivo* da Ang-(1-7). Este estudo mostrou que a micro injeção de Ang-(1-7) tanto no núcleo medial do trato solitário quanto no núcleo motor dorsal do vago em ratos anestesiados induz à bradicardia e à diminuição da pressão arterial ¹².

A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) catalisa a reação responsável pela conversão da Ang II em Ang-(1-7) por meio da clivagem da fenilalanina na porção C-terminal^{13,14,15}. A Ang-(1-7) também pode ser formada a partir das angiotensinas 1-9 e 1 por

meio da ação de endopeptidases. Em 2003 Santos e colaboradores descobriram que o receptor MAS acoplado à proteína G é o receptor endógeno da Ang-(1-7), o mesmo grupo também descreveu um dos antagonistas para a Ang-(1-7) o pro7-angiotensina-(1-7)¹⁶. A partir dessas descobertas um novo eixo do SRA começou a ser mais profundamente explorado.

Atualmente, o SRA é composto por dois principais eixos, pelo eixo ECA/ Ang II/ AT_{1R} e pelo eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ Mas. O eixo contrarregulador do SRA é representado pelo heptapeptídeo Ang-(1-7), que desempenha um papel importante no sistema vascular e em vários outros tecidos com efeitos, frequentemente, antagônicos aos efeitos atribuídos à AngII¹⁷. Os principais efeitos em decorrência do aumento de atividade do eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ Mas são: (i) vasodilatação, atenuando o efeito vasoconstritor da AngII, (ii) proteção contra fibrose, (iii) cardioproteção, uma vez que a Ang-(1-7) protege contra hipertrofia cardíaca, previne taquicardia e reduz a área de infarto, (iv) diminuição da pressão sanguínea, (v) neuro proteção, (vi) prevenção contra trombose e (vii) prevenção contra inflamação¹⁷⁻²³.

Em 2013 um novo peptídeo do SRA foi identificado. A alamandina é um heptapeptídeo que apresenta alta similaridade com Ang-(1-7). No entanto, a alamandina tem seus efeitos mediados independentes do receptor Mas²⁴.

1.2 ALAMANDINA E MRGD

A Alamandina [Ala1-Ang-(1-7)] é um heptapeptídeo formado a partir da Ang-(1-7) pela ação de uma decarboxilase ou a partir da ação catalítica da ECA2 na angiotensina A (Ala1-AngII). A sequência de aminoácidos da alamandina (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) é semelhante à sequência de aminoácidos da Ang-(1-7) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), a diferença é a presença de alanina no lugar do ácido aspártico na posição 1 do peptídeo^{24,25}.

Além da estrutura, alguns efeitos da alamandina também são semelhantes aos efeitos da Ang-(1-7) (Fig. 2). O tratamento oral com alamandina incluída em HP- β ciclodextrina produz efeito duradouro de diminuição da pressão sanguínea em ratos hipertensos. A alamandina, assim como com a Ang-(1-7), diminui a deposição de colágenos I, III e de fibronectina em ratos tratados com isoproterenol²⁴. A micro injeção de alamandina em áreas cerebrais relacionadas ao controle da pressão sanguínea, como na medula ventrolateral caudal e na medula ventrolateral rostral gerou efeitos de diminuição e aumento da pressão arterial em ratos, assim como a micro injeção de Ang-(1-7)^{25,26}. Além disso, a alamandina exibe efeito vasodilatador em anéis aórticos de ratos e camundongos. Este efeito foi classificado como dependente de óxido nítrico, visto que em anéis aórticos incubados com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME) o efeito vasodilatador da alamandina foi abolido. Entretanto, este efeito foi preservado em anéis aórticos de camundongos *knockout* para o receptor da Ang-(1-7) (MAS)^{24,25}. Indicando que apesar das semelhanças, a alamandina e a Ang-(1-7) poderiam ter seus efeitos mediados por diferentes receptores.

O receptor MrgD surgiu no radar dos pesquisadores, pois algumas angiotensinas (Ang-(1-7), Ang III e Ang IV) são ligantes endógenos de *Mas-related G protein-coupled receptors* (Mrgprs), incluindo uma fraca atração pelo MrgD. Além disso, apesar dos efeitos da Ang-(1-7) serem bloqueados por A-779 e D-Pro7-Ang-(1-7), os efeitos da alamandina são bloqueados apenas com a presença do antagonista D-Pro7-Ang-(1-7). Este antagonista bloqueia tanto o receptor MAS quanto o receptor MrgD. Ademais, anéis aórticos pré-incubados com β -alanina (um aminoácido agonista do receptor MrgD) não apresentaram atividade vasodilatadora induzida pela alamandina. Dessa forma, todos esses resultados levaram à conclusão de que a alamandina é um ligante endógeno do MrgD^{24,25}.

Durante os sete anos que se passaram desde a descoberta alamandina, estudos estão sendo publicados fortificando o potencial deste peptídeo em atuar como anti-hipertensivo e cardioprotetor. Um estudo conduzido por Jesus I.C.G. e colaboradores mostrou que o tratamento com alamandina protegeu cardiomiócitos contra a hipertrofia induzida por Ang II. Este trabalho também mostrou que a alamandina aumenta a liberação de óxido nítrico de forma dependente de AMPK ²⁷. Em outro estudo o mesmo autor mostrou que a alamandina pode influenciar a sinalização de cálcio intracelular, uma vez que melhora a contratilidade de cardiomiócitos de animais mREN regulando a concentração de cálcio por meio da ativação de CaMKII ²⁸. A alamandina altera grandemente parâmetros cardíacos e vasculares que muitas vezes são opostas às alterações causadas pelo excesso de ativação da Ang II. Neste sentido, a sinalização deste desse peptídeo pode ser importante para a determinação do desenvolvimento de cardiomiopatias. Oliveira e colaboradores mostraram que camundongos *knockout* para o receptor MrgD são fortemente propensos a desenvolverem cardiomiopatia dilatada, pois aumentam os volumes diastólico e sistólico final assim como as dimensões do ventrículo esquerdo ²⁹. Enquanto Oliveira mostrou a propensão do desenvolvimento de cardiomiopatia em camundongos que não tem a sinalização da alamandina em funcionamento, Wang L e colaboradores mostraram a propensão da alamandina como tratamento para a fibrose cardíaca. Ratos espontaneamente hipertensos e idosos foram usados como modelo de fibrose cardíaca induzida por hipertensão de longo prazo. O tratamento diário com alamandina diminuiu a pressão arterial, o volume do ventrículo esquerdo e melhorou a fração de ejeção e o encurtamento fracionário ³⁰. O tratamento com alamandina via minibomba osmótica também diminuiu a pressão arterial, fibrose e a hipertrofia em corações de ratos submetidos à cirurgia de 2 rins 1 clip ³¹. A alamandina também mostrou certa proteção vascular em camundongos, uma vez que o tratamento oral

com alamandina impediu o aumento da camada média da aorta ascendente induzido por constrição transversa da aorta (TAC), preveniu o acúmulo de colágeno e o aumento da atividade de metaloproteinase 9 (MMP-9) induzido por TAC. Dessa forma, Souza-Neto F. e colaboradores mostraram que a alamandina foi capaz de reduzir os danos da remodelação da artéria aorta induzidos por TAC ³². De forma interessante, outro estudo também mostrou a diminuição da atividade de MMP-9 via alamandina. Camundongos com aterosclerose tratados com alamandina por via subcutânea apresentaram diminuição na circulação e na expressão de MMP-9 na aorta. Tendo em vista que MMP-9 é secretada por grânulos de neutrófilos, os autores sugerem que a alamandina pode atuar diminuindo a ativação dos neutrófilos granulados ³³. Diversos processos fisiológicos comuns que precisam da expansão do tecido, como por exemplo o desenvolvimento de órgãos ou cicatrização de feridas, utilizam o trabalho das metaloproteinases de matriz para auxiliar na quebra da matrix extracelular. Entretanto, devido à grande importância da matriz extracelular as metaloproteinases e metalopeptidases são frequentemente encontradas de forma desregulada em situações patológicas como no infarto do miocárdio e nas cardiomiopatias ³⁴.

Visto que a alamandina foi descoberta há 7 anos, ainda não sabemos a sinalização exata de seu receptor. Alguns estudos indicam que os efeitos da alamandina parecem influenciar diretamente a via de sinalização de PKA. Por exemplo, o tratamento com alamandina reverteu a disfunção vascular, em coelhos com hiperhomocisteinemia, de forma dependente da sinalização de PKA ³⁵. Em ratos espontaneamente hipertensos o tratamento subcutâneo com alamandina diminuiu a pressão arterial e melhorou parâmetros da hipertrofia cardíaca induzida por Ang II, esses resultados foram acompanhados da diminuição da atividade e expressão de PKA ³⁶. Já em outro estudo a proteína Gq é apontada como mediadora dos efeitos da alamandina via MrgD. Enquanto a Ang-1-7 diminui a expressão de

leptina no tecido adiposo a alamandina aumenta não só a expressão como o nível circulatório de leptina. Este efeito da alamandina sobre a expressão de leptina foi inibido pela ação de um inibidor de fosfolipase C e pelo inibidor da proteína Gq/11. Dessa forma, os autores sugerem que os efeitos da Alamandina pelo receptor MrgD são mediados pela proteína Gq³⁷.

O receptor MrgD faz parte da família dos receptores Mas acoplados à proteína G. Essa família de receptores foi descoberta há mais de 34 anos, são todos expressos em neurônios não peptidérgicos dos gânglios da raiz dorsal. O aminoácido β Alanina é um ligante endógeno do receptor MrgD e é considerado um neurotransmissor que aumenta a inibição e diminui a excitação. O mecanismo de ação da β alanina pelo receptor MrgD acontece por meio do aumento da concentração intracelular de cálcio e diminuição dos níveis de cAMP, mecanismos mediados por proteínas Gq e Gi. Além da β alanina e da alamandina as angiotensinas III e I-7, apesar de fracamente, também se ligam ao MrgD. Contudo, a sinalização da β alanina parece ser diferente da observada para peptídeos, pois a β alanina não é vasoativa. Além disso, por ser uma molécula muito pequena e com estrutura intermediária entre aminoácidos α e γ , a beta alanina pode se ligar a múltiplos receptores³⁸.

A localização dos componentes do SRA é um fator importante para determinar os efeitos locais de cada peptídeo. O receptor MrgD, assim como o receptor MAS, é expresso com maior intensidade nos gânglios da raiz dorsal. Contudo, também é expresso em grande variedade de órgãos, tais como artéria, bexiga, cerebelo, coração, tecido adiposo, tecido muscular esquelético, testículos e útero^{29,39,40,41}. Tendo em vista que os componentes do SRA, incluindo o receptor MrgD, são expressos em tecidos endócrinos, é considerável sugerir que a alamandina exerce efeitos metabólicos. Por enquanto quase nada se sabe sobre os efeitos deste heptapeptídeo sobre o metabolismo. Entretanto, já é postulado o papel

fundamental da Ang II na manutenção da síndrome metabólica assim como o papel contrarregulador da Ang-1-7 inclusive no tecido adiposo.

1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E OBESIDADE

Há muito tempo sabe-se que o SRA tem grande influência no metabolismo e nota-se principalmente a Ang II atuando como o peptídeo do sistema responsável por endossar as consequências metabólicas e vasculares da obesidade. Por outro lado, estudos têm mostrado a Ang-(1-7) como peptídeo protetor do metabolismo, melhorando parâmetros glicêmicos, termogênicos e de adiposidade em organismos obesos.

A obesidade muitas vezes é acompanhada de hiperglicemia, que eleva os níveis de angiotensinogênio e Ang II em vários tecidos. O aumento exagerado da atividade de Ang II desencadeia um círculo vicioso de efeitos que reforçam as implicações da obesidade, como por exemplo (i) favorece a síntese e o acúmulo de lipídeos no tecido adiposo branco de roedores, (ii) aumenta a atividade de enzimas lipogênicas, (iii) favorece alterações vasculares como estresse oxidativo e disfunção endotelial, que também podem causar (iv) aumento da vasoconstrição, (v) inflamação, (vi) ruptura plaquetária e (vii) lesão vascular ^{42,43, 44}.

Em contrapartida, a Ang-(1-7) tem se mostrado eficiente antagonizando os efeitos da Ang II no metabolismo e melhorando os parâmetros cardiovasculares e metabólicos em animais obesos. Neste sentido, o bloqueio do receptor MAS simula um aumento da atividade de Ang II, com aumento da resistência à insulina, da adiposidade, dos níveis de triglicerídeos e diminuição da expressão de PPAR em camundongos *knockout* ^{45, 46, 47}. Não diferente, o aumento da atividade de Ang-(1-7) ou o bloqueio do receptor AT1 significam o oposto da situação apresentada. Ou seja, o aumento circulante de Ang-(1-7) gera proteção contra a disfunção cardiovascular derivada do diabetes e melhora significativa dos parâmetros

glicêmicos e lipídicos ^{48,49,50,51}. Além de disso, um estudo recente mostrou que a Ang-(1-7) aumenta o perfil termogênico no tecido adiposo branco por meio do receptor MAS ⁵².

1.4 TECIDO ADIPOSEO MARROM

A obesidade é definida como acúmulo de gordura em excesso que se torna prejudicial à saúde ⁵³. As consequências da obesidade são graves para a saúde, resultando em uma diminuição significativa da expectativa de vida e predispondo o organismo a uma série de distúrbios metabólicos, cardíacos e sistêmicos. Existem dois tipos de tecidos adiposos, o branco que além de ser um grande órgão endócrino é o principal local de estoque de lipídeos e o tecido adiposo marrom (TAM), responsável pela termogênese adaptativa e o qual tem mostrado grande potencial antiobesidade ⁵⁴.

Primeiramente identificado em marmota, no início do século XVI, o TAM foi caracterizado como um órgão de hibernação responsável por atenuar a mudança abrupta da temperatura externa percebida pelo organismo. Em meados do século XX, este tecido foi reconhecido como um órgão termogênico responsável por aquecer órgãos vitais durante o frio extremo ⁵⁵. Morosamente alguns mecanismos foram identificados, assim como a presença deste tecido em animais não hibernantes, como humanos neonatos. Mais tarde, o TAM foi identificado em todos os mamíferos e se mostrou ativo em humanos adultos ^{56,57,58,59}. Desde a descoberta da presença e atividade do TAM em humanos adultos tem aumentado os estudos publicados que sugerem um efeito antiobesidade para este tecido ^{60,61}.

Sabemos que a obesidade é uma doença de causa multifatorial. Entretanto, a base energética desta doença se dá pelo desequilíbrio entre as calorias ingeridas e o gasto energético. O TAM tem a capacidade de aumentar o gasto energético utilizando lipídeos e glicose para gerar calor. Essa capacidade o faz um promissor alvo contra a obesidade. Em

humanos adultos o TAM diminui o percentual de gordura, aumenta a captação de glicose e a expressão de UCP1 durante exposição ao frio ^{60,61}. Camundongos expostos ao frio e submetidos a uma dieta rica em lipídeo, apesar de aumentarem a ingestão alimentar, diminuíram substancialmente a adiposidade corporal ⁶³. Camundongos geneticamente modificados para o não desenvolvimento do TAM se tornaram obesos ⁶⁴. Diferente dos humanos que não possuem TAM (TAM-) os humanos TAM+ aumentaram a captação e oxidação de glicose, melhoraram a sinalização da insulina e aumentaram o gasto energético quando expostos ao frio ⁶⁵. Tendo em vista que a atividade do TAM envolve o aumento do gasto energético e que a forma de dissipação de energia do TAM funciona como um dos principais órgãos eliminadores da glicose e de triglicerídeos advindos de dieta, de fato são características que tornam o TAM um importante alvo contra a obesidade ^{62,66}.

Os precursores dos tecidos adiposos se originam no mesoderma, contudo os precursores que expressam fatores de transcrição para o desenvolvimento de miócitos também desenvolvem precursores de adipócitos marrons e se originam no mesoderma paraxial. Adipócitos marrons também podem surgir na vida adulta a partir de células-tronco satélites do músculo esquelético ⁶⁷. A assinatura miogênica do TAM é responsável pela expressão de fatores musculares neste tecido ⁶⁸. Alguns fatores de transcrição conhecidos por gerar miócitos e adipócitos marrons são: Eng1, Myf5 e Pax7 ^{69,70,71}. A partir do momento em que essas células podem se diferenciar nos dois tecidos há outra sinalização da qual indica quais células se tornarão adipócitos marrons e quais células se tornarão miócitos. Nesta etapa outros fatores de transcrição ditam o futuro da célula, como por exemplo: Ehmt1, Ppar γ , Prdm16, Ews e Zfp516 ^{72,73}. Além disso, a diminuição da expressão do micro-RNA-133 em células satélites do músculo esquelético determina a ativação de Prdm16 e por tanto também participa do desenvolvimento de adipócitos marrons ⁶⁷.

O tecido adiposo marrom é uma grande vantagem evolutiva para os mamíferos, pois fornece especialmente o mecanismo de termogênese sem tremores, importante para a sobrevivência em períodos de frio intenso. Este mecanismo é possível devido ao grande teor de vascularização, à intensa inervação simpática, ao grande número de mitocôndrias e à presença da proteína desacopladora 1 (UCP1) na membrana interna da mitocôndria ⁷⁴. UCP1 impede o movimento de prótons na cadeia de transporte de elétrons e, portanto, gera calor e diminui a formação de ATP, ou seja, com sua ativação não há gradiente de prótons suficiente para ativar as ATPases. A proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) é uma enzima essencial para o controle da energia celular e é expressa em grande número no TAM. AMPK é facilmente ativada quando os níveis de AMP e ADP aumentam ou pela ação de CaMKK quando há aumento da $[Ca^{++}]_i$. De qualquer forma parece que o ponto de partida para ativação de AMPK é sempre a diminuição de ATP, visto que o aumento de cálcio intracelular pode significar o aumento do trabalho de bombas ATP dependentes, que diminuem a concentração de ATP e conseqüentemente ativam a AMPK. Esta ativação favorece a inibição de processos anabólicos e o aumento dos processos catabólicos, a fim de abastecer os níveis ATP do organismo. A AMPK é essencial para a diferenciação de adipócitos marrons e também favorece a absorção de nutrientes, contribuindo assim para a ativação do TAM ^{75,76,77}.

A termogênese adaptativa é ativada, principalmente, pela exposição constante do organismo ao frio, mas também pode ser induzida por dieta. A termogênese induzida por dieta protege o organismo contra uma ingestão pobre em proteínas e ao mesmo tempo o protege contra o excesso de ingestão calórica, auxiliando no gasto do excesso de energia em estoque. Animais geneticamente modificados que não apresentam tecido adiposo marrom são obesos e mais propensos a desenvolverem diabetes e dislipidemia. Assim como a inanição ou a

diminuição significativa da ingestão alimentar leva à ausência de atividade do tecido adiposo marrom ⁷⁴.

Além da sinalização direta (via estimulação adrenérgica, UCP1, AMPK ou PGC1a) que permite o recrutamento de adipócitos, o tecido adiposo marrom também é influenciado por outros hormônios e sistemas. A proteína quinase A (PKA) tem atividade termogênica, pois sua sinalização favorece a ativação da enzima lipase e conseqüentemente a ativação de UCP1 ^{79,80}. O óxido nítrico também foi identificado como uma molécula termogênica, uma vez que aumenta a biogênese mitocondrial ⁸¹. O SRA é um grande modulador metabólico que apresenta influência positiva para o desenvolvimento e manutenção da obesidade por meio da Ang II e influência negativa por meio da Ang-1-7. Atualmente tem sido investigado o papel deste sistema diretamente no funcionamento do TAM. A Ang II aumenta a atividade termogênica em ratos através do estímulo simpático e conseqüente aumento de UCP1, entretanto este efeito foi abolido em animais obesos ⁸². O tratamento com ECA 2 em animais obesos induzidos por dieta rica em lipídeos aumentou o consumo de O₂, diminuiu o peso corporal, melhorou a sinalização de insulina e da glicose, aumentou a massa de TAM e aumentou a atividade termogênica ⁸³. Camundongos submetidos à dieta rica em lipídeos e tratados com Ang-(1-7) mostraram melhora expressiva nos níveis de glicose e nos padrões termogênicos, esses animais aumentaram a atividade de UCP1, do receptor beta adrenérgico, da PKA, da AMPK e de PRDM16 ⁸⁴. A Ang-(1-7) por meio do receptor MAS aumenta a atividade termogênica transformando adipócitos brancos em adipócitos bege, aumentando a expressão de marcadores do TAM em camundongos obesos ⁵².

Tendo em vista que a atividade do SRA interfere de forma significativa no funcionamento do tecido adiposo acreditamos que a alamandina, por ter estrutura

semelhante à da Ang-(1-7) e atividade mediada por diferente receptor, pode participar de forma importante no metabolismo mediando efeitos por diferentes vias de sinalização.

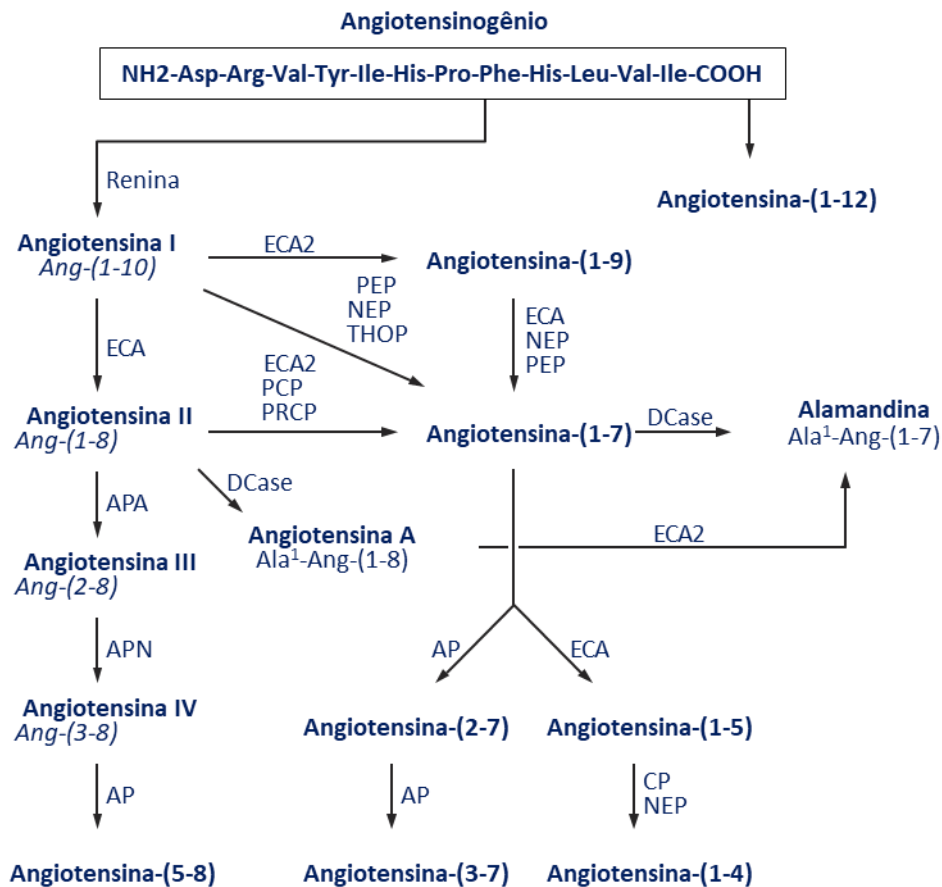


Figura 1. Peptídeos do sistema renina-angiotensina. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; APA, aminopeptidase; APN, aminopeptidase N; PRCP, prolil endopeptidase; PCP, prolilcarboxiendopeptidase; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil endopeptidase; CP, carboxipeptidase; AP, aminopeptidase; Dcase, descarboxilase; THOP, timet oligopeptidase. Esta figura foi modificada a partir da figura 2 do artigo: Santos RAS, et al., The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):505-553.

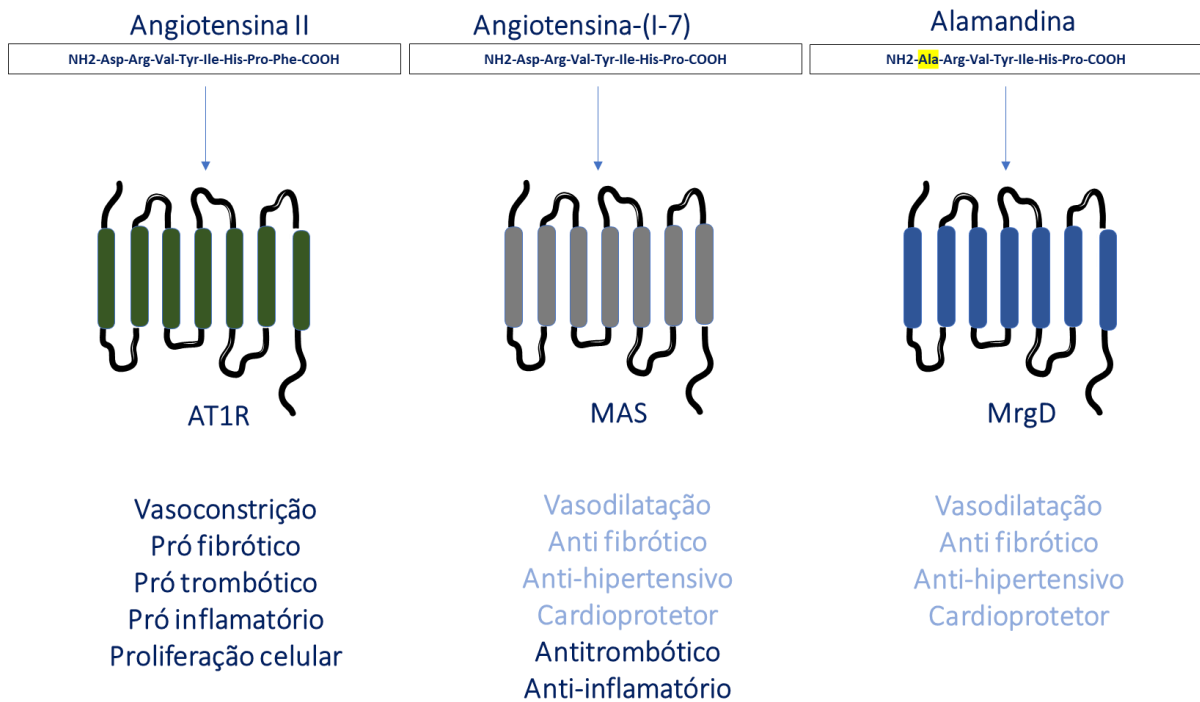


Figura 2. Angiotensina II, Angiotensina-1-7 e Alamandina tem seus efeitos mediados por diferentes receptores. A Ang-(1-7) e a Alamandina compartilham efeitos similares (azul claro), embora mediados por diferentes receptores. A Ang II por meio do receptor AT1 apresenta efeitos antagônicos aos efeitos da Ang-(1-7) e da alamandina. A sequência de aminoácidos da alamandina se diferencia da sequência da Ang-(1-7) pela presença de alanina no lugar do ácido aspártico na porção inicial do peptídeo.

2. OBJETIVOS

2.1 Avaliar as consequências da deleção genética do receptor da alamandina, MrgD, sobre o metabolismo de camundongos C57BL6/J.

2.2 Identificar potenciais grupos-alvo de sinalizações do receptor MrgD no tecido adiposo marrom.

3. MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos *knockout* para o receptor MrgD e camundongos *wild type* C57BL6/J foram obtidos do biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Os camundongos tiveram livre acesso à água e à ração. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura, com ciclos de luz de 12 horas (7:00 às 19:00) e temperatura de $25 \pm 2,0$ °C. A deficiência homozigótica de MrgD foi validada por meio de genotipagem com os seguintes primers: 5' a 3': MrgD-8: CAT GAG ATG CTC TAT CCA TTG GG; rtTA1: GGA GAA ACA GTC AAA GTG CG e MrgD-1: CTG CTC ATA GTC AAC ATT TCT GC. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes internacionais para cuidados com animais e foram aprovados pelo comitê de ética da UFMG (protocolo do CEUA: 189/2018).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os camundongos foram divididos em 2 grupos: dieta padrão (*standard* ST) e dieta rica em glicose (*high glucose diet* HG). Os camundongos foram colocados em dieta HG por 8 semanas. O teste de tolerância à glicose, o teste de sensibilidade à insulina, e o registro de pressão sanguínea foram realizados após a indução da obesidade. Os grupos ST receberam dieta padrão (quimtia Nuvilab[®]) composta por 60% carboidratos, 22% proteínas e 4% gorduras. Os grupos em dieta HG receberam uma dieta feita com 45% de farelo de ração padrão, 45 % de leite condensado da marca Nestlé e 10 % de açúcar refinado da marca união¹¹¹. A dieta HG tem em sua composição 84,5 % de carboidratos, 10,9 % de proteínas e 4,5 % de gorduras.

3.3 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

Para a avaliação do peso corporal, os camundongos foram pesados duas vezes por semana ao longo do estudo. O consumo alimentar e o consumo energético foram calculados subtraindo o peso da ração restante pelo peso inicial.

3.4 PESO DOS TECIDOS

Para avaliar se as mudanças no peso corporal eram reflexo da quantidade alterada de adiposidade, imediatamente após a eutanásia os tecidos adiposos brancos foram pesados, somados e divididos pelo peso corporal individual. A adiposidade foi considerada a soma dos pesos dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico. Tecido adiposo marrom, coração, fígado e pâncreas também foram pesados e tiveram seus valores divididos pelo peso corporal individual.

3.5 TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E DE SENSIBILIDADE À INSULINA

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado em camundongos em jejum (12 horas). Os animais receberam injeção intraperitoneal de glicose (2mg/g). Para medir a glicemia, amostras de sangue foram coletadas por meio de um pequeno corte na extremidade da cauda. Uma gota de sangue foi coletada em 0, 15, 30, 60 e 90 min após a injeção de glicose. O teste de sensibilidade à insulina (TSI) foi realizado por meio de injeção intraperitoneal de 0,75U de insulina/kg. O TSI foi realizado em animais alimentados e uma gota de sangue foi coletada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a aplicação da insulina.

3.6 PRESSÃO SANGUÍNEA

A pressão arterial foi medida através do método de "Volume Pressure Recording" (VPR), usando o sistema não-invasivo de medição da pressão arterial CODA (Kent Scientific

Corporation, Torrington, Conn). O registro foi realizado em sala específica destinada ao experimento e com o mínimo possível de som emitido. Para melhor aclimatação, os animais foram colocados no sistema uma vez por dia durante quatro dias antes das medições da pressão arterial. No quinto dia os animais foram colocados nos suportes individuais sobre a plataforma de aquecimento, os manguitos e os sensores foram colocados próximos à base da cauda e os animais permaneceram por pelo menos 10 minutos para aclimatação e termorregulação até 30 a 35C°. Os parâmetros de seção foram configurados para camundongos; portanto, a pressão máxima de oclusão foi ajustada para 250mmHg, tempo de deflação para 20 segundos, volume mínimo para 15 ml e 5 ciclos de aclimatização antes dos registros finais. Após a aclimatação foram realizados os registros.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ALAMANDINA E ANGIOTENSINAS

Os animais foram anestesiados apropriadamente com ketamina e xilazina. Amostras de sangue foram coletadas diretamente do ventrículo esquerdo com o objetivo de extrair sangue arterial. As amostras de plasma com heparina obtidas foram diretamente estabilizadas usando um coquetel de inibidores de peptidase. O plasma com coquetel foi centrifugado e o sobrenadante armazenado. Os peptídeos foram extraídos apropriadamente com os diluentes: ácido fosfórico 4%, ácido fórmico 5%, acetonitrila e água. Após a extração, os peptídeos foram quantificados por espectrometria de massa LC-MS/MS.

3.8 COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS

Logo após a eutanásia, o sangue foi imediatamente coletado e centrifugado (3200 rpm por 10 min a 4 ° C). Colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL) e glicose foram quantificados por método enzimático por kits comerciais específicos da Labtest.

Os níveis de VLDL e LDL foram calculados com base nos valores de colesterol total, HDL e triglicerídeos de acordo com as seguintes fórmulas: $VLDL = TG/5$ e $LDL = \text{Colesterol Total} - HDL - \text{Triglicerídeos}/5$ (Friedewald T. W. et al., 1972).

3.9 HISTOLOGIA

Análises histológicas foram realizadas a fim de verificar a área de adipócitos de tecidos adiposos branco e marrom. Após a eutanásia, os tecidos foram colocados imediatamente em solução de paraformaldeído por 24h e depois em álcool 70% por 24h, posteriormente seguiu o processamento das amostras até a etapa de parafinização. Foram feitos cortes de 5 μ m, os cortes em lâmina foram devidamente desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados com microscopia de campo claro por meio do microscópio Olympus BX50[®] e software imageJ.

3.10 PCR EM TEMPO REAL

O RNA total do tecido adiposo epididimal e do tecido adiposo marrom foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen Corp.[®]). Foi realizada a leitura das amostras de RNA em nanodrop. Em amostras que se mostraram necessárias a concentração foi corrigida com água depecc a fim de atingir a quantidade de 3 μ g de RNA em volume de 8 μ l. Após a correção as amostras foram tratadas com DNaseI (Sigma-aldrich[®]) para apropriada digestão de possíveis fitas de DNA presentes nas alíquotas. Para a síntese de cDNA foi utilizada concentração de 2 μ g/10 μ l de RNA. As fitas de cDNA foram sintetizadas a partir do RNA por meio da enzima transcriptase reversa, o kit utilizado foi: *High-capacity cDNA Reverse transcription* (Applied biosystem[®]). O cDNA foi amplificado utilizando primers específicos na concentração de 10pmol e *PowerUp sybr green master mix* no ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O volume final para leitura foi de 5 μ l sendo: cDNA1 μ l,

água *nuclease-free* 1µl, primers (F e R) 0,5µl e *sybr green* 2,5µl. A análise de expressão foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para a escolha dos genes de referência testamos três genes (TBP, beta actina e 18s). Entre eles o gene TBP foi selecionado como referência para as análises no tecido adiposo branco e o gene beta actina foi selecionado como referência para as análises no TAM.

3.11 ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo software Graph Pad Prism 9.0. A análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) com múltipla comparação entre os grupos foi utilizada em todos os gráficos que continham mais de uma variância. O teste T de *Student* não pareado foi utilizado na comparação entre dois grupos com apenas uma variância. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estaticamente significativos.

3.12 SEQUENCIAMENTO DE RNA

O RNA total do TAM foi isolado usando o reagente Trizol. O controle de qualidade e quantidade de RNA foram avaliados por bioanalyzer e kit qubit. De todas as amostras, escolhemos as 4 melhores amostras por grupo em relação ao RIN mais agradável (acima de 8), concentração e integridade da estrutura. Bibliotecas pré-fabricadas foram geradas de acordo com o protocolo TrueSeq Stranded mRNA da Illumina pelo Departamento de Genômica do Centro Max Delbrück de Medicina Molecular, Buch, Berlim, Alemanha. As bibliotecas também foram submetidas a experimentos de controle de qualidade para verificar a estabilidade, concentração, tamanho e formato do pico. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq PE150, foram gerados 6,87 Gb de dados por amostra. A próxima etapa foi o controle de qualidade dos dados para garantir que a análise de bioinformática

fosse feita apenas com leituras limpas. Portanto, a distribuição da taxa de erro, distribuição de conteúdo GC e análise de classificação de leituras foram realizadas. Análises bioinformáticas foram geradas para obter expressões diferenciais e resultados de análises de enriquecimento. Para esta proposta foram utilizados diversos softwares: STAR, HTseq, Cufflink, wrappers scripts e ClusterProfiler. O valor P ajustado (P_{adj}) pela análise de Benjamini e Hochberg $<0,05$ ou o valor de $-\log_{10}(p_{adj}) < 1,3$ foram considerados significativamente enriquecido. E para a expressão de genes segundo a análise de DEG (*differential gene expression*, análise de expressão diferencial) o valor de $p < 0,05$ foi considerado diferencialmente expresso. A empresa Novogene realizou o experimento de sequenciamento de RNA e análise bioinformática.

As análises de enriquecimento contribuem para a identificação de grupos de genes associados entre si e que se relacionam com vias de sinalização, mecanismos e doenças. GO, Ontologia Genética é uma análise de enriquecimento que utiliza uma base bioinformática unificada de classificação dos genes e de seus atributos. Inclui três ramos principais: comparação celular (CC), função molecular (MF) e processo biológico (BP). Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto (KEGG) é um recurso de banco de dados online que fornece vias de sinalização a nível molecular. O Reactoma é um banco de dados que fornece reações de processos biológicos a nível celular.

4. RESULTADOS

4.1 TECIDO ADIPOSEO MARROM

A ausência do receptor MrgD levou à atrofia robusta do TAM (redução do peso TAM/peso corporal) (Fig. 3A). Após a indução da obesidade, observamos uma resposta oposta, animais MrgD/KO HG aumentaram o TAM em comparação não apenas ao seu próprio controle ST, mas

também em comparação ao grupo WT HG (Fig. 3B). Além disso, recém-nascidos MrgD/KO (5 dias de idade, prole de camundongos MrgD/KO ST) também apresentaram diminuição do TAM (Fig. 3C). É importante notar que os consumos alimentar e energético não foram diferentes entre os camundongos MrgD KO e WT (Fig. 4). Portanto, a diminuição do peso do TAM não pode ser atribuída à diferença na ingestão de alimentos ou energia.

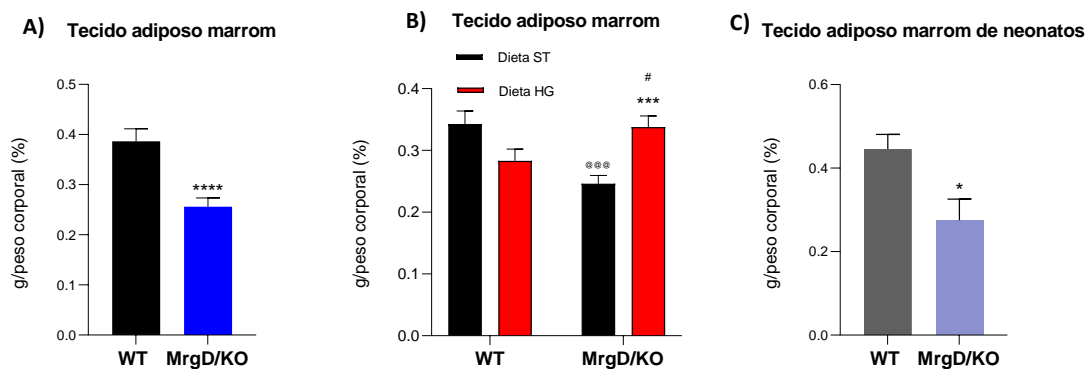


Figura 3 A. Peso do tecido adiposo marrom, animais com 8 semanas de idade. B. Tecido adiposo marrom após dieta HG. C. Peso do tecido adiposo marrom em camundongos com 5 dias de vida. * P<0,05; ***P < 0,001; ****P < 0,0001 @ = Diferença entre MrgD/KO ST vs WT ST. # = Diferença entre MrgD/KO HG e WT HG.

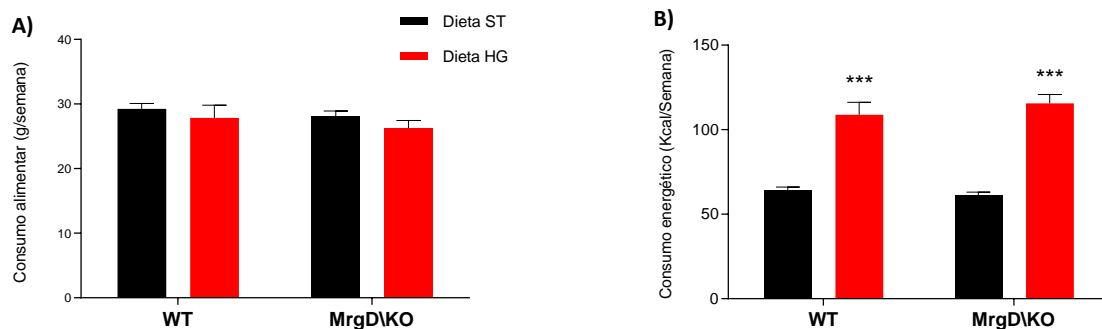


Figura 4. A. Consumo alimentar. B. Consumo energético. N=8. ***P < 0,001.

4.2 PESO CORPORAL

Os camundongos MrgD/KO apresentam maior peso corporal em comparação ao controle C57BL6/J independentemente da dieta. O peso corporal basal foi medido antes da separação

entre os grupos de dietas ST e HG (Fig. 5 A). Após 2 meses de indução da obesidade, ambos os grupos MrgD/KO ST e HG ainda exibiam maior peso corporal em comparação aos camundongos WT nas respectivas dietas ST ou HG (Fig. 5 B). Além disso, os recém-nascidos MrgD/KO (5 dias de idade, prole de camundongos MrgD/KO ST) também exibiram maior peso corporal em comparação aos camundongos WT (Fig. 5 C). Portanto, esse padrão parece ser independente também da idade.

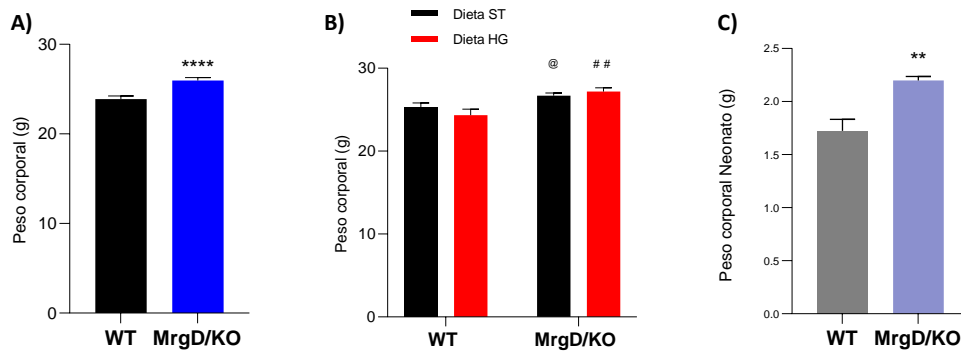


Figura 5. A. Peso corporal n=40. B. Peso corporal após dieta HG n=20 C. Peso corporal de camundongos neonatos n=5. * P<0,05; **P < 0,01. **** P < 0,0001. @ = Diferença entre MrgD/KO ST vs WT ST. # = Diferença entre MrgD/KO HG e WT HG.

4.3 PRESSÃO SANGUÍNEA

Não houve diferença estatísticas entre os grupos. Em todos os grupos a pressão arterial média tem valores semelhantes, entre 100 e 150mmHg (Fig. 6).

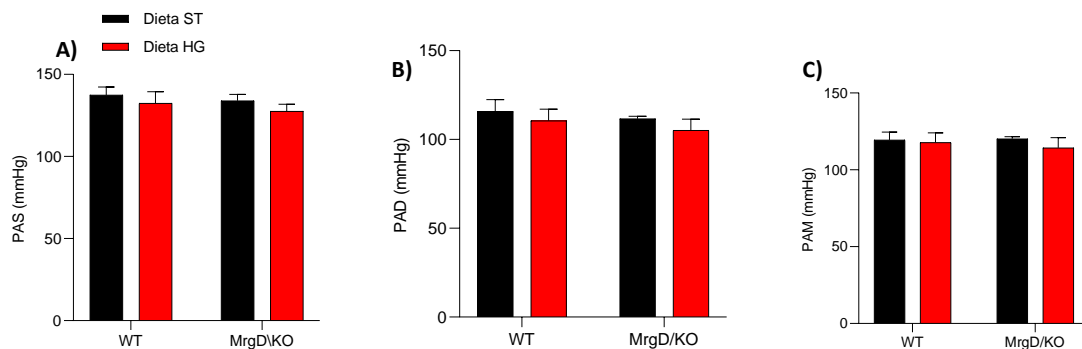
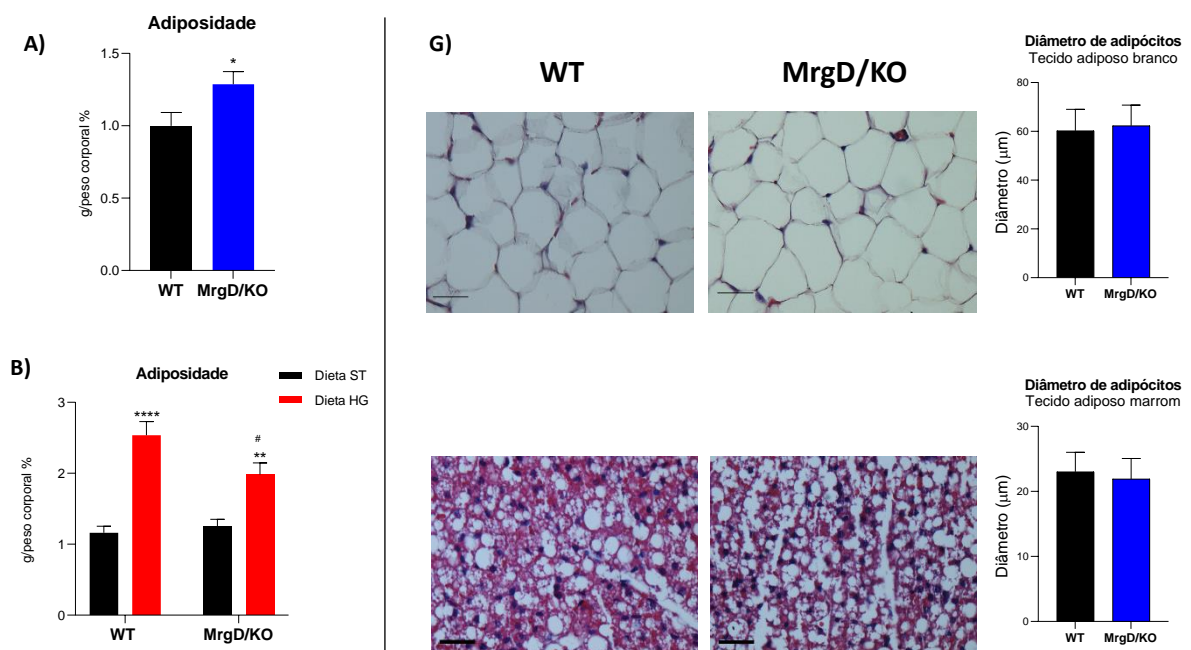


Figura 6. Pressão sanguínea. A. Pressão arterial sistólica (PAS). B. Pressão arterial diastólica (PAD) e C. Pressão arterial média (PAM). n=8.

4.4 ADIPOSIDADE

A adiposidade basal foi medida em outros grupos de camundongos com a mesma idade do início do experimento, antes da separação entre os grupos ST e HG (animais com 8 semanas). Os camundongos MrgD/KO mostraram aumento da adiposidade em comparação aos camundongos WT (Fig 7. A). No entanto, em animais mais velhos, que passaram pelo período de 2 meses de separação para formarem os grupos de dietas ST e HG, o grupo MrgD/KO ST exibiu adiposidade semelhante em comparação ao grupo WT ST. Ou seja, nos animais MrgD/KO a adiposidade parece diminuir com a idade. Embora não estatisticamente significativo, o grupo MrgD/KO ST apresentou uma média de adiposidade maior em comparação ao grupo WT ST (1,247 vs 1,162, respectivamente. P valor = 0,54). Este ligeiro aumento da adiposidade foi devido ao aumento do tecido adiposo branco mesentérico (Fig. 7 C). O grupo MrgD/KO em dieta HG exibiu menor adiposidade em comparação ao grupo WT HG. Além disso, ambos os grupos (MrgD/KO e WT) em dieta HG aumentaram com sucesso o conteúdo de tecido adiposo branco em comparação ao seu próprio controle ST. No entanto, o grupo WT HG aumentou a adiposidade de forma mais significativa (Fig. 7 B).



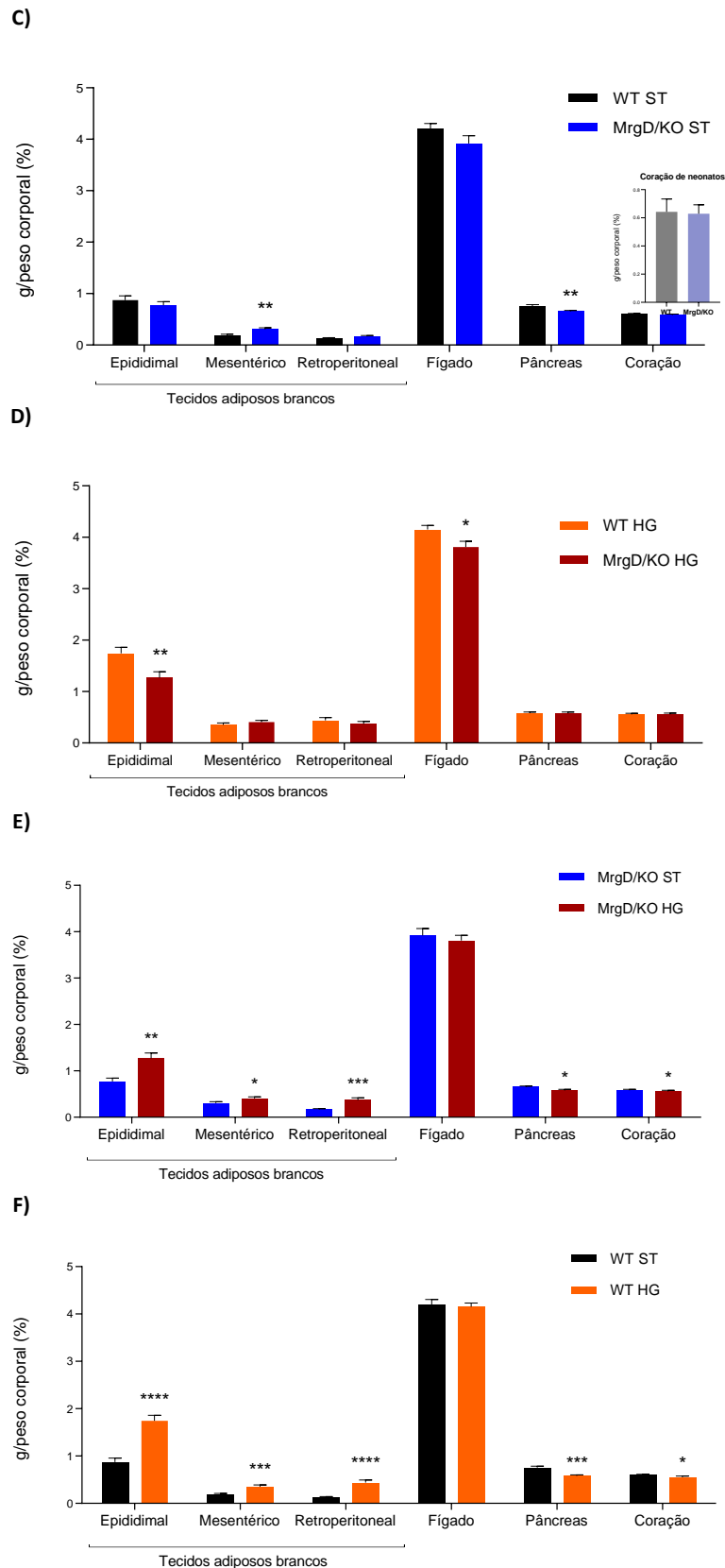


Figura 7. A) Adiposidade entre os animais MrgD/KO e WT. **B)** Adiposidade após dieta HG. **C)** Comparação entre MrgD/KO ST e WT ST e Peso do coração de camundongos com 5 dias de vida. **D)** Comparação entre MrgD/KO HG e WT HG. **E)** Comparação entre MrgD/KO HG e MrgD/KO ST. **F)** Comparação entre WT HG e WT ST. **G)** Histologia em HE dos tecidos adiposos branco epididimal e marrom e diâmetro dos adipócitos n=3. * P<0,05; ***P < 0,001; # = Diferença entre MrgD/KO HG e WT HG. n=20.

4.5 PESO DO CORAÇÃO, FÍGADO E PÂNCREAS

O peso do coração não foi diferente entre os grupos MrgD KO ST e WT ST, nem em adultos nem em neonatos (Fig. 7 C). No entanto, a obesidade induziu uma diminuição na proporção do peso do coração em camundongos WT HG em comparação ao seu próprio controle ST (Fig. 7 F). A dieta HG diminuiu a proporção de peso do fígado em MrgD/KO HG em comparação com o grupo WT HG (Fig. 7 D). A obesidade também diminuiu a proporção do peso do pâncreas em ambos os grupos MrgD/KO e WT (Fig. 7 C e F). No entanto, a diminuição da proporção do pâncreas foi menos significativa entre os grupos MrgD/KO (Fig. 7 E). Além disso, os camundongos MrgD/KO ST mostraram peso do pâncreas reduzido em comparação ao grupo WT ST (Fig. 7 C).

4.6 COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS

Os grupos HG apresentaram colesterol total aumentado em relação aos seus respectivos controles. Não foram observadas diferenças entre os grupos nos níveis de triglicerídeos, HDL, VLDL e LDL (Fig. 8).

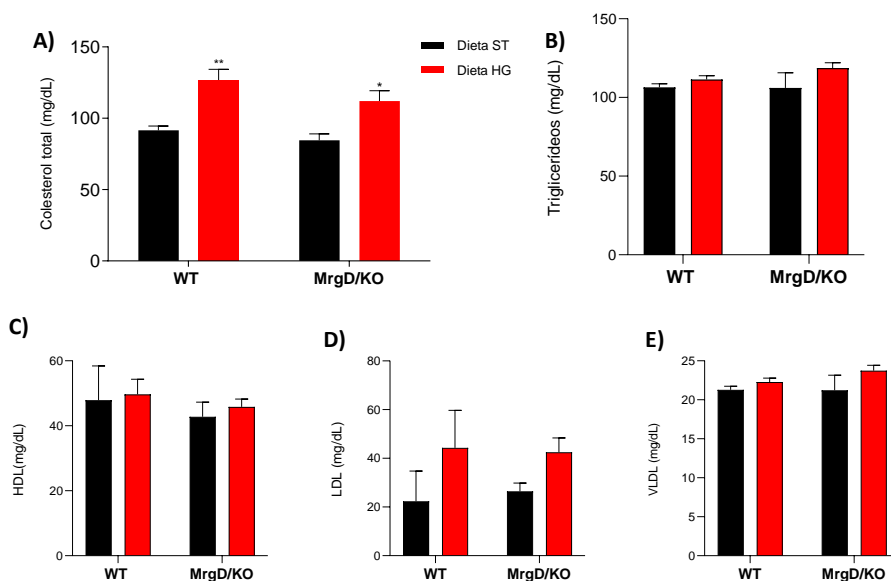


Figura 8 A) Colesterol total. B) Triglicerídeos. C) Lipoproteína de alta densidade (HDL). D) Lipoproteína de baixa densidade (LDL). E) Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) n=8. *P < 0.05; **P < 0.01.

4.7 PERFIL DA GLICEMIA

A sensibilidade à insulina não foi alterada entre os grupos (Fig. 9 A). No teste de tolerância à glicose (TTG), os camundongos WT HG em jejum mostraram tolerância à glicose diminuída juntamente com um aumento na glicemia em jejum (testado no dia da eutanásia) (Fig. 9 B e C). De acordo com a análise de área sob a curva, os camundongos MrgD/KO HG aumentaram os níveis de glicose no TTG em comparação com MrgD/KO ST (* Pvalue = 0,0145). No entanto, o grupo WT HG apresentou maior glicemia na área do gráfico sob a curva (**** Pvalue <0,0001) (Fig. 9 B). Este resultado demonstrou que MrgD pode desempenhar um papel importante na homeostase da glicose.

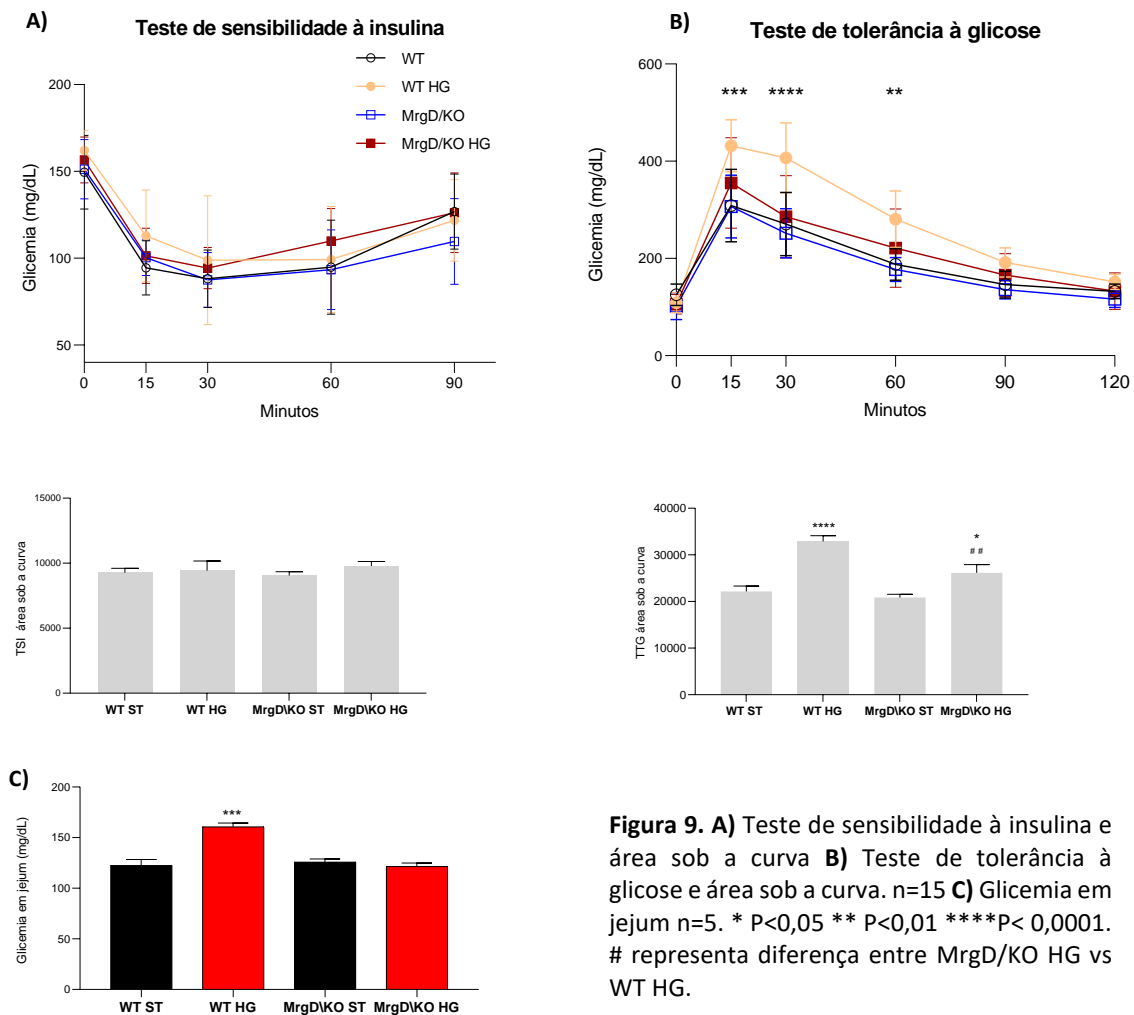


Figura 9. A) Teste de sensibilidade à insulina e área sob a curva **B)** Teste de tolerância à glicose e área sob a curva. n=15 **C)** Glicemia em jejum n=5. * P<0,05 ** P<0,01 ****P < 0,0001. # representa diferença entre MrgD/KO HG vs WT HG.

4.8 NÍVEIS CIRCULANTES DE ALAMANDINA E ANGIOTENSINAS I, II E I-7

O grupo MrgD KO ST diminuiu os níveis de alamandina em comparação com ao grupo WT ST. Curiosamente, quando submetidos à dieta HG, os camundongos MrgD KO HG aumentaram os níveis circulantes de alamandina em comparação ao grupo WT HG. Também digno de nota foi o fato da obesidade diminuir os níveis de alamandina, uma vez que camundongos WT HG reduziram a circulação de alamandina em comparação ao grupo WT ST. Nenhuma diferença estatística foi observada nos níveis plasmáticos de Ang I, Ang II e Ang-(1-7). No entanto, observamos uma tendência dos níveis de Ang-(1-7) em responder da mesma maneira que os níveis de alamandina considerando a dieta HG e o genótipo (Fig. 10).

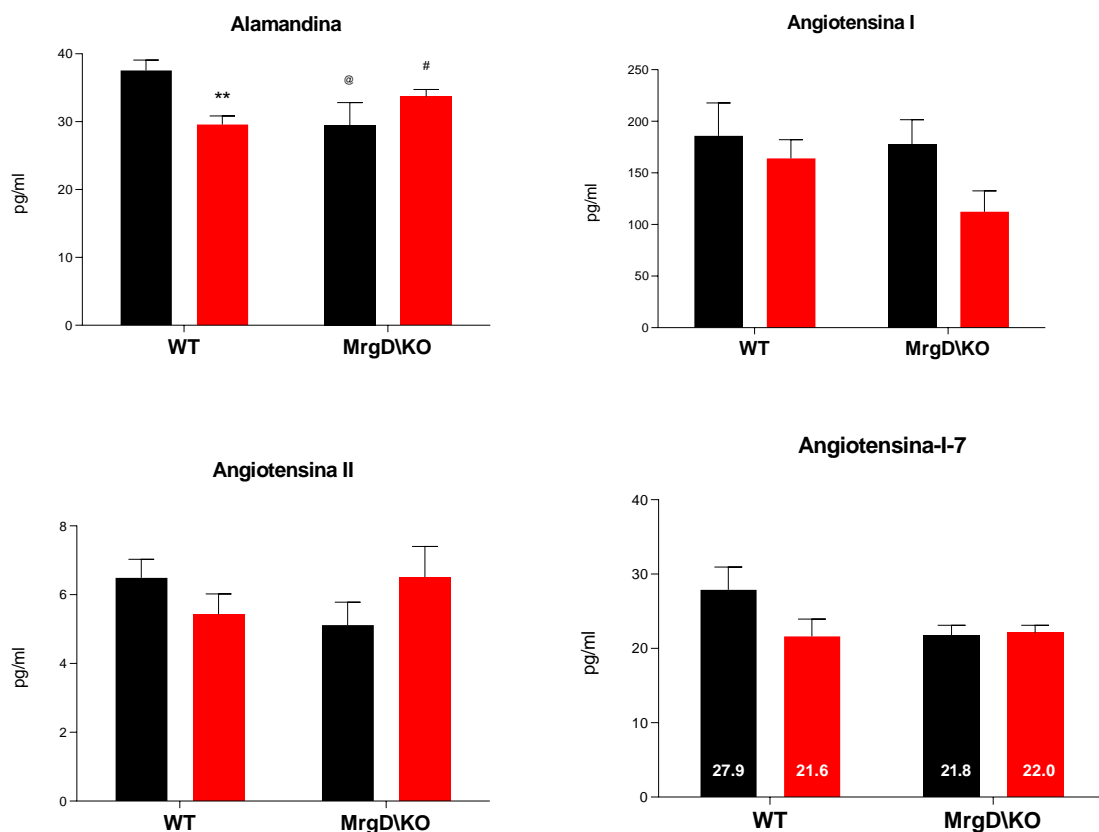


Figura 10. Níveis circulantes de alamandina e angiotensinas I, II e I-7. n=8. @ representa a diferença entre MrgD/KO ST vs WT ST e # representa a diferença entre MrgD/KO HG e WT HG. * P<0,05; ** P<0,01. No gráfico da Angiotensina-1-7, os números nas barras representam a média de cada grupo.

4.9 EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO SRA NOS TECIDOS ADIPOSOS

A hipótese deste trabalho é a de que o receptor MrgD desempenha um papel importante no metabolismo, dessa forma se torna essencial validar a expressão deste receptor nos tecidos metabólicos mais notórios. O PCR em tempo real confirmou que o receptor MrgD é expresso em tecidos adiposos branco e marrom de camundongos WT. Descobrimos que a obesidade induzida pela dieta HG reduziu substancialmente a expressão de MrgD no TAM. No tecido adiposo branco a expressão de MrgD mostrou resultados semelhantes entre camundongos ST e HG (Fig. 11). Além disso, no tecido adiposo branco a expressão do receptor MAS está aumentada nos grupos MrgD/KO. Já no TAM não houve diferença na expressão do receptor MAS. No TAM os camundongos MrgD/KO HG aumentaram a expressão de AT_{2R} em comparação ao grupo WT HG. Já no tecido adiposo branco não houve diferença (Fig. 12). O RNASeq também mostrou resultados interessantes em relação ao SRA, a análise de expressão diferencial (DEG) mostrou aumento da regulação para o gene que codifica ECA em animais MrgD/KO ST em comparação ao grupo WT ST (valor P = 0,008) e também mostrou aumento da regulação para o gene que codifica o receptor AT1 em animais MrgD/KO HG em comparação com WT HG (valor P = 0,02).

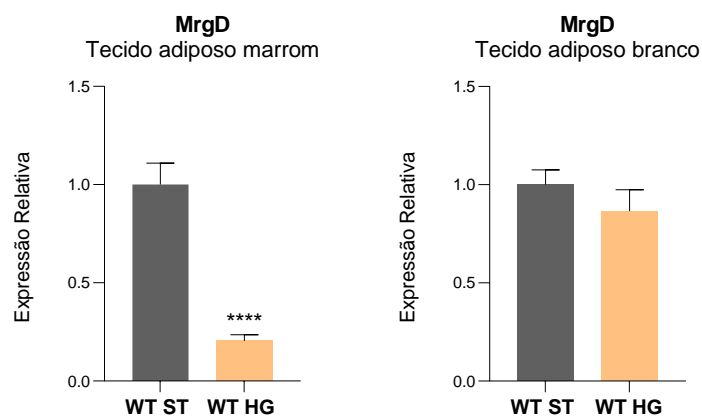


Figura 11. Expressão do receptor MrgD no tecido adiposo marrom e no tecido adiposo branco epididimal de camundongos C57BL6/J ST e HG. n=8.

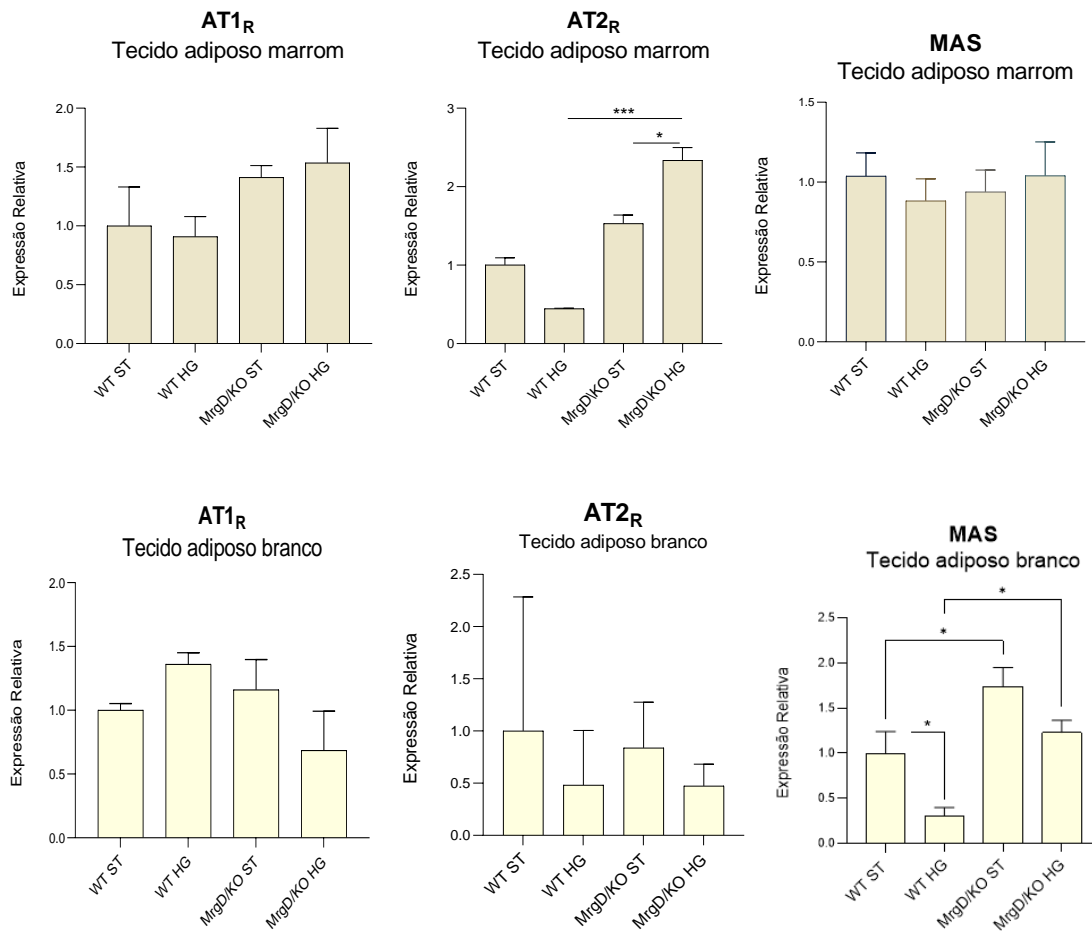


Figura 12. PCR em tempo real de receptores do SRA. Expressão dos receptores do SRA no tecido adiposo marrom (gráficos marrons) e no tecido adiposo branco (gráficos amarelos). O N variou de 4 a 5. * $P < 0,05$. *** $P < 0,001$.

4.10 TRANSCRIPTOMA

4.10.1. A OBESIDADE INDUZ MUDANÇAS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO TAM (COMPARAÇÃO ENTRE WT HG VS WT ST)

Camundongos WT HG regularam a expressão de 1148 genes no TAM em comparação ao grupo WT ST (Fig. 13 A). Os marcadores clássicos associados à ativação do TAM foram regulados positivamente no grupo WT HG (Fig. 15). As análises revelaram o enriquecimento significativo de vias relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos, ao metabolismo de carboidratos e à termogênese (Fig 16). Além disso, as análises GO e Reactoma revelaram o enriquecimento de termos e reações que compreendem componentes mitocondriais (Fig. A2

e A3). Explorando mais profundamente as vias do ciclo do ácido cítrico, da fosforilação oxidativa, da glicólise e da termogênese, observamos um número substancial de genes regulados positivamente, incluindo genes que codificam enzimas-chave. Aqui, mostramos que o TAM de camundongos WT teve o desempenho esperado frente a um desafio hipercalórico. A dieta HG aumenta o trabalho mitocondrial nos adipócitos marrons, regulando a expressão de enzimas e coenzimas responsáveis pelo metabolismo dos nutrientes e transformando-os em calor, energia livre ou estoque de energia de acordo com a quantidade de entrada dos nutrientes.

4.10.2. A ATIVAÇÃO DO EIXO ALAMANDINA/MRGD É IMPORTANTE PARA UMA RESPOSTA CONVENCIONAL À DIETA HG (COMPARAÇÃO ENTRE MRGD/KO HG VS MRGD/KO ST)

A análise DEG mostrou que os camundongos MrgD/KO em dieta HG regularam a expressão de 45 genes em comparação ao grupo MrgD/KO ST (Fig. 13). Dentre esses genes, 31 não alteraram sua expressão entre os grupos WT HG e WT ST. Esses resultados chamaram a nossa atenção, uma vez que se presume que os camundongos MrgD/KO HG não regularam a expressão de 1134 genes no TAM em resposta a uma dieta HG (Fig. 14). Basta observar o número de genes regulados para supor que a ausência do receptor MrgD é importante para a resposta convencional do TAM a um desafio hipercalórico. A análise de KEEG revelou que os genes regulados positivamente foram agrupados em 6 vias: sinalização de PPAR, degradação de ácidos graxos, metabolismo de ácidos graxos, adipocitocina, peroxissomo e sinalização PI3K-Akt (Fig. 16 B). Genes regulados negativamente foram agrupados em GO *terms*, vias e reações basicamente relacionadas à atividade e estrutura ribossomal (Fig. 16, A2, A3 e A6). Quase todas as vias enriquecidas relacionadas aos genes regulados positivamente ocorreram devido ao aumento da expressão de apenas dois genes: acetyl Coenzyme A acyltransferase 1B

(Acaa1b) e acyl CoA synthetase long-chain family member 3 (Acsl3) (pvalor = 8.8897e-8 e 0.00013593), o que sugere um aumento no metabolismo lipídico. Acsl3 é responsável pela formação de acil-CoA pelo catabolismo de ácidos graxos de cadeia longa e Acaa1b codifica a enzima tiolase mitocondrial importante para a beta-oxidação. A expressão de FNDC5 também foi aumentada nos animais MrgD/KO HG (pvalor = 0,02). Apesar deste gene não estar incluído nas vias enriquecidas é importante considerá-lo pois ele codifica irisina, uma importante miocina com efeitos antiobesidade. O aumento da expressão dos genes Acaa1b e Acsl3 é esperado frente a um desafio de dieta HG. No entanto, foi uma mudança mínima em relação ao número de genes regulados e em contraste às alterações observadas em WT HG (por exemplo, a comparação entre a via da termogênese Fig. A7). Por outro lado, aparecem vias enriquecidas na comparação entre os grupos MrgD/KO que não foram reguladas entre os grupos WT. O enriquecimento na via ribossomal foi codependente da dieta HG e do *knockdown* do receptor MrgD, uma vez que os genes que codificam proteínas ribossomais não foram alterados nem nas comparações entre WTHG vs WTST e nem entre MrgD/KO vs WT (tanto em dieta HG quanto em dieta ST). Oito genes que codificam proteínas ribossomais foram regulados negativamente em camundongos MrgD/KO pela dieta HG (Fig. A6). A atividade do ribossomo é fundamental para todos os processos celulares, portanto a diminuição da expressão de seus componentes sugere um obstáculo para o TAM produzir proteínas e funcionar corretamente, principalmente em uma situação de desafio energético. A via de sinalização PI3K-Akt também foi enriquecida na comparação entre MrgD/KO HG vs MrgD/KO ST (Padj = 0,047). Essa via está envolvida na sinalização do receptor MAS e é importante para uma ampla gama de processos celulares, como metabolismo, crescimento celular e sobrevivência celular. O grupo MrgD/KO HG apresentou 3 genes dessa via regulados positivamente (fator de crescimento de fibroblastos 1, homólogo do fator de Von Willebrand

e fosfoenolpiruvato carboxicinase 1 citosólico) e 1 gene regulado negativamente (G β γ). Embora a via de PI3K-Akt tenha sido enriquecida, as expressões dos genes PI3K e AKT aumentaram apenas na comparação entre WTHG vs WTST (pvalor = 0,0003 e 0,002).

A ausência do receptor MrgD levou a uma resposta inesperada à dieta HG. Os animais KO não regularam a expressão de genes que codificam proteínas termogênicas e mitocondriais.

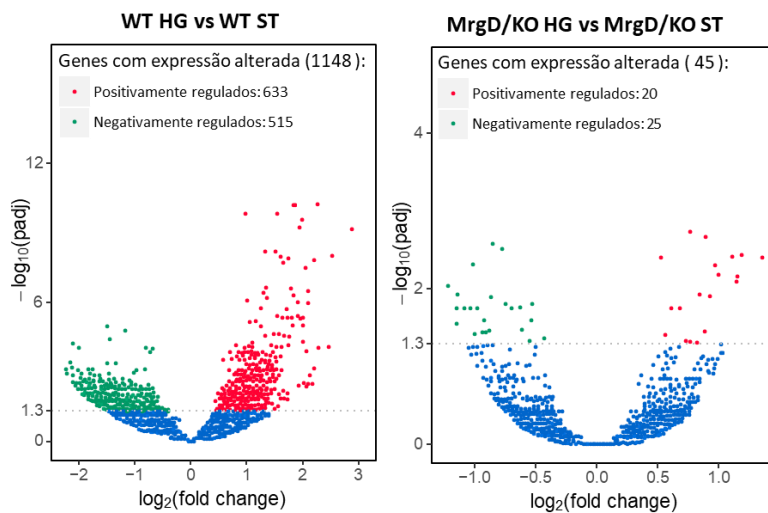


Figura 13. Análise de expressão diferencial de genes. O gráfico do lado esquerdo representa a comparação entre os grupos WT HG vs WT ST e o gráfico do lado direito representa a comparação entre os grupos MrgD/KO HG vs MrgD/KO ST. O eixo horizontal indica a diferença de expressão dos genes, o eixo vertical indica o grau estatisticamente significativo de mudanças nos níveis de expressão dos genes, quanto menor o valor de padj, maior o $-\log_{10}(\text{padj})$, mais significativa é a diferença. Cada ponto representa um gene, os pontos azuis indicam que não há diferença significativa, os pontos vermelhos indicam genes de expressão diferencial regulados positivamente, os pontos verdes indicam genes de expressão diferencial regulados negativamente.

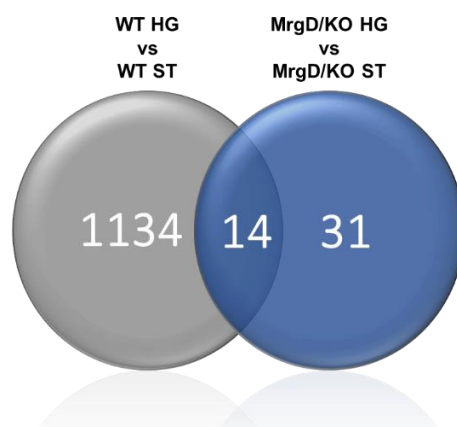


Figura 14. Diagrama de Venn comparando o número de diferentes genes expressos em cada comparação. O grupo WT HG regulou 1134 genes em relação ao grupo WT ST (cinza), o grupo MrgD/KO HG regulou apenas 31 genes em relação ao grupo MrgD/KO ST (azul). A sobreposição entre as comparações (azul + cinza) indica que apenas 14 genes foram comumente regulados.

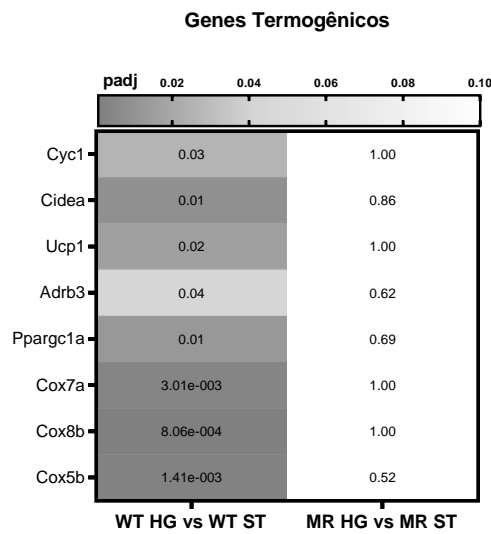


Figura 15. Heatmap ilustrando os níveis de expressão diferencial de genes termogênicos.

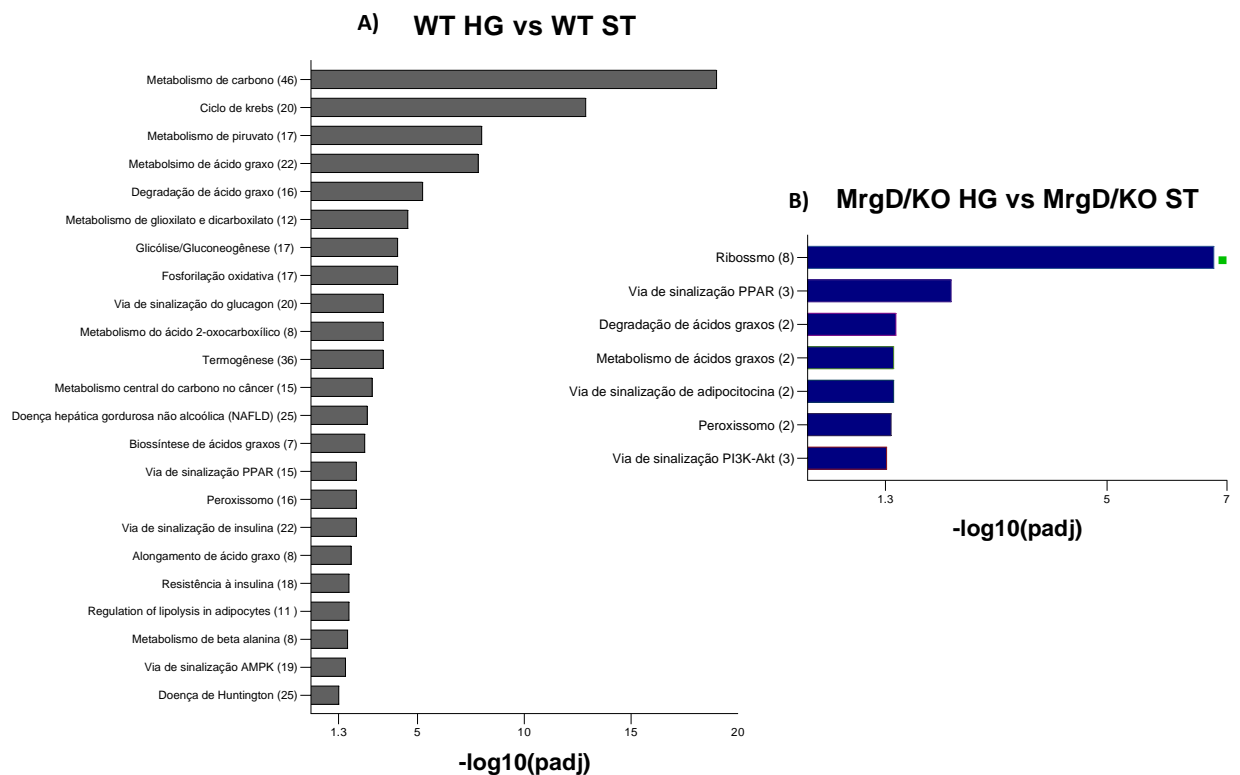


Figura 16. Análise de enriquecimento KEGG. Nestes gráficos estão representadas as vias de sinalização mais enriquecidas de cada comparação. **A)** Comparação entre os grupos WT HG e WT ST. As vias mais enriquecidas foram relacionadas a genes regulados positivamente. **B)** Comparação entre os grupos MrgD/KO HG e MrgD/KO ST. Apenas sete vias foram enriquecidas. A via de ribossomo foi enriquecida por genes regulados negativamente (ponto verde). As demais vias foram enriquecidas por genes regulados positivamente. O número de genes regulados em cada via está entre parênteses.

4.10.3. A AUSÊNCIA DO RECEPTOR MRGD LEVOU A UMA REGULAÇÃO NEGATIVA DO PADRÃO DE TRANSCRITOS NO TAM E ENRIQUECEU VIAS DE CARDIOMIOPATIAS (COMPARAÇÃO ENTRE MRGD/KO ST VS WT ST)

A análise de expressão diferencial revelou 476 genes regulados no TAM de animais MrgD/KO ST vs WT ST. Curiosamente, os genes regulados negativamente representam a maioria, incluindo 445 genes (Fig. 17).

Os animais MrgD/KO regularam negativamente diversos genes próprios de cardiomiócitos e miócitos. Os adipócitos marrons são originados a partir do mesmo precursor de miócitos e por isso apresentam uma assinatura miogênica (Timmons J A et al., 2007). Na situação de dieta controle o TAM de animais MrgD/KO ST apresenta um padrão de expressão conhecido por promover cardiomiopatias (Fig. 18 e A8). Esses resultados fortalecem os estudos que apontam o eixo alamandina/MrgD como importante para a função cardíaca. Entre os genes regulados responsáveis por enriquecer as vias de cardiomiopatias a titina se destaca como a proteína mais influente pela análise de centralidade de PPI. A titina tem influência na atividade ou expressão de 42 dos genes regulados, sendo que 30 desembocam na titina (*indegree*) e 12 acontecem a partir da titina (*outdegree*).

Os genes regulados negativamente, que foram a maioria na comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST, enriqueceram também GO *terms* relacionados ao desenvolvimento dos miócitos, à contratilidade cardíaca e ao transporte de íons cálcio (Tabela A1). A análise de reactoma revelou reações enriquecidas também relacionadas à contração muscular, condução cardíaca e homeostase de íons, além da reação do metabolismo do glicogênio (Fig. A4). É interessante percebermos que a comparação WT HG vs WT ST se assemelha à comparação MrgD/KO ST vs WT ST em relação a genes regulados negativamente e agrupados em termos referentes à função muscular e transporte de íons (Fig. A1 e tabela A4).

Os genes regulados positivamente enriqueceram o GO *terms* do trímero do colágeno e 3 reações do reactoma (biossíntese do colágeno e enzimas modificadoras, formação do colágeno e eliminação do heme do plasma) (Tabela A2). De acordo com a análise de DEG o grupo MrgD/KO ST regulou positivamente alguns genes da matriz extracelular (MEC) (Tabela A3). Entretanto, a regulação de genes da MEC teve uma extensão muito maior em animais MrgD/KO HG comparados com WT HG (veja a seguir no próximo tópico). Os animais MrgD/KO ST diminuíram de forma muito expressiva a expressão de FNDC5 (valor de $p = 0,0000016964$).

Muito notável foi a quantidade de ATPases e canais iônicos regulados para baixo (Tabela 1). O equilíbrio de íons é importante para o correto funcionamento da célula e afeta o metabolismo e os mecanismos associados aos adipócitos. A homeostase de íons aparece como reação enriquecida na análise de reactoma (Fig. A4). É interessante notar que os genes regulados que codificam canais de íons são todos relacionados a canais de cálcio e de potássio. Além disso, todas as ATPases reguladas são componentes da cadeia de transporte de elétrons em adipócitos marrons (Tabela 1). Esses resultados sugerem um desequilíbrio na concentração de ATP e íons no TAM de camundongos MrgD/KO.

A ausência do receptor MrgD também regulou alguns genes relacionados ao metabolismo. Confirmamos por PCR em tempo real a expressão desses genes, assim como a expressão de alguns genes relacionados à cardiomiopatia (Fig. 19). Um dos genes regulados do qual foi importante para o enriquecimento de várias vias foi o PRKAA. Este gene codifica a subunidade alfa da AMPK. Os camundongos MrgD/KO ST diminuem a expressão de PRKAA cerca de 3,504 vezes (resultado do RNA Seq. valor de $P = 0,000016$) comparado aos animais WT ST. A regulação de AMPK contribuiu para o enriquecimento de 19 vias em camundongos MrgD/KO ST. Por ser um importante sensor energético, a AMPK influencia uma série de

mecanismos como metabolismo de proteínas, metabolismo de lipídios, metabolismo de glicose e homeostase mitocondrial (Fig. A10).

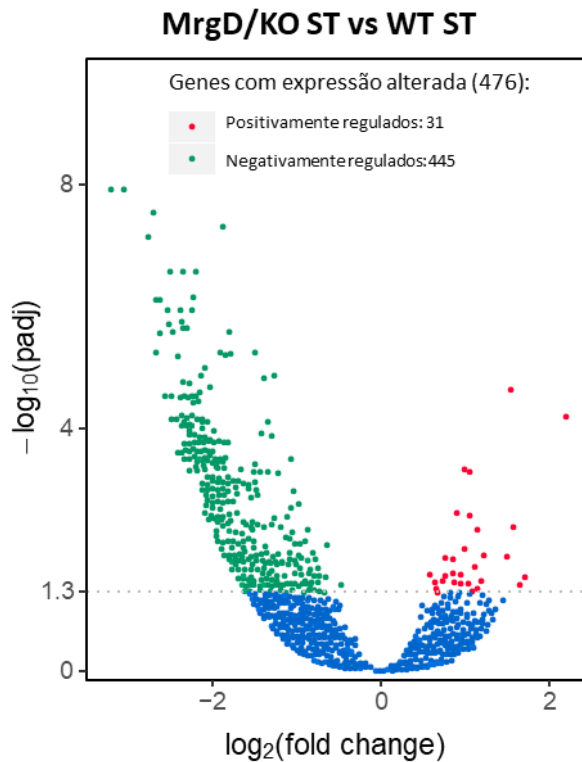


Figura 17. Análise de expressão diferencial de genes entre os grupos MrgD/KO ST e WT ST. O eixo horizontal indica a diferença de expressão, o eixo vertical indica o grau estatisticamente significativo de mudanças nos níveis de expressão dos genes, quanto menor o valor de padj, maior o $-\log_{10}(\text{padj})$, mais significativa é a diferença. Cada ponto representa um gene, os pontos azuis indicam que não há diferença significativa nos genes, os pontos vermelhos indicam genes de expressão diferencial regulados positivamente, os pontos verdes indicam genes de expressão diferencial regulados negativamente. Os animais MrgD/KO ST regularam ao todo 476 genes em relação ao grupo WT ST. A maioria dos genes foi regulada negativamente (445) e apenas 31 genes foram regulados positivamente.

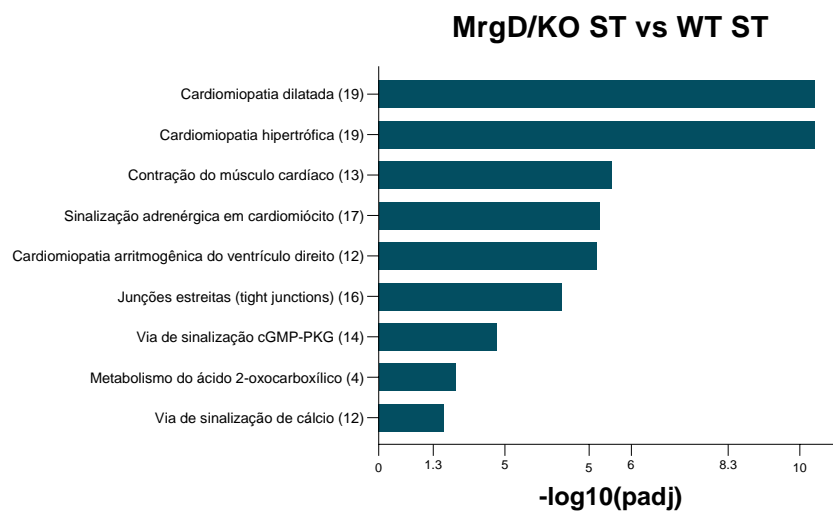
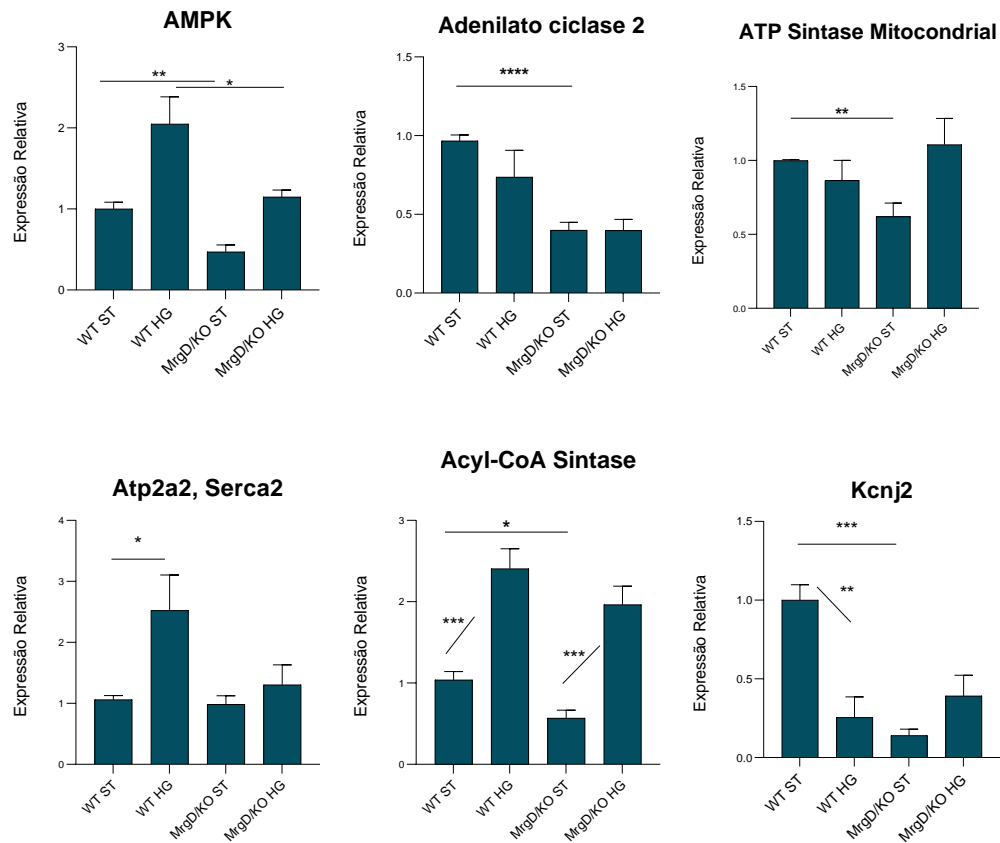


Figura 18. Análise de enriquecimento KEGG. Vias de sinalização mais enriquecidas na comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST. Todas as vias foram enriquecidas por genes regulados negativamente.

Tabela 1. Expressão de genes que codificam canais iônicos e fatores da cadeia transportadora de elétrons (CTE). Comparação entre os grupos MrgD/KO ST vs WT ST.

Gene	P valor	Log2FoldChange	
Cacng6	0,00431	-2,312	
Cacna1s	0,00001	-2,143	
Cacng1	0,00001	-2,111	
Cacna2d1	0,00001	-2,052	
Kcnj12	0,00001	-2,185	
Kcnma1	0,00284	-2,357	
Kcna7	0,00002	-2,042	
Kcnc1	0,00001	-2,085	
Kcnq5	0,00104	-1,593	
Kcnf1	0,0001	-1,962	
Nqo1	0,00011	-1,845	CTE
Atp5g1	0,00002	-1,77	CTE
Atpaf1	0,01657	-0,816	CTE
Ndufaf5	0,04203	-0,603	CTE
Atp5j	0,00827	-0,551	CTE
Atp5g3	0,03766	-0,455	CTE

*CTE, cadeia transportadora de elétrons.



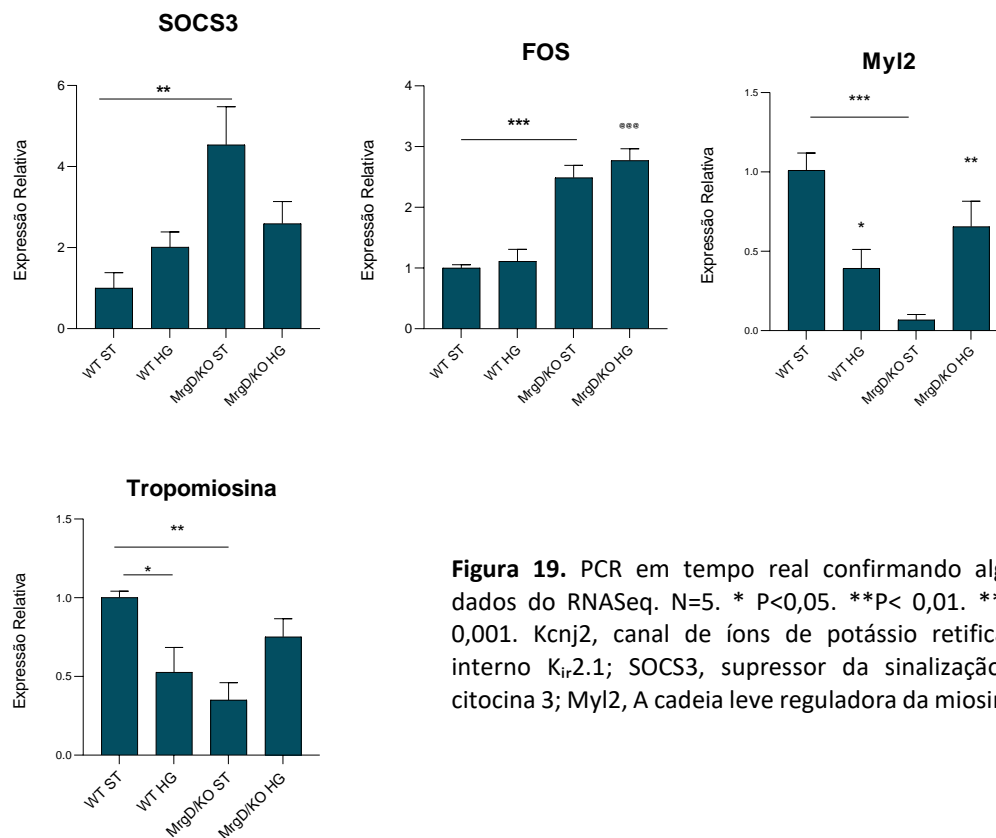


Figura 19. PCR em tempo real confirmando alguns dados do RNASeq. N=5. * P<0,05. **P< 0,01. ***P< 0,001. Kcnj2, canal de íons de potássio retificador interno Kir2.1; SOCS3, supressor da sinalização de citocina 3; Myl2, A cadeia leve reguladora da miosina 2.

4.10.4. CAMUNDONGOS MRGD/KO HG DIMINUEM A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE RECRUTAMENTO DO TAM E AUMENTAM A EXPRESSÃO DE GENES DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) (COMPARAÇÃO ENTRE MRGD/KO HG VS WT HG)

Os camundongos MrgD KO HG regularam a expressão de 521 genes no TAM em comparação aos camundongos WT HG (Fig. 20). Genes regulados negativamente foram agrupados principalmente em GO *terms* referentes à estrutura mitocondrial e ao metabolismo lipídico (Fig. 21). Uma vez que, o grupo WT HG aumentou dramaticamente a expressão de genes relacionados à atividade do TAM e que o grupo MrgD/KO HG não seguiu este ajuste, esperava-se que esses genes fossem, de fato, regulados negativamente na comparação entre MrgD/KO HG vs WT HG (como por exemplo, UCP1, Pgc1a, citocromo c oxidase 5A, adenilil ciclase, NADH-ubiquinona oxidoreductase e Carnitina-acilcarnitina translocase). Os genes regulados negativamente enriqueceram 22 vias na análise KEGG e 13 reações de reactoma

também essenciais para a atividade do TAM, tais como metabolismo do carbono, ciclo de krebs, metabolismo dos ácidos graxos e via da AMPK (Fig. 22 e A5). Além disso, 6 termos referentes à estrutura mitocondrial foram enriquecidos por genes regulados negativamente no TAM de animais MrgD/KO HG vs WT HG (Tabela A5).

Os termos, reações e vias mais enriquecidos que compreendem os genes regulados positivamente foram todos relativos à MEC, à angiogênese e ao tecido conjuntivo (Fig. 21, 22 e A5). Foi demonstrado que a obesidade diminui a eficiência dos tecidos na recuperação do trauma. Esta observação é baseada em estudos que mostram alterações na expressão gênica e no nível de proteínas de componentes da MEC, por exemplo, diminuição da expressão de Lox e colágeno e aumento da expressão do inibidor tecidual de metaloproteinase (Gihring A et al 2020). Curiosamente, os camundongos MrgD/KO HG mostraram aumento da expressão de vários genes relacionados à MEC (Tabela A3). Esta regulação também aparece entre os animais MrgD/KO ST vs WT ST, entretanto é mais significativa na comparação entre MrgD KO HG vs WT HG. Portanto, parece ser uma regulação associada à ausência do receptor MrgD e agravada pela dieta HG.

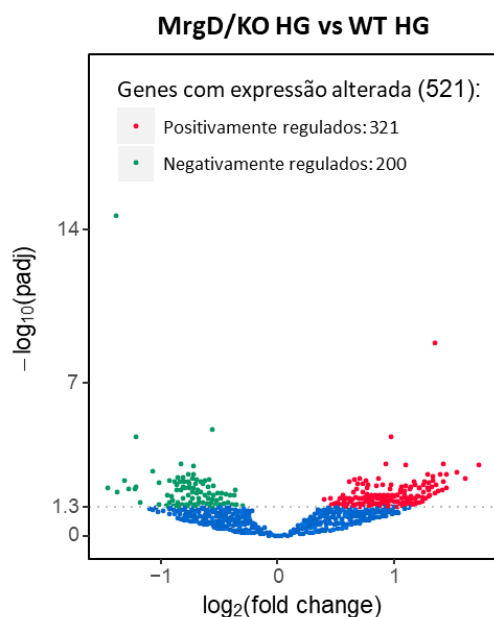


Figura 20. Análise de expressão diferencial de genes entre os grupos MrgD/KO HG e WT HG. O eixo horizontal indica a diferença de expressão genes, o eixo vertical indica o grau estatisticamente significativo de mudanças nos níveis de expressão dos genes, quanto menor o valor de padj, maior o $-\log_{10}(\text{padj})$, mais significativa é a diferença. Cada ponto representa um gene, os pontos azuis indicam que não há diferença significativa nos genes, os pontos vermelhos indicam genes de expressão diferencial regulados positivamente, os pontos verdes indicam genes de expressão diferencial regulados negativamente. Os animais MrgD/KO HG regularam ao todo 521 genes em relação ao grupo WT HG. 321 genes foram regulados positivamente e 200 genes regulados negativamente.

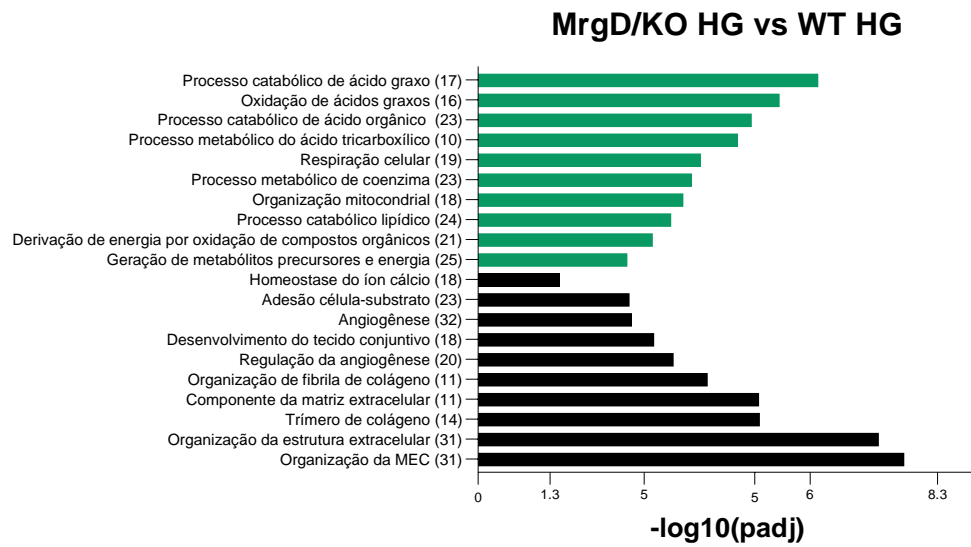


Figura 21. Análise de enriquecimento GO. Termos mais enriquecidos na comparação entre MrgD/KO HG vs WT HG. Barras verdes representam os termos enriquecidos por genes regulados negativamente e barras pretas representam os termos enriquecidos por genes regulados positivamente. O número de genes regulados está em parênteses.

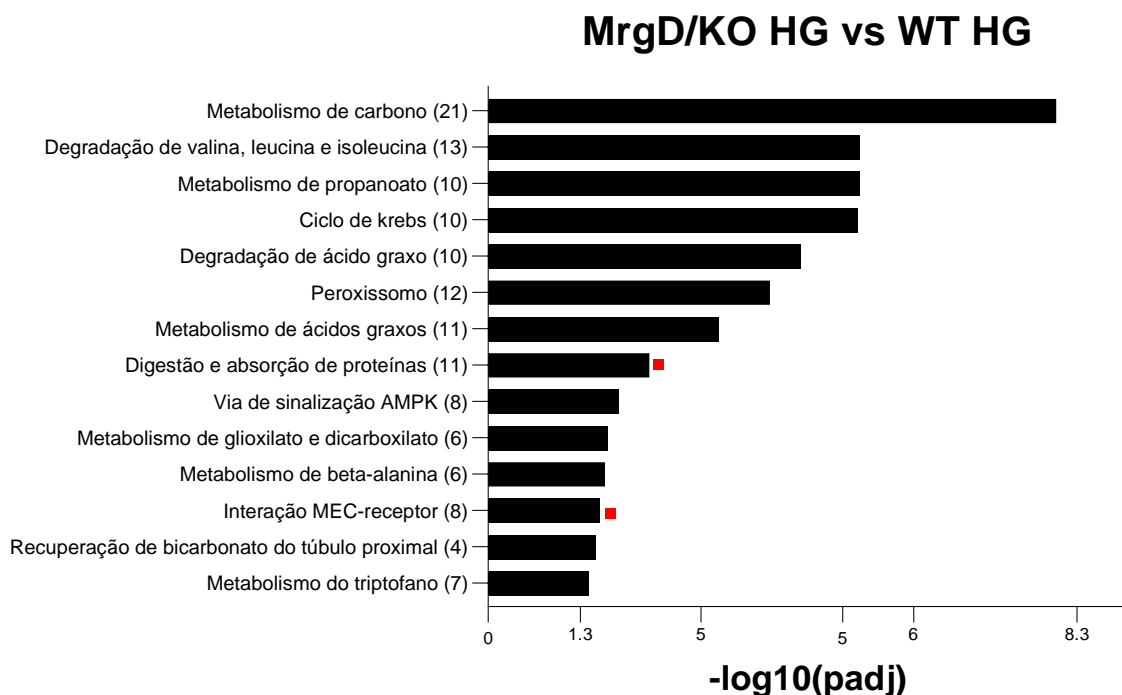


Figura 22. Análise de enriquecimento KEGG. Vias de sinalização mais enriquecidas na comparação entre MrgD/KO HG vs WT HG. As vias marcadas com ponto vermelho foram enriquecidas por genes regulados positivamente. Todas as outras vias foram enriquecidas por genes regulados negativamente. O número de genes regulados em cada via está entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho mostramos que o TAM depende do receptor MrgD para exibir padrão normal de expressão gênica e para responder a uma dieta rica em carboidrato. Reforçamos ainda o papel cardioprotetor da alamandina, uma vez que na ausência do receptor MrgD vias de sinalização relacionadas à cardiomiopatia também foram enriquecidas.

O SRA representa forte conexão entre a obesidade e suas consequências metabólicas. Este elo pode ser prejudicial ou benéfico para o organismo obeso, dependendo do peptídeo e do receptor ativado. O aumento dos efeitos da Ang II por meio de AT1_R auxilia no desenvolvimento e na manutenção da obesidade^{42,43,44}. Em contraste, os efeitos da Ang-1-7 através do receptor MAS reduzem os desequilíbrios metabólicos e vasculares causados pela obesidade⁴⁵⁻⁵². Neste sentido, os níveis circulantes de peptídeos do SRA são responsáveis por grandes alterações metabólicas. Aqui nós mostramos que a obesidade diminuiu tanto os níveis de alamandina circulante quanto a expressão de MrgD no TAM de animais WT HG, sugerindo que o eixo Alamandina/MrgD pode ser importante para o metabolismo (Fig. 10 e 11). A propósito, na ausência do receptor MrgD animais KO diminuíram os níveis de alamandina circulante quando submetidos à dieta padrão (Fig. 10). Este resultado coincide com a análise de *cluster* mostrada pelo *heatmap* do qual sugere uma proximidade maior dos animais MrgD/KO com os animais WT HG do que com o grupo WT ST (Fig. A1). Entretanto, o grupo MrgD/KO aumentou os níveis de alamandina quando em dieta HG em comparação ao grupo WT HG (Fig. 10). Os animais MrgD/KO HG aumentaram a expressão do receptor AT2 no TAM. Além disso, a expressão do receptor Mas no tecido adiposo branco diminuiu em animais WT HG e, de forma interessante, aumentou nos grupos MrgD/KO (Fig. 12). Visto que o eixo ECA2/Ang-(1-7) representa benefícios ao organismo obeso, o aumento da atividade dos receptores MAS e AT2, juntamente com o aumento dos níveis de alamandina e Ang-(1-7)

circulantes podem representar fatores benéficos de contra regulação que auxiliam os animais MrgD/KO à manterem o tecido saudável. Por outro lado, o aumento da expressão de ECA e de AT1_R (observado na análise DEG) no TAM de camundongos MrgD/KO ST pode contrapor os efeitos da Ang-(1-7). Entretanto, não observamos diferenças estatísticas nos níveis de Ang II circulante.

Além dos níveis de peptídeos do SRA, a profunda diminuição do TAM em camundongos MrgD/KO ST também foi surpreendente (Fig. 3). A diminuição no peso do TAM não pode ser interpretada sozinha como diminuição da atividade, pois também pode estar relacionada ao maior uso de estoques lipídicos, significando, neste contexto, um aumento no recrutamento de adipócitos marrons ⁷⁴. No entanto, de fato, a histologia em HE não mostrou diferença na área dos adipócitos preenchidos com lipídios, nem no TAM nem no tecido adiposo epididimal (Fig. 7). A análise do transcriptoma nos mostrou que entre os 476 genes regulados pelo grupo MrgD/KO ST em comparação ao grupo WT ST, 445 foram regulados negativamente (Fig. 17). A hexoquinase1 (Hk1) representa um dos poucos genes com expressão aumentada na comparação MrgD/KO ST vs WT ST (com valor de $p = 0,001$), essa enzima fosforila a glicose para formar a glicose-6-fosfato. HK1 se conecta ao *voltage-dependent anion-selective channel 1* (VDAC1) na membrana mitocondrial e por isso aumenta a fosforilação oxidativa mitocondrial da glicose. Visto que VDAC1 permite a passagem de ATP da mitocôndria para o citoplasma, a atividade de HK1 e VDAC1 ocorre na tentativa de aumentar a atividade mitocondrial e os níveis de ATP no citoplasma ⁸⁵⁻⁸⁷. Por outro lado, VDAC1 tem expressão diminuída nos animais MrgD/KO ST (Pvalor = 0,00034) o que nos indica que pouco ATP está em trânsito. Ao mesmo tempo, o fato de o *cluster* de genes da cadeia transportadora de elétrons ser regulado negativamente nos animais MrgD/KO ST (Tabela 1) nos leva à interpretação de que há um desequilíbrio no nível de ATP, visto que entre esses genes 5 codificam ATPases. Com o

aumento de atividade termogênica por UCP1, tem-se naturalmente a diminuição da atividade de ATPses. Entretanto, os marcadores termogênicos clássicos e genes diretamente relacionados ao recrutamento e ativação de adipócitos marrons (UCP1, PgC1a e PPARg) não tiveram a expressão alterada na comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST. Esses resultados indicam que provavelmente há um desequilíbrio energético, porém também indicam que a termogênese adaptativa dependente de UCP1 não é alterada no TAM dos animais MrgD/KO ST.

Em resposta à dieta HG espera-se o aumento da termogênese, do aporte de glicose e de lipídios, assim como o aumento da estimulação das vias de sinalização responsáveis pelo metabolismo desses nutrientes⁸⁸. Os camundongos WT HG responderam de maneira esperada ao aumento do consumo calórico. No entanto, além os camundongos MrgD/KO HG mostraram resistência à dieta HG comparado aos animais MrgD/KO ST, uma vez que além de não desenvolverem intolerância à glicose não regularam no TAM mais de 1100 genes, incluindo marcadores referentes ao aumento do metabolismo. É evidente que a ausência do receptor MrgD levou a alterações no TAM, mas não foi possível relacionar as alterações de peso do TAM com alterações no nível de recrutamento de adipócitos. Considerando a drástica regulação negativa na expressão de transcritos entre MrgD/KO ST vs WT ST, assim como a ausência de resposta à dieta entre os grupos MrgD/KO podemos presumir que há um desequilíbrio funcional no TAM desses animais que pode estar relacionado à regulação de outros agrupamentos de genes, que não só metabólicos.

Genes regulados positivamente entre MrgD KO ST e WT ST (31 genes) codificam, sobretudo, proteínas referentes à matriz extracelular, à angiogênese e às proteínas do tecido conjuntivo. O acúmulo de componentes da MEC, principalmente colágenos e fibronectina, é encontrado no tecido adiposo de modelos animais obesos, prejudicando significativamente

sua expansão e contribuindo para o aumento da hipóxia e inflamação ⁸⁹. A fibrose do tecido adiposo está fortemente relacionada ao aumento do colágeno tipo VI alfa 1 (Col6a1), bem como à sinalização do fator transformador de crescimento beta (TGFB). A propósito, esses genes são regulados positivamente em ambos os grupos de MrgD/KO comparados aos grupos WT. O Col6a1, em organismos saudáveis, é importante para a estabilidade do tecido e suporte molecular. O TGFB ativa fibroblastos promovendo o acúmulo de componentes da MEC, além disso o TGFB também colabora inibindo a diferenciação de adipócitos bege ⁸⁹. O TGFB pode ser ativado pela trombospondina-1⁹⁰, que também é regulada positivamente em camundongos MrgD/KO. Camundongos obesos *knockout* para Col6, apesar de apresentarem instabilidade da MEC no tecido adiposo branco, melhoraram os parâmetros metabólicos, aumentaram o diâmetro dos adipócitos e preveniram a fibrose do tecido adiposo ⁹¹. Visto que os animais MrgD/KO regulam positivamente os fatores da MEC e que essa regulação atinge ainda maior número de genes após a dieta HG, esses resultados indicam que camundongos MrgD/KO podem apresentar TAM rígido, com excesso de colágeno e, principalmente, quando submetidos à dieta HG, apresentam desequilíbrio maciço da MEC, o que pode prejudicar a função de reparo tecidual. Embora os camundongos MrgD KO tenham regulado positivamente os componentes dos genes da MEC no TAM, eles também aumentaram a expressão de um agrupamento de genes que codificam metaloproteinases (Tabela A3). As metaloproteinases são endopeptidases zinco-dependentes que desintegram os colágenos e outros componentes da matriz extracelular ⁹². Portanto, o aumento da expressão de metaloproteinase pode indicar uma maneira de amenizar os efeitos do excesso de colágeno, principalmente em camundongos MrgD/KO HG. Isso pode estar relacionado a um efeito atenuante que permitiu o aumento do peso do TAM observado após a dieta HG em animais KO (Fig. 3). Estes dados estão de acordo com estudos que mostram a diminuição de metaloproteinase via

alamandina^{33 e 93}. O FNDC5 codifica a irisina, um hormônio termogênico e protetor contra a obesidade⁹⁴⁻⁹⁶. Curiosamente, o grupo MrgD/KO ST em comparação a camundongos WT ST mostrou uma regulação negativa de FNDC5, já o grupo MrgD/KO HG aumentou a expressão de FNDC5, o que também pode indicar um mecanismo de compensação. Nesse aspecto, as metaloproteinases em conjunto com a regulação positiva do FNDC5 poderiam melhorar as consequências metabólicas dos animais MrgD/KO, aparecendo nos resultados como a resistência à dieta HG.

Desde a descoberta da alamandina, já está estabelecida uma forte associação do eixo alamandina/MrgD com a função cardíaca. Por exemplo, a alamandina reduz profundamente o acúmulo de colágenos I, III e fibronectina em camundongos tratados com isoproterenol²⁵. Além disso, Oliveira e colaboradores mostraram que os camundongos *knockout* para o receptor MrgD produziram um aumento nos volumes diastólico e sistólico final e um aumento nas dimensões do ventrículo esquerdo caracterizando a cardiomiopatia dilatada²⁹. Neste contexto, a análise KEGG do RNAseq de camundongos MrgD/KO ST vs WT ST apontou resultados curiosos. A cardiomiopatia dilatada e a cardiomiopatia hipertrófica foram as vias mais enriquecidas (Fig. 18). Os adipócitos marrons têm a mesma origem dos miócitos, expressando fatores mais especializados no catabolismo de nutrientes do que os adipócitos brancos⁶⁸. Portanto, a expressão de importantes elementos de cardiomiócitos no TAM se deve à sua assinatura miogênica. As surpresas aqui foram a ocorrência de um padrão de expressão gênica, em TAM, conhecido por endossar cardiomiopatias (sem qualquer estímulo de dieta, drogas ou cirúrgico) e uma intensa regulação de vários genes relacionados ao coração em TAM de camundongos MrgD/KO ST (Tabela A1). Esses resultados apoiam as descobertas de que o eixo alamandina/MrgD é importante para a função cardíaca.

As vias de cardiomiopatias foram enriquecidas pela regulação negativa de agrupamentos de genes que codificam proteínas estruturais, como integrina, sarcoglicanos, troponina T2 cardíaca, miosinas, tropomiosina 2 beta e titina, bem como vários genes que codificam canais iônicos, ATPases mitocondriais e AMPK. A titina é a maior proteína encontrada em mamíferos, está localizada na extensão do sarcômero, protegendo-o estruturalmente ⁹⁷. É expressa também em tecidos adiposos, mas não se sabe ainda a função da titina para tecidos endócrinos. Entretanto, de acordo com as análises de centralidade (*protein-protein interaction*) a titina foi a proteína com maior influência entre os genes regulados entre os animais MrgD KO ST vs WT ST. Neste sentido, a titina parece ser uma proteína muito importante para a interação entre alamandina/MrgD. Extrapolando um pouco para a função da titina no músculo cardíaco temos que, (i) a ausência de titina está relacionada a um menor recuo elástico após a contração ventricular; (ii) a hipertensão induzida pela ativação do SRA também é associada à fosforilação da titina e (iii) a ausência de titina em animais transgênicos levou à cardiomiopatia dilatada ⁹⁸. As integrinas contribuem para a adesão celular, para a organização da matriz extracelular e estão envolvidas na modificação da MEC durante a diferenciação de adipócitos. No coração, a redução de integrinas leva à fibrose progressiva e ao desenvolvimento de cardiomiopatia ⁹⁹. A miosina fornece suporte estrutural ao sarcômero e modula a atividade ATPase relacionada à contratilidade cardíaca em resposta à estimulação adrenérgica ¹⁰⁰. Apesar do papel clássico nos músculos esqueléticos e cardíaco não está estabelecido se essas proteínas estruturais exercem efeitos na sinalização metabólica no TAM. No entanto, com todos esses agrupamentos de genes que codificam proteínas estruturais regulados para baixo no TAM, os camundongos MrgD/KO são mais propensos a desenvolverem ineficiência da MEC, bem como falhas na comunicação de suas células com o meio externo. É interessante percebermos que na condição basal, com dieta ST e sem

estímulos metabólicos, a ausência do receptor MrgD é mais responsável pela regulação de genes que codificam proteínas estruturais do que genes que codificam proteínas reconhecidas por regular o metabolismo.

O grande número de canais de cálcio, canais de potássio e ATPases mitocondriais regulados para baixo nos animais MrgD/KO também chamaram nossa atenção. A baixa expressão de canais de cálcio sugere menor entrada de cálcio no citoplasma. No entanto, algumas bombas de cálcio específicas da membrana mitocondrial também foram reguladas para baixo, indicando baixa entrada de cálcio na mitocôndria e conseqüente acúmulo de cálcio no citoplasma. As concentrações de cálcio intra e extracelular são importantes para diversas vias metabólicas, sinalização cardíaca e sinapses. Estudos mostram que as concentrações intra e extracelulares de cálcio e potássio podem interferir na sinalização da adipogênese ¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Além disso, a ciclagem do cálcio é uma forma de termogênese adaptativa independente de UCP1. Esta pode acontecer por meio do aumento da atividade de creatina kinase mitocondrial (CKMT) e por meio do aumento da ciclagem do cálcio entre retículo endoplasmático e citoplasma via RyR2 e ATP2A2 ¹⁰⁵. Foi mostrado que AMPK pode proteger contra a obesidade aumentando também a sinalização para a termogênese independente de UCP1, provavelmente por meio de aumento da ciclagem de cálcio ¹⁰⁶. Visto que, animais MrgD/KO apresentam diminuição da expressão de diversos canais iônicos, CKMT2, ATP2A2 e AMPK (dados da análise DEG) é possível que haja uma regulação desfavorável a esse tipo de termogênese na ausência do receptor MrgD. Entretanto, essa relação deve ser mais profundamente estudada.

Segundo a análise de componentes celulares 6 termos referentes à estrutura mitocondrial foram enriquecidos por genes regulados negativamente no TAM de animais MrgD/KO HG vs WT HG (Tabela A5). A mitocôndria é a organela da energia, responsável pela beta oxidação,

pelo ciclo de krebs até a produção de ATP e a termogênese adaptativa. A mitocôndria também está envolvida no ciclo do cálcio, uma vez que foi descoberto que a concentração de cálcio mitocondrial aumenta quando há aumento de cálcio no citosol. Além disso, a conexão com o RE permite a passagem de cálcio para a mitocôndria. O cálcio mitocondrial além de ser importante para a sinalização de apoptose também é importante para aumentar a produção de ATP via ativação de enzimas chave do ciclo de Krebs^{107,108}. A estrutura mitocondrial é uma das principais características que a fazem tão importante. Dessa forma, uma vez que há interferência direta da ausência do receptor MrgD na expressão de genes mitocondriais, consideramos que a alamandina via MrgD pode ser importante para a sinalização da conservação de mitocôndrias saudáveis.

Nós mostramos que os animais MrgD/KO ST diminuem a expressão de AMPK no TAM, esse resultado está em linha com o trabalho que mostrou que a alamandina aumenta a liberação de óxido nítrico de forma dependente de AMPK no cardiomiócito²⁷. AMPK é um sensor de energia chave para a homeostase energética, trabalha aumentando os níveis de ATP para a normalidade e inibindo vias anabólicas. O bom funcionamento da AMPK é essencial para a diferenciação e funcionamento de adipócitos marrons saudáveis^{77 e 106}. A regulação negativa da AMPK em camundongos MrgD/KO ST pode ter acontecido devido a um desequilíbrio dos componentes estruturais e dos níveis de ATP e de cálcio no TAM. O não funcionamento da AMPK leva a um adipócito marrom disfuncional, reduzindo a taxa de diferenciação de adipócitos marrons e frequentemente gerando fibrose e células fusiformes¹⁰⁹. AMPK pode ser inibida pela proteína fosfatase 2 (PP2)¹¹⁰, que está regulada para baixo nos dois grupos de animais MrgD/KO, entretanto é regulada para baixo em maior intensidade nos animais MrgD/KO HG, pois este grupo diminuiu a expressão de duas isoformas de PP2 (Fig. A10). Isso poderia explicar o porquê os animais MrgD/KO HG não diminuíram a expressão de AMPK em

relação ao grupo WT HG, sugerindo neste caso PP2 como um contrarregulador. Esses resultados mostram que o eixo alamandina/MrgD pode influenciar a via desta proteína.

Além disso, nós mostramos que os animais MrgD/KO têm propensão a desenvolverem desequilíbrio nas concentrações de cálcio intracelular, uma vez que diversos canais de cálcio, assim como fatores que influenciam na concentração de cálcio, foram regulados pela falta do receptor MrgD (Fig. A9). Este resultado tem relação com o estudo que mostra a influência da alamandina na sinalização de cálcio intracelular, melhorando a contratilidade de cardiomiócitos em animais mREN por meio da regulação na concentração de cálcio via CaMKII²⁸.

Em conclusão, a ausência do receptor MrgD levou a alterações significativas no padrão de expressão gênica no TAM. Desviou o tecido em direção a uma profunda depleção de transcritos e a uma ausência de resposta ao desafio calórico. Tendo em vista os agrupamentos de genes regulados e as análises de enriquecimento é possível concluir que o eixo alamandina/MrgD é importante para o metabolismo. A expressão do receptor MrgD está relacionado à proteção do TAM via manutenção da estrutura celular, da estrutura ribossomal, da estrutura mitocondrial e das sinalizações via ATP, cálcio e AMPK.

6 REFERÊNCIAS

1. Tigerstedt R. and Bergman P. Niere und Kreislauf. Arch. Physiol. 8: 223-271,1898.
2. Marks LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. Hypertension. 1979 Jul-Aug;1(4):384-8.
3. Phillips MI, Schmidt-Ott KM. The Discovery of Renin 100 Years Ago. News Physiol Sci. 1999 Dec; 14:271-274.
4. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Nov;83(11):3925-9.
5. Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med (Berl). 2001 Apr;79(2-3):76-102.
6. Ferrario C. M., Barnes K. L., Block C. H., Brosnihan K. B., Diz D. I., Khosla M. C., and Santos R. A. S. Pathways of Angiotensin Formation and Function in the Brain. Hypertension 1990;15(suppl I):I-13-I-19).
7. Lavoie J. L. and Sigmund C. D. Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. Endocrinology, Volume 144, Issue 6, 1 June 2003, Pages 2179–2183.
8. Nouet, S. & Nahmias, C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. Trends Endocrinol. Metab. 11, 1–6 (2000).
9. Tonnaer JA, Engels GM, Wiegant VM, Burbach JP, De Jong W, De Wied D. Proteolytic conversion of angiotensins in rat brain tissue. Eur J Biochem. 1983 Mar 15;131(2):415-21.
10. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. Hypertension. 1988 Feb;11(2 Pt 2):I153-7.
11. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jun;85(11):4095-8.
12. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. Am J Physiol. 1989 Jul;257(1 Pt 2):H324-9.
13. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res 87: e1–e9, 2000.
14. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. J Biol Chem 275: 33238–33243, 2000.
15. Bader M. ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. Pflugers Arch - Eur J Physiol (2013) 465:79–85.
16. Santos R. A. S., Silva A. C. S., Maric C., Silva D. M. R., Machado R. P., Buhr I., Heringer-Walther S., Pinheiro S. V. B., Lopes M. T., Bader M., Mendes E. P., Lemos V. S., Campagnole-Santos M. J., Schultheiss H., Speth R. and Walther T. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8258-63. Epub 2003 Jun 26.

17. Santos R. A. S., Sampaio W. O., Alzamora A. C., Motta-Santos D., Alenina N., Bader M., Campagnole-Santos M. J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* 98: 505–553, 2018.
18. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antitrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 40 (5):774-779. 2002.
19. Lemos VS, Cortes SF, Silva DM, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium–dependent modulation of the phenylephrine-induced contraction in the aorta mREN-2 transgenic rats. *Br. J Pharmacol*. 135(7):1743-1748.2003.
20. Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol*. 46(4):459-463. 2005.
21. Vaz-Silva J., Carneiro M. M., Ferreira M. C., Pinheiro S. V. B., Silva D. A., Silva-Filho A. L., Witz C. A., Reis A. M., Santos R. A., and Reis F. M. The Vasoactive Peptide Angiotensin-(1–7), Its Receptor Mas and the Angiotensin-converting Enzyme Type 2 are Expressed in the Human Endometrium. *Reproductive Sciences* Vol. 16 No. 3 March 2009 247-256.
22. Magalhaes G.S., Rodrigues-Machado M. G., Motta-Santos D., Alenina N., Bader M., Santos R. A. S., Barcelos L. S. and Campagnole-Santos M. J. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1-7) Mas receptor knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311(6):L1141-L1148.
23. Hammer A., YANGG., Friedrich J., Kovacs A., Lee D.H., Grave K., Jörg S., Alenina N., Grosch J., Winkler J., Gold R., Bader M., Manzel A., Rump L.C., Müller D.N., Linker R.A., Stegbauer J. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Dec 6;113(49):14109-14114.
24. Lautner R. Q., Villela D. C., Fraga-Silva R. A., Silva N. C., Verano-Braga T., Costa-Fraga F., et al. Discovery and Characterization of Alamandine, a Novel Component of the Renin-Angiotensin System. *Circulation Research*. *Circ Res*. 12;112(8):1104-11. 2013.
25. Villela D. C., Passos-Silva D. G. e Santos R. A. S. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 23:130–134.2014.
26. Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, et al. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol* 1992; 263:R89–R94.
27. Jesus ICG, Scalzo S, Alves F, Marques K, Rocha-Resende C, Bader M, Santos RAS, Guatimosim S. Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018 Jun 1;314(6):C702-C711.
28. Jesus ICG, Mesquita TRR, Monteiro ALL, Parreira AB, Santos AK, Coelho ELX, Silva MM, Souza LAC, Campagnole-Santos MJ, Santos RS, Guatimosim S. Alamandine enhances cardiomyocyte contractility in hypertensive rats through a nitric oxide-dependent activation of CaMKII. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020 Apr 1;318(4):C740-C750.
29. Oliveira AC, Melo MB, Motta-Santos D, Peluso AA, Souza-Neto F, da Silva RF, Almeida JFQ, Canta G, Reis AM, Goncalves G, Cerri G, Coutinho D, Guedes de Jesus IC, Guatimosim S, Linhares ND, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019 Jan 1;316(1):H123-H133.
30. Wang L, Liu C, Chen X, Li P. Alamandine attenuates long-term hypertension-induced cardiac fibrosis independent of blood pressure. *Mol Med Rep*. 2019 Jun;19(6):4553-4560.
31. Hekmat AS, Zare N, Moravej A, Meshkibaf MH, Javanmardi K. Effect of Prolonged Infusion of Alamandine on Cardiovascular Parameters and Cardiac ACE2 Expression in a Rat Model of Renovascular Hypertension. *Biol Pharm Bull*. 2019 Jun 1;42(6):960-967.

32. de Souza-Neto FP, Silva MME, Santuchi MC, de Alcântara-Leonídio TC, Motta-Santos D, Oliveira AC, Melo MB, Canta GN, de Souza LE, Irigoyen MCC, Campagnole-Santos MJ, Guatimosim S, Santos RAS, da Silva RF. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Mar 1;133(5):629-643.
33. Da Silva AR, Lenglet S, Carbone F, Burger F, Roth A, Liberale L, Bonaventura A, Dallegri F, Stergiopoulos N, Santos RA, Mach F, Fraga-Silva RA, Montecucco F. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. *Eur J Clin Invest*. 2017 Feb;47(2):117-128.
34. Lindsey ML. Assigning matrix metalloproteinase roles in ischaemic cardiac remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Aug;15(8):471-479.
35. Qaradakh T, Matsoukas MT, Hayes A, Rybalka E, Caprnda M, Rimarova K, Sepsi M, Büsselberg D, Kruzliak P, Matsoukas J, Apostolopoulos V, Zulli A. Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. *Cardiovasc Ther*. 2017 Dec;35(6).
36. Liu C, Yang CX, Chen XR, Liu BX, Li Y, Wang XZ, Sun W, Li P, Kong XQ. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids*. 2018 Aug;50(8):1071-1081.
37. Uchiyama T, Okajima F, Mogi C, Tobo A, Tomono S, Sato K. Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue. *PLoS One*. 2017 Jun 7;12(6):e0178769.
38. Tiedje KE, Stevens K, Barnes S, Weaver DF. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Int*. 2010 Oct;57(3):177-88.
39. Bader M., Alenina N., Andrade-Navarro M. A., Santos R. A. S. Mas and Its Related G Protein-Coupled Receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev* 66:1080–1105, October 2014.
40. Etelvino G. M., Peluso A. A. and Santos R. A. S. New Components of the Renin-Angiotensin System: Alamandine and the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D. *Curr Hypertens Rep* (2014) 16:433.
41. Hrenak J., Paulis L. e Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci*.17: 1098. 2016.
42. Engeli S., et al. The adipose-tissue renin–angiotensin–aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35:807–825. 2003.
43. Strazzullo P. and Galletti F. Impact of the renin–angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 13:325–332. 2004.
44. Giacchetti G., et al. The renin–angiotensin–aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trend in Endocrinology and Metabolism*. 16(3). 2005.
45. Santos S H, Fernandes L R, Mario E G, Ferreira A V, Pôrto L C, Alvarez-Leite J I, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 57:340–347. 2008.
46. Mario EG, Santos SH, Ferreira AV, Bader M, Santos RA, Botion LM. Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. *Peptides*. 2012 Jan;33(1):174-7.
47. Braga F. J, Ravizzoni Dartora D, Alenina N, Bader M, Santos RA. Glucagon-producing cells are increased in Mas-deficient mice. *Endocr Connect*. 2017 Jan;6(1):27-32.

48. Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1–7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H666–H672. 2007.
49. Santos S. H. S., Braga J. F., Mario E. G. , Pôrto L. C. J., Rodrigues-Machado M. G., Murari A., et al. Improved Lipid and Glucose Metabolism in Transgenic Rats With Increased Circulating Angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:953-961. 2010.
50. Giani J. F., Mayer M. A., Munoz M. C., Silberman E. A., Hocht C., Taira C. A., Gironacci M. M., et al. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296: E262–E271. 2009.
51. Schuchard J, Winkler M, Stölting I, Schuster F, Vogt FM, Barkhausen J, Thorns C, Santos RA, Bader M, Raasch W. Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway. *Br J Pharmacol.* 2015 Aug;172(15):3764-78.
52. Vargas-Castillo A, Tobon-Cornejo S, Del Valle-Mondragon L, Torre-Villalvazo I, Schcolnik-Cabrera A, Guevara-Cruz M, Pichardo-Ontiveros E, Fuentes-Romero R, Bader M, Alenina N, Vidal-Puig A, Hong E, Torres N, Tovar AR. Angiotensin-(1-7) induces beige fat thermogenesis through the Mas receptor. *Metabolism.* 2020 Feb;103:154048.
53. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet. 2018. Available in :<<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>>. Data de acesso: 10/03/2021.
54. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature.* 2014 Jun 5;510(7503):76-83.
55. Smith RE, Horwitz BA. Brown fat and thermogenesis. *Physiol Rev.* 1969 Apr;49(2):330-425.
56. Heaton, J. M. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.* 112, 35–39 (1972).
57. Christensen, C. r., Clark, P. B. & Morton, K. A. reversal of hypermetabolic brown adipose tissue in F-18 FDG PET imaging. *Clin. Nucl. Med.* 31, 193–196 (2006).
58. Soderlund, v., Larsson, S. A. & Jacobsson, H. reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34, 1018–1022 (2007).
59. Virtanen, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518–1525 (2009).
60. Van Marken Lichtenbelt, W. D. et al. Coldactivated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508 (2009).
61. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Saito M. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Jan;19(1):13-6.
62. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, et al. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360:1518–25.
63. Nikonova L, Koza RA, Mendoza T, Chao PM, Curley JP, Kozak LP. 2008. Mesoderm-specific transcript associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance. *FASEB J.* 22:3925–37.
64. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993 Dec 23-30;366(6457):740-2.

65. Chondronikola M, Volpi E, Børshiem E, Porter C, Annamalai P, Enerbäck S, Lidell ME, Saraf MK, Labbe SM, Hurren NM, Yfanti C, Chao T, Andersen CR, Cesani F, Hawkins H, Sidossis LS. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 2014 Dec;63(12):4089-99.
66. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, et al. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 17:200–5
67. Yin H, Pasut A, Soleimani VD, Bentzinger CF, Antoun G, Thorn S, Seale P, Fernando P, van Ijcken W, Grosveld F, Dekemp RA, Boushel R, Harper ME, Rudnicki MA. MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metab*. 2013 Feb 5;17(2):210-24.
68. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 13;104(11):4401-6.
69. Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, Niswander L, Conlon RA. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol*. 2006 Aug 1;296(1):164-76.
70. Lepper C, Fan CM. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*. 2010 Jul;48(7):424-36.
71. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun*. 2014 Jun 19;5:4099.
72. Ohno H, Shinoda K, Ohyama K, Sharp LZ, Kajimura S. EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature*. 2013 Dec 5;504(7478):163-7.
73. Seale P. Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation. *Diabetes*. 2015 Jul;64(7):2369-75.
74. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):277-359.
75. Yang Q, Liang X, Sun X, Zhang L, Fu X, Rogers CJ, Berim A, Zhang S, Wang S, Wang B, Foretz M, Viollet B, Gang DR, Rodgers BD, Zhu MJ, Du M. AMPK/ α -Ketoglutarate Axis Dynamically Mediates DNA Demethylation in the Prdm16 Promoter and Brown Adipogenesis. *Cell Metab*. 2016 Oct 11;24(4):542-554.
76. Perdikari A, Kulenkampff E, Rudigier C, Neubauer H, Luippold G, Redemann N, Wolfrum C. A high-throughput, image-based screen to identify kinases involved in brown adipocyte development. *Sci Signal*. 2017 Feb 14;10(466):eaaf5357.
77. Mottillo EP, Desjardins EM, Crane JD, Smith BK, Green AE, Ducommun S, Henriksen TI, Rebalka IA, Razi A, Sakamoto K, Scheele C, Kemp BE, Hawke TJ, Ortega J, Granneman JG, Steinberg GR. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. *Cell Metab*. 2016 Jul 12;24(1):118-29.
78. Cheng, Z. J., Vapaatalo, H.; Mervaala, E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Medical science monitor*. 11:(6)194-205.2005.
79. Robidoux J, Martin TL, Collins S. 2004. β -adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:297–323
80. Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, et al. 2004. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 24:3057–67

81. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, et al. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896–99
82. Cassis LA. Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation. *Am J Physiol* 265: E860–E865, 1993. [PubMed: 8279541] 23.
83. Kawabe Y, Mori J, Morimoto H, Yamaguchi M, Miyagaki S, Ota T, Tsuma Y, Fukuhara S, Nakajima H, Oudit GY, Hosoi H. ACE2 exerts anti-obesity effect via stimulating brown adipose tissue and induction of browning in white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Dec 1;317(6):E1140-E1149.
84. Morimoto H, Mori J, Nakajima H, Kawabe Y, Tsuma Y, Fukuhara S, Kodo K, Ikoma K, Matoba S, Oudit GY, Hosoi H. Angiotensin 1-7 stimulates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018 Feb 1;314(2):E131-E138.
85. Young P, Cawthorne MA, Smith SA. Brown adipose tissue is a major site of glucose utilisation in C57Bl/6 ob/ob mice treated with a thermogenic beta-adrenoceptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Jul 16;130(1):241-8.
86. Aleshin AE, Zeng C, Bourenkov GP, Bartunik HD, Fromm HJ, Honzatko RB. The mechanism of regulation of hexokinase: new insights from the crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and glucose-6-phosphate. *Structure*. 1998 Jan 15;6(1):39-50.
87. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4683-96.
88. Rodríguez-Correa E, González-Pérez I, Clavel-Pérez PI, Contreras-Vargas Y, Carvajal K. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes*. 2020 Jul 2;10(1):24.
89. Ruiz-Ojeda FJ, Méndez-Gutiérrez A, Aguilera CM, Plaza-Díaz J. Extracellular Matrix Remodeling of Adipose Tissue in Obesity and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 2;20(19):4888.
90. Van Hul M, Frederix L, Lijnen HR. Role of thrombospondin-2 in murine adipose tissue angiogenesis and development. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Sep;20(9):1757-62.
91. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*. 2009 Mar;29(6):1575-91.
92. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells*. 2020 May 25;9(5):1313.
93. de Souza-Neto FP, Silva MME, Santuchi MC, de Alcântara-Leonídio TC, Motta-Santos D, Oliveira AC, Melo MB, Canta GN, de Souza LE, Irigoyen MCC, Campagnole-Santos MJ, Guatimosim S, Santos RAS, da Silva RF. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Mar 1;133(5):629-643.
94. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):463-8.
95. Villarroya F. Irisin, turning up the heat. *Cell Metab*. 2012 Mar 7;15(3):277-8.
96. Hofmann T, Elbelt U, Stengel A. 2014. Irisin as a muscle-derived hormone stimulating thermogenesis – a critical update. *Peptides* 54:89–100.

97. Labeit S, Kolmerer B (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270:293–296
98. Ahmad S, Rai TS, Khullar M, Bahl A, Saikia UN, Thungapathra M, Kumar RM, Mahajan R, Talwar KK. Decreased myocardial expression of dystrophin and titin mRNA and protein in dilated cardiomyopathy: possibly an adverse effect of TNF- α . *J Clin Immunol.* 2010 Jul;30(4):520-30.
99. Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res.* 2014 Jan 31;114(3):572-586.
100. Lecuona E, Minin A, Trejo HE, Chen J, Comellas AP, Sun H, Grillo D, Nekrasova OE, Welch LC, Szleifer I, Gelfand VI, Sznajder JI. Myosin-Va restrains the trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase-containing vesicles in alveolar epithelial cells. *J Cell Sci.* 2009 Nov 1;122(Pt 21):3915-22.
101. Cicero AF, Tartagni E. Antidiabetic properties of berberine: from cellular pharmacology to clinical effects. *Hosp Pract (1995).* 2012 Apr;40(2):56-63.
102. Shi H, Halvorsen YD, Ellis PN, Wilkison WO, Zemel MB. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics.* 2000 Aug 9;3(2):75-82.
103. Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2008;3(11):e3737.
104. Pirone L, Smaldone G, Spinelli R, Barberisi M, Beguinot F, Vitagliano L, Miele C, Di Gaetano S, Raciti GA, Pedone E. KCTD1: A novel modulator of adipogenesis through the interaction with the transcription factor AP2 α . *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019 Dec;1864(12):158514.
105. Ikeda K, Yamada T. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Jul 28;11:498.
106. Pollard AE, Martins L, Muckett PJ, Khadayate S, Bornot A, Clausen M, Admyre T, Bjursell M, Fiadeiro R, Wilson L, Whilding C, Kotiadis VN, Duchon MR, Sutton D, Penfold L, Sardini A, Bohlooly-Y M, Smith DM, Read JA, Snowden MA, Woods A, Carling D. AMPK activation protects against diet induced obesity through Ucp1-independent thermogenesis in subcutaneous white adipose tissue. *Nat Metab.* 2019 Mar;1(3):340-349.
107. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1342-51.
108. Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Sep 1;4(9):a011403.
109. Desjardins EM, Steinberg GR. Emerging Role of AMPK in Brown and Beige Adipose Tissue (BAT): Implications for Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2018 Aug 17;18(10):80.
110. Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, Zou MH. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2007.
111. Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G. Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. *Diabetes.* 1997 Nov;46(11):1782-5.

7. APÊNDICE

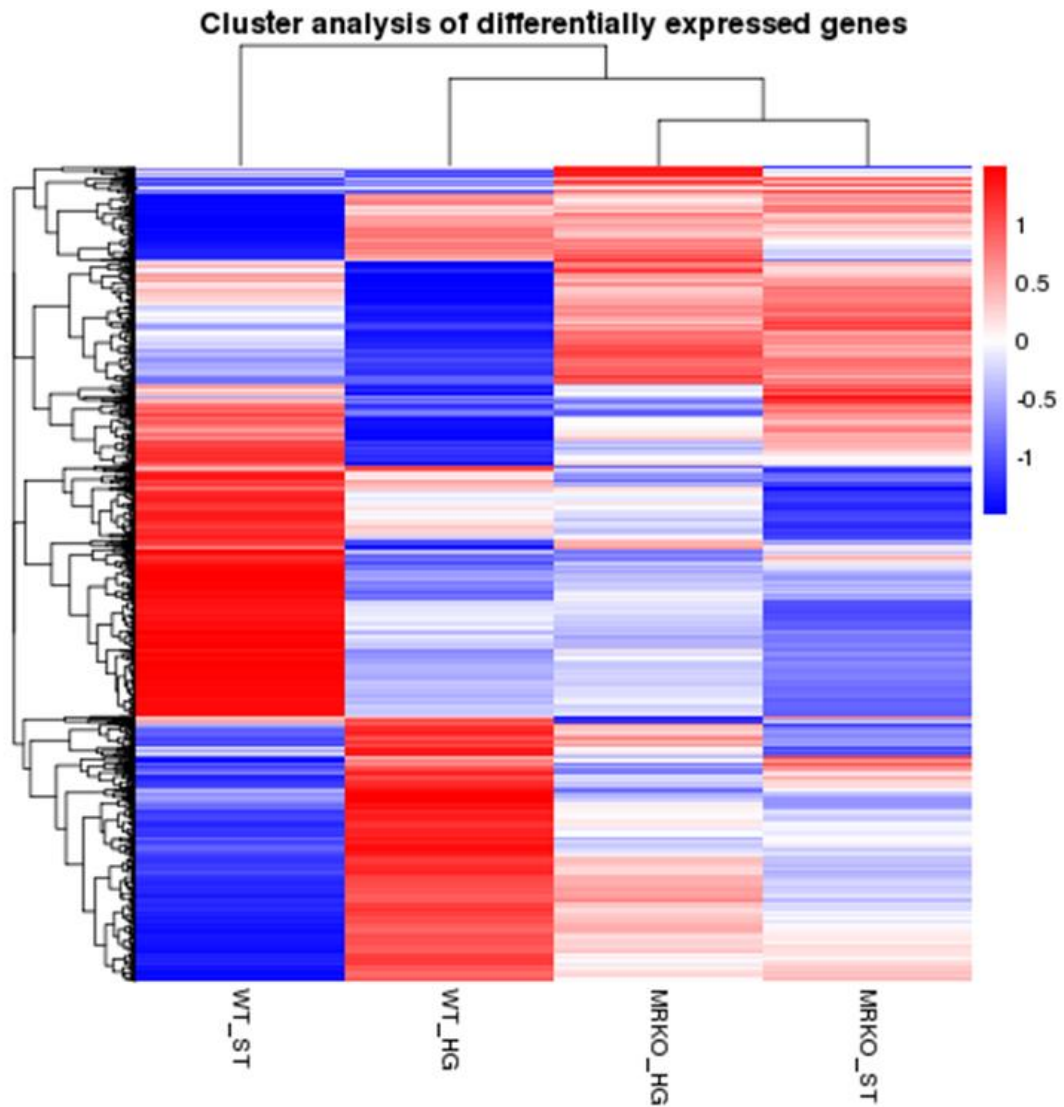


Figura A1. Análise de cluster. Os genes foram agrupados de acordo com padrão semelhante de expressão. A marcação azul é referente a genes regulados negativamente e a marcação vermelha é referente a genes regulados positivamente. Podemos observar que os grupos MrgD/KO compartilham mais semelhanças com o grupo WT HG do que com o grupo WT ST.

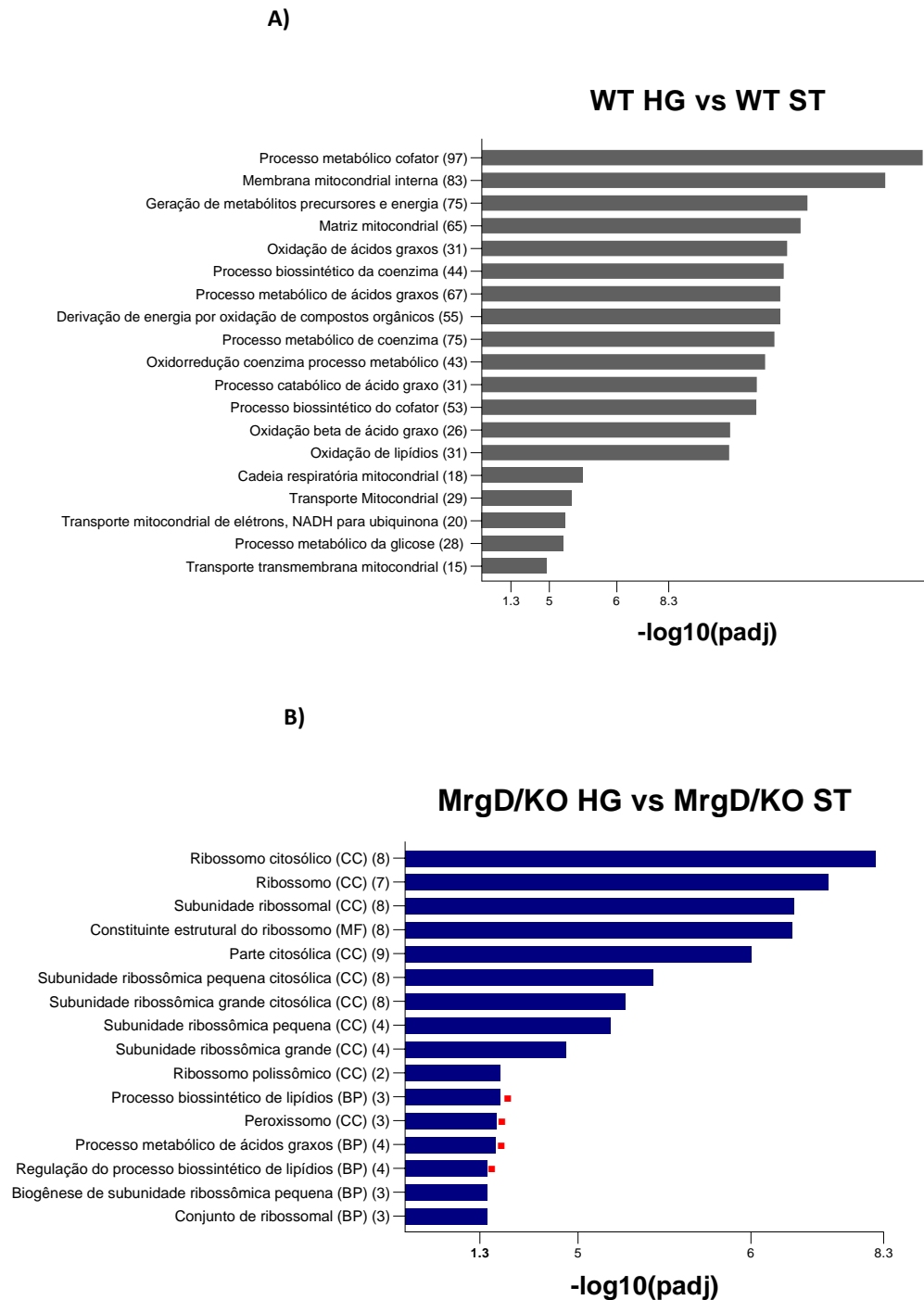


Figura A2. Análise de enriquecimento GO. Nestes gráficos estão representados os termos mais enriquecidos de cada comparação. A) Comparação entre os grupos WT HG e WT ST. Os termos mais enriquecidos são foram processos biológicos (BP) todos relacionados a genes regulados positivamente. B) Comparação entre os grupos MrgD/KO HG e MrgD/KO ST. Os termos mais enriquecidos foram relacionados à genes regulados negativamente, aqueles termos enriquecidos por genes regulados positivamente estão representados por um ponto vermelho. BP, processo biológico; CC, componente celular e MF, função molecular. O número de genes regulados em cada termo está entre parênteses.

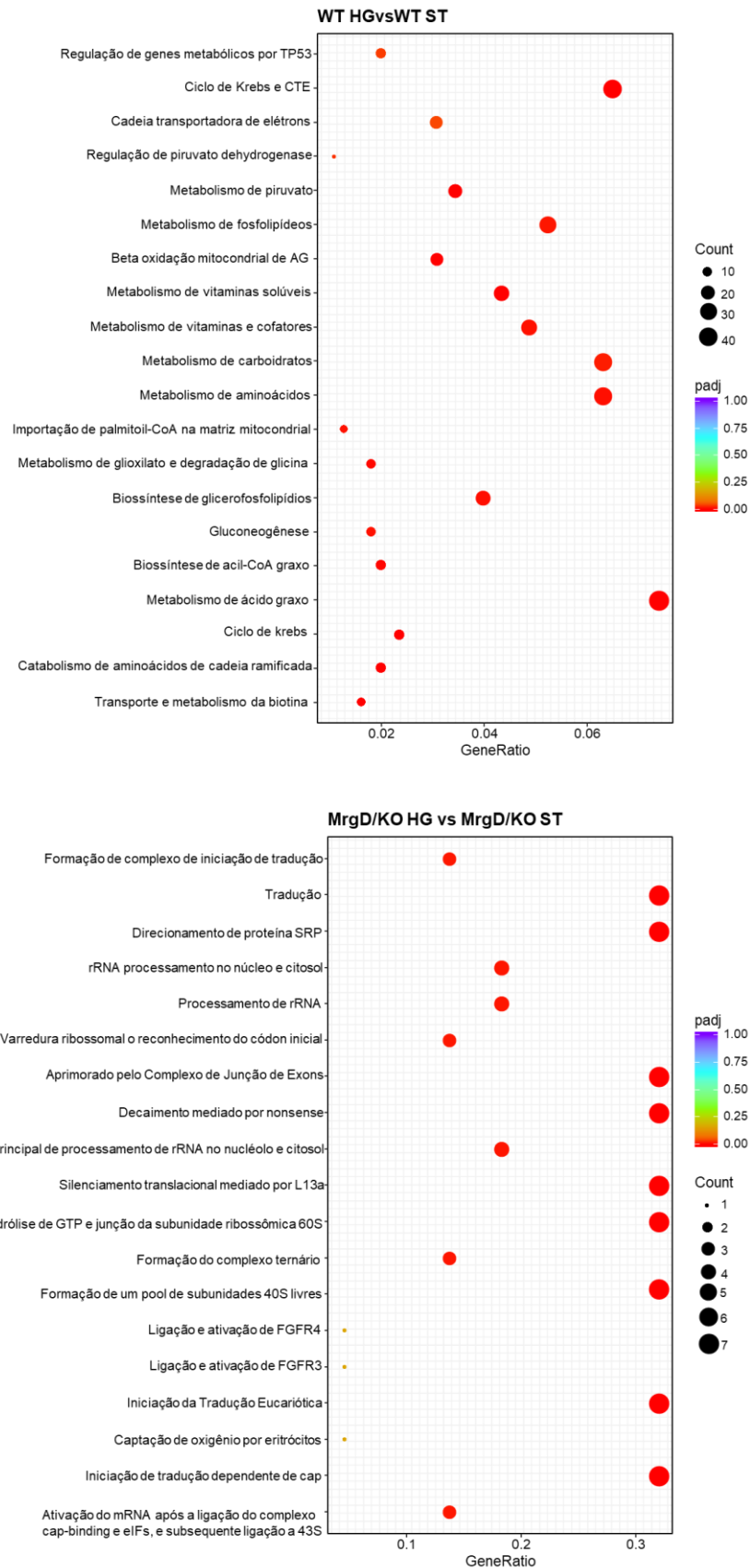


Figura A3. Reactoma ilustrando reações biológicas enriquecidas. O primeiro gráfico representa a comparação WT HG vs WT ST. O segundo gráfico representa a comparação entre MrgD/KO HG vs MrgD/KO ST. O tamanho dos círculos indica a quantidade de genes regulados. A cor indica a diferença estatística, quanto mais vermelho maior a significância. GeneRatio se refere ao número de genes regulados por número de genes relacionados à reação.

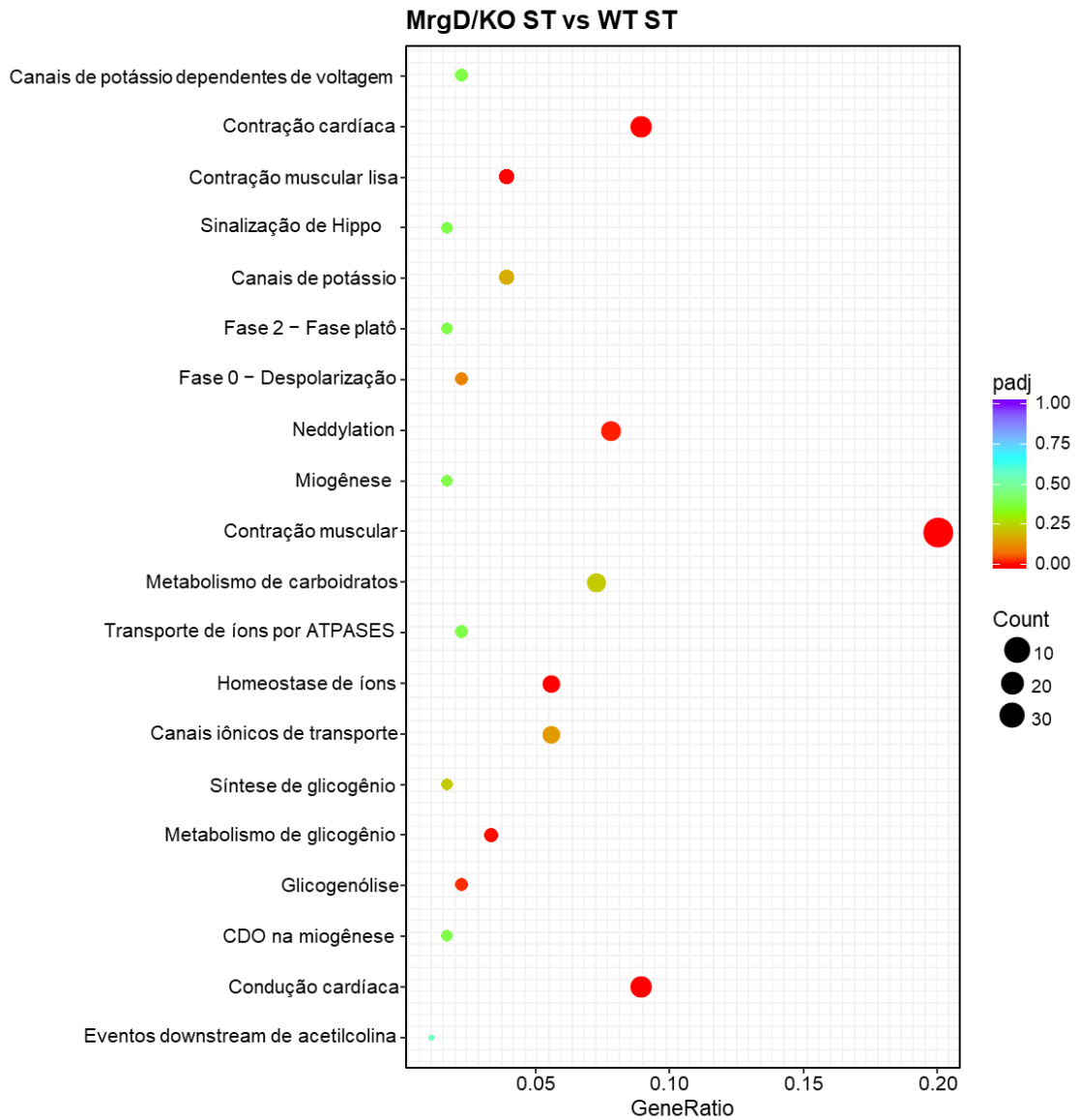


Figura A4. Reactoma ilustrando reações biológicas enriquecidas entre os grupos MrgD/KO ST vs WT ST. O tamanho dos círculos indica a quantidade de genes regulados. A cor indica a diferença estatística, quanto mais vermelho maior a significância. GeneRatio se refere ao número de genes regulados por número de genes relacionados à reação.

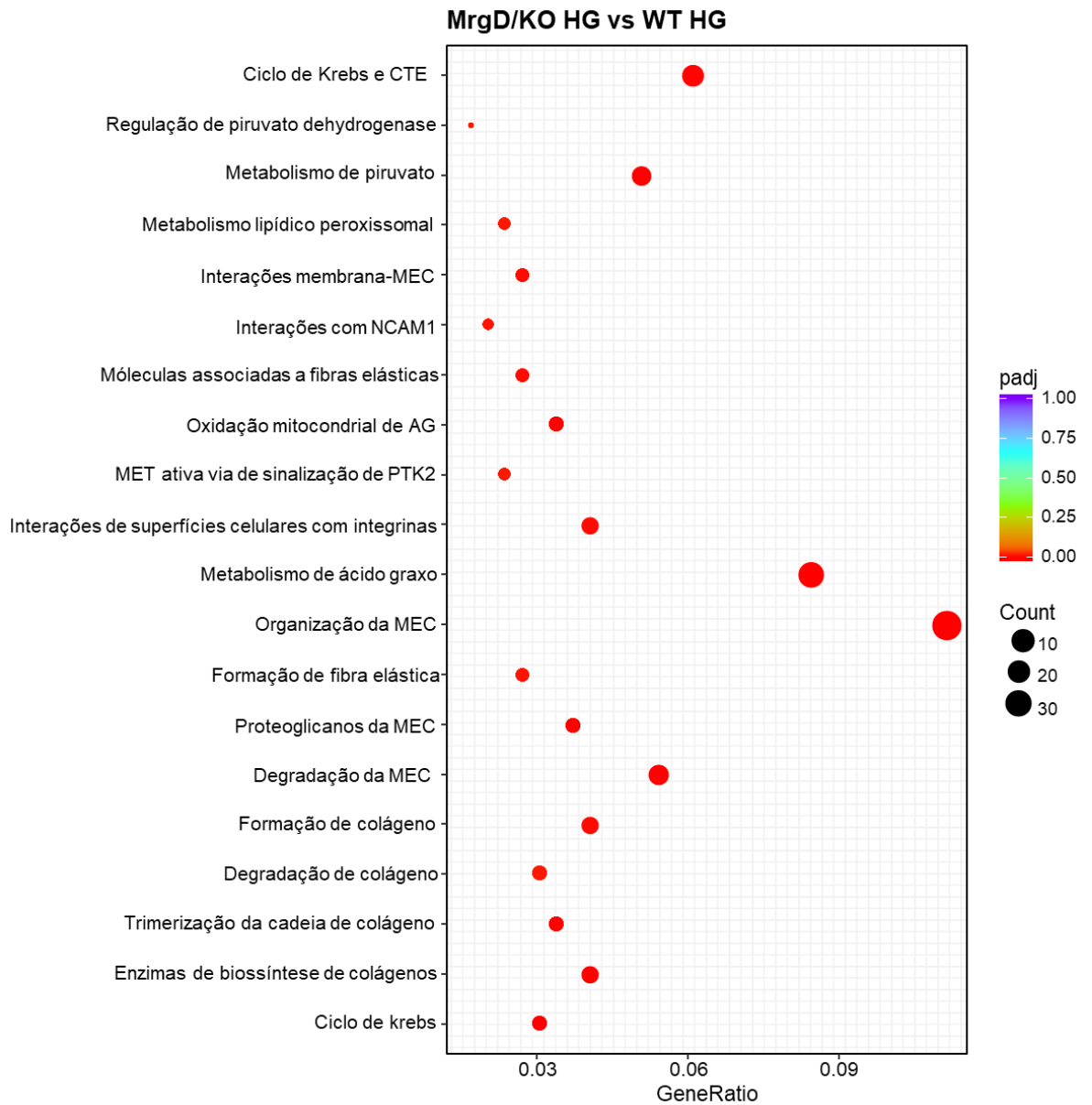


Figura A5. Reactoma ilustrando reações biológicas enriquecidas entre os grupos MrgD/KO HG vs WT HG. O tamanho dos círculos indica a quantidade de genes regulados. A cor indica a diferença estatística, quanto mais vermelho maior a significância. GeneRatio se refere ao número de genes regulados por número de genes relacionados à reação.

Tabela A1. Análise de enriquecimento GO. Termos diretamente relacionados à função cardíaca e homeostase de íons. Comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST.

Descrição	Pvalue	*aGeneratio
Desenvolvimento de células cardíacas	5,59E-14	21/421
Diferenciação de células musculares cardíacas	2,39E-13	23/421
Diferenciação de células musculares cardíacas	2,39E-13	23/421
Desenvolvimento de tecido muscular cardíaco	1,12E-12	29/421
Conjunto de miofibrilas cardíacas	5,01E-12	11/421
Contração do coração	5,94E-11	25/421
Processo cardíaco	1,46E-10	25/421
Contração do músculo cardíaco	2,06E-10	19/421
Transporte de íons de cálcio	5,07E-09	33/421
Morfogênese do tecido muscular cardíaco	1,57E-08	13/421
Regulação da contração cardíaca	1,71E-08	20/421
Desenvolvimento de fibra muscular cardíaca	9,32E-08	7/421
Hipertrofia do músculo cardíaco	1,66E-07	14/421
Transporte transmembrana de íons de cálcio	7,51E-07	24/421
Regulação do transporte de íons de cálcio	7,74E-07	22/421
Regulação da sinalização mediada por cálcio	9,71E-07	13/421
Morfogênese do coração	2,66E-06	20/421
Potencial de ação das células musculares cardíacas	9,31E-06	9/421
Regulação da frequência cardíaca	1,39E-05	11/421
Relaxamento do músculo cardíaco	1,52E-05	5/421
Transporte celular de íon potássio	2,92E-05	16/421
Transporte transmembrana de íon potássio	2,92E-05	16/421
Homeostase celular do íon cálcio	3,59E-05	27/421
Transporte de íon potássio	4,33E-05	17/421
Homeostase de íons de cálcio	5,57E-05	27/421
Regulação da contração do músculo cardíaco	6,71E-05	9/421
Regulação da atividade do canal de liberação de cálcio sensível à rianodina	1,20E-04	5/421
Hipertrofia do músculo cardíaco em resposta ao estresse	2,54E-04	5/421
Adaptação do músculo cardíaco	3,18E-04	5/421
Transporte de íons de cálcio para o citosol	3,23E-04	13/421
Regulação da hipertrofia do músculo cardíaco	3,50E-04	8/421
Resposta ao íon cálcio	4,49E-04	12/421
Liberação de íon de cálcio sequestrado no citosol pelo retículo endoplasmático	4,80E-04	5/421
Regulação da contração do músculo cardíaco por sinalização de íons de cálcio	5,68E-04	4/421
Contração de células musculares cardíacas	1,02E-03	7/421
Crescimento do coração	1,34E-03	9/421
Morfogênese do ventrículo cardíaco	1,37E-03	7/421
Regulação negativa da importação de íons de cálcio	2,04E-03	3/421
Desenvolvimento do coração adulto	3,60E-03	3/421
Transporte transmembrana de íons de cálcio via canal de cálcio controlado por alta voltagem	3,60E-03	3/421

*GeneRatio, número de genes regulados por número de genes relacionados ao termo.

^a Importante observar a quantidade de genes regulados em cada termo.

Tabela A2. Análise de enriquecimento Reactoma e GO relacionados a genes regulados positivamente. Comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST.

Categoria	Description	Pvalue	Padj	Generatio**
Reactoma	Biossíntese de colágeno e enzimas modificadoras	4,33E-04	2,41E-02	03 de 18
Reactoma	Formação de colágeno	7,01E-04	2,41E-02	3 de 18
Reactoma	Eliminação de heme do plasma	7,62E-04	2,41E-02	2 de 18
GO (cc)*	Trímero de colágeno	3,55E-04	3,37E-02	3 de 28

*cc, componente celular. **GeneRatio, número de genes regulados por número de genes relacionados ao termo.

Tabela A3. Genes referentes à MEC regulados positivamente entre os animais MrgD/KO HG vs WT HG. Em negrito são genes também regulados positivamente na comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST.

Gene	P valor	Log2foldchange
Col14a1	1,05E-06	1,66
Fn1	6,83E-06	1,44
Emilin1	7,99E-06	1,29
Col5a1	1,78E-05	1,39
Fndc1	2,59E-05	1,26
Adamts14	2,94E-05	1,45
Adamts5	3,49E-05	1,05
Adamts15	1,20E-04	1,11
Col15a1	1,78E-04	1,28
Col5a2	1,93E-04	1,24
Timp1	2,15E-04	1,33
Lama4	2,27E-04	0,55
Col6a1	2,66E-04	1,15
Col6a2	4,53E-04	1,17
Col1a1	7,98E-04	1,21
Lama5	7,93E-04	0,56
Adam23	8,40E-04	1,08
Adamts4	1,08E-03	1,15
Ecm1	1,12E-03	0,82
Col3a1	1,25E-03	1,16
Col18a1	1,29E-03	1,08
Flrt2	1,49E-03	1,06
Col16a1	1,52E-03	1,06
Emilin2	1,58E-03	1,12
Adamts7	1,81E-03	1,02
Adam19	1,87E-03	0,99
Efemp2	1,99E-03	0,74
Col1a2	2,53E-03	1,09
Fndc3a	2,75E-03	0,39
Col8a1	3,24E-03	0,82
Col5a3	3,44E-03	0,85
Mmp14	6,53E-03	0,89
Adamts10	6,64E-03	0,55

Mmp13	8,07E-03	0,96
Col28a1	8,73E-03	0,65
Timp2	9,74E-03	0,72
Mmp15	9,90E-03	0,49
Efemp1	9,87E-03	0,70
Col6a3	1,09E-02	0,91
Adamts2	1,10E-02	0,83
Lama3	1,33E-02	0,77
Adam10	1,40E-02	0,49
Adamts12	1,68E-02	0,82
Adam8	1,95E-02	0,77
Fndc4	2,08E-02	0,79
Cndp2	2,52E-02	0,46
Mmp23	2,52E-02	0,70
Adam17	2,63E-02	0,40
Adam33	2,81E-02	0,55
Amz1	3,32E-02	0,75
Col4a1	3,55E-02	0,56
Adamts18	3,61E-02	0,71
Mmp19	3,70E-02	0,71
Itga5	3,89E-02	0,62
Col4a2	3,90E-02	0,50
Eln	4,00E-02	0,57
Lamc1	4,42E-02	0,40
Mmp2	4,71E-02	0,55

Tabela A4. Termos GO enriquecidos por genes regulados negativamente entre os grupos WT HG vs WT ST. BP, processo biológico; CC, componente celular; MF, função molecular. GeneRatio, número de genes regulados por número de genes relacionados ao termo.

Categoria	Descrição	pvalue	padj	GeneRatio
BP	montagem de componentes celulares envolvidos na morfogênese	2,59E-06	0,000109	19/431
BP	regulação do transporte transmembrana de cátions	0,001738	0,031834	27/431
BP	processo cardíaco	0,00019	0,004781	21/431
BP	Regulação do transporte transmembrana	0,000282	0,006735	36/431
BP	regulação do processo do sistema muscular	0,000136	0,00371	21/431
CC	complexo de canal iônico	0,000418	0,007443	17/430
CC	complexo de canal de cálcio	0,000995	0,015518	7/430
CC	complexo de glicoproteína	0,001254	0,018048	4/430
CC	junção de aderentes célula-célula	0,001266	0,018048	9/430
CC	Complexo de canal de cálcio controlado por voltagem tipo L	0,002124	0,029447	3/430
MF	ligação do canal iônico	7,45E-09	0,00721	13/437
MF	atividade de canal fechado	8,37E-09	0,00721	20/437
MF	atividade do canal ionizado	0,000157	0,011867	19/437
MF	atividade do transportador transmembrana de cátions inorgânicos	0,000486	0,029288	27/437
MF	Atividade do canal iônico dependente de voltagem	0,000585	0,029302	13/437

Tabela A5. Análise de enriquecimento GO. Termos referentes à componentes mitocondriais enriquecidos por genes regulados negativamente. Comparação entre MrgD/KO HG vs WT HG.

Termos	P valor	Gene/Ratio
Membrana mitocondrial interna	9,59E-09	36/486
Matriz mitocondrial	1,00E-09	31/486
Nucleóide mitocondrial	5,68E-05	8/486
Complexo protéico mitocondrial	3,08E-04	19/486
Membrana mitocondrial	3,91E-04	17/486
Membrana mitocondrial externa	1,50E-03	13/486

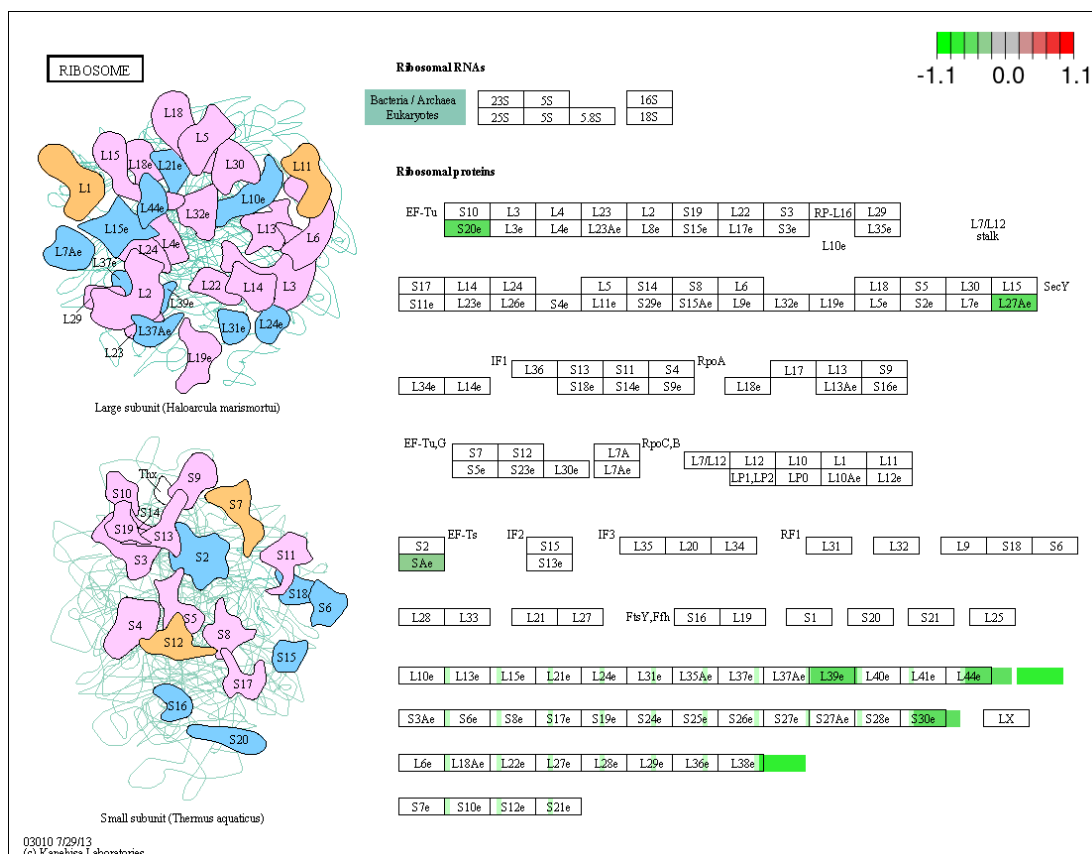


Figura A6. Genes que codificam proteínas ribossomais enriqueceram a via ribossomal entre o grupo MrgD/KO HG vs MrgD/KO ST. Oito genes foram regulados negativamente.

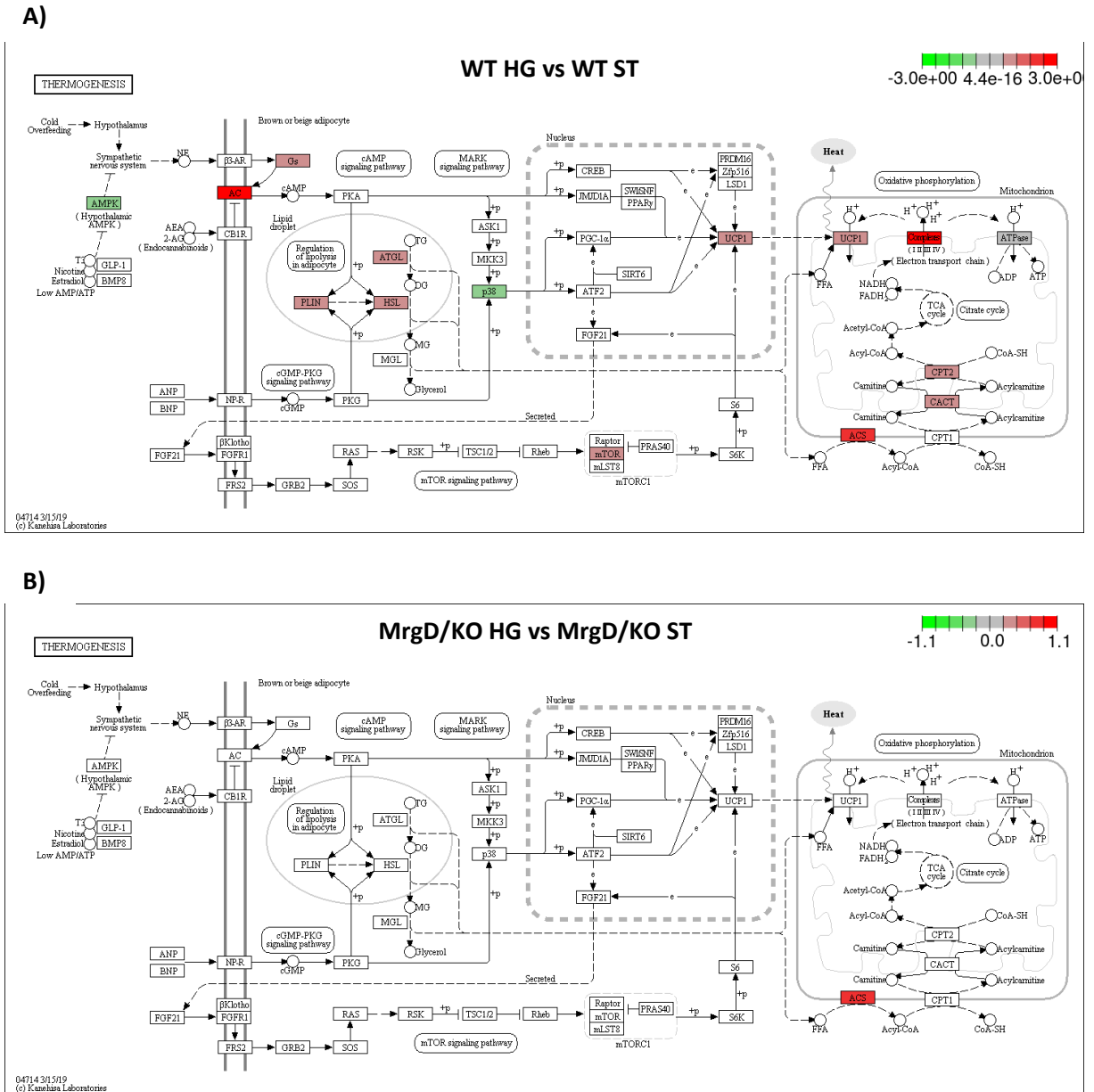


Figura A7. Via da termogênese pós dieta HG. **A)** Comparação entre os grupos WT HG vs WT ST. 36 genes foram regulados. Alguns genes foram regulados por mais de uma isoforma ou subtipo, tais como AMPK (2), adenilato cilase (2), ATPase (3) e componentes da cadeia transportadora de elétrons (20). **B)** Comparação entre os grupos MrgD/KO HG vs MrgD/KO ST. Apenas um gene foi regulado (Acyl-coa sintase).

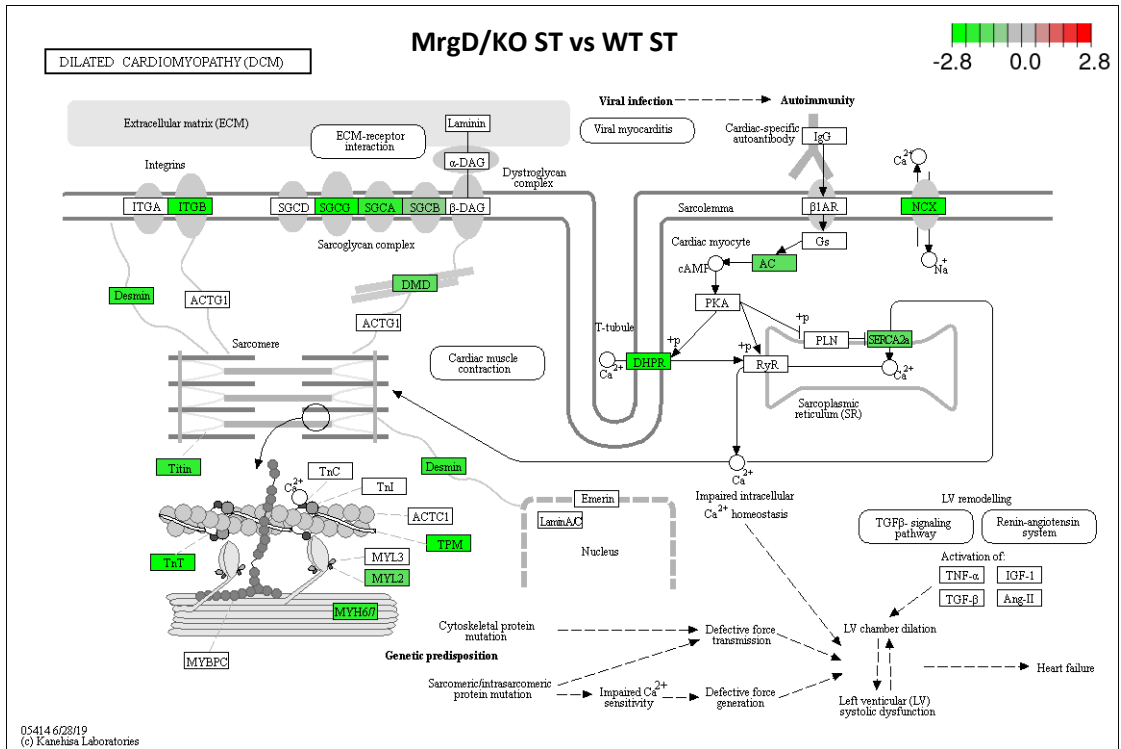


Figura A8. Via da cardiomiopatia dilatada. Via enriquecida na comparação MrgD/KO ST vs WT ST. 19 genes regulados negativamente, no TAM, enriqueceram vias de cardiomiopatias (dilatada e hipertrófica).

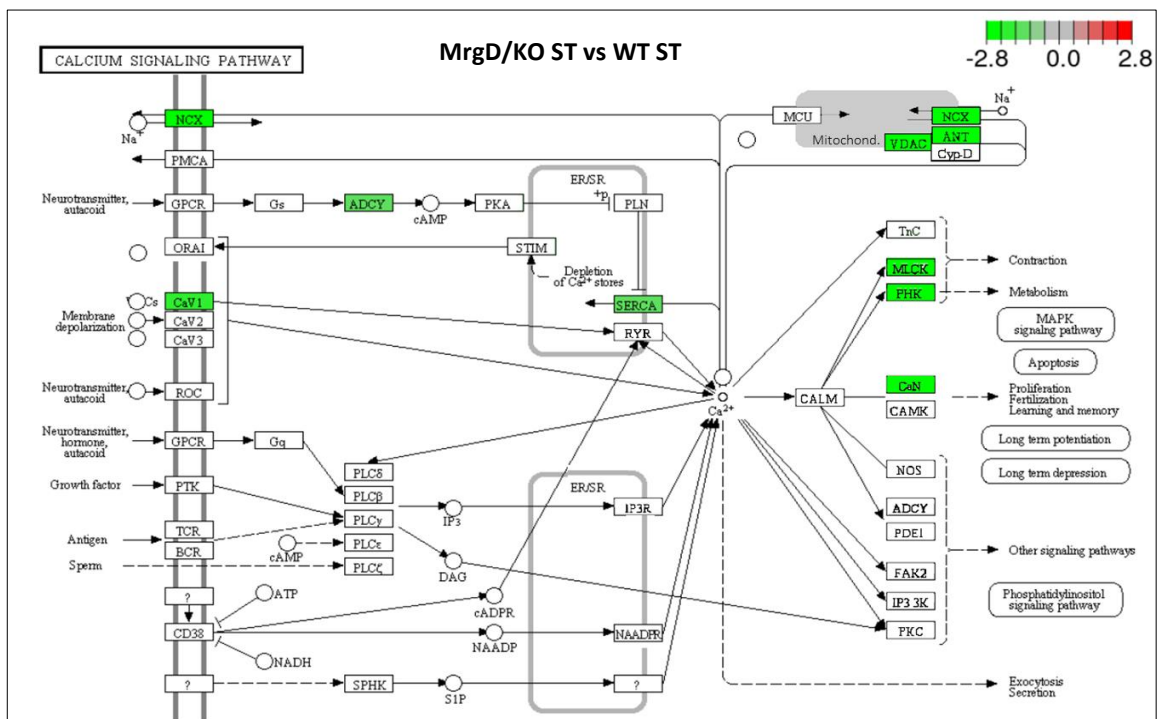


Figura A9. Via de sinalização do cálcio. O receptor MrgD é importante para a homeostase de íons, visto que animais KO apresentam depressão no padrão de expressão da via do cálcio. 12 genes foram regulados negativamente na comparação entre MrgD/KO ST vs WT ST. Alguns genes foram regulados por mais de uma isoforma ou subtipo, tais como VDAC (2), MLCK (2) e PHK (2).

