

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

**VALÉRIA ALVES FERNANDES**

**Participação da Tonina na Resistência a Hipertrofia  
Cardíaca Induzida**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

**VALÉRIA ALVES FERNANDES**

**Participação da Tonina na Resistência a Hipertrofia  
Cardíaca Induzida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

**Co-orientador:** Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

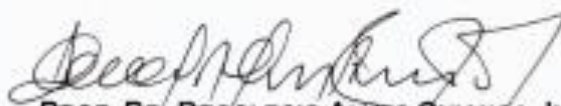
**BELO HORIZONTE**

**2017**

# "PARTICIPAÇÃO DA TONINA NA RESISTÊNCIA À HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA"

## VALÉRIA ALVES FERNANDES

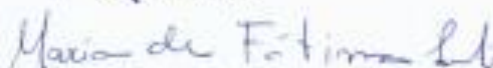
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 22 de setembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



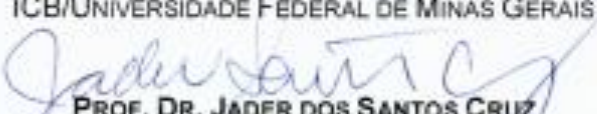
PROF. DR. DEOCLECIO ALVES CHIANCA JUNIOR  
DECBI/UFOP




PROF. DR. IVAN CARLOS DOS SANTOS  
COBI/UFESJ




PROFA. DR. MARIA DE FÁTIMA LEITE  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COORIENTADOR



PROF. DR. JORGE LUIZ PESQUERO  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 22 de setembro de 2017

Dedico essa tese a minha mãe, Marilda, que mesmo sem intenção de me formar doutora, fez as escolhas que me propiciaram enxergar nos estudos uma opção de vida. Se não fosse todo o esforço feito por ela, de me matricular e manter nas melhores escolas públicas, desde que iniciei minha vida acadêmica, muito provavelmente eu não teria tido a oportunidade de cursar o doutorado numa das melhores universidades do país.

## AGRADECIMENTOS

Acredito que agradecer é mais que um ato de humildade e reconhecimento da ajuda prestada, é uma forma de expressar, em palavras e ações, o quanto a ajuda foi importante. Pequenas ajudas prestadas, por pessoas bem-intencionadas, podem passar despercebidas e o agradecimento nunca é feito. Acontece todo o tempo e, muitas vezes, nos esquecemos de simplesmente dizer “obrigado”. No meu caso, muitas pessoas contribuíram de forma direta e indireta para que esta tese ficasse pronta e eu anseio conseguir me lembrar de todos e expressar minha sincera gratidão.

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Jorge Luiz Pesquero, que sempre esteve disponível para me ensinar e orientar com paciência e interesse no meu crescimento pessoal a profissional. De todos os orientadores que tive durante a minha jornada acadêmica, posso dizer que tenho uma gratidão especial a você, que em muitos aspectos se tornou meu mentor e exemplo de carreira científica. Agradeço também pela amizade e as conversas sobre política e ciência.

Agradeço enormemente a minha mãe, Marilda, que sempre esteve ao meu lado e me ajuda em tudo que pode para que eu seja bem-sucedida nas minhas jornadas e alcance meus objetivos e sonhos. Mãe, você com certeza é um exemplo de mulher guerreira no qual eu me inspiro.

Agradeço ao meu co-orientador Almir por tanto ter me ensinado e auxiliado durante a execução dos experimentos de PCR em tempo real e também por todas as aulas de bioinformática básica e as conversas sobre ciência e política.

Agradeço a todas as alunas e colaboradoras que passaram pelo laboratório de biofísica, em especial a Juliana, Raquel, Bárbara, Leidiane e Thais. Agradeço pela amizade e auxílio nos momentos de experimentos com inúmeros grupos de tratados e controles.

Agradeço aos alunos de iniciação científica que tiveram a paciência de serem orientados por mim, Antônio, Cristofen e Ana Paula. Com certeza eu aprendi tanto quanto vocês durante o tempo que passamos juntos e eu agradeço muito a oportunidade de aprender a ensinar.

Agradeço aos alunos e professores do laboratório ELETROCEL que colaboraram e contribuíram com minha tese: Dra. Silvia Guatimosin, Itamar, Sérgio e Vanessa.

Muito obrigada pela parceria nos experimentos com cultura de cardiomiócitos neonatos e também pela amizade e contribuição intelectual durante a execução da tese.

Agradeço ao professor João Bosco e seus alunos Patrícia e Giscard pela colaboração que permitiu realizar e validar o experimento de RNA-seq.

Agradeço ao professor Sergio Vasconcelos e ao meu amigo Lucas pela parceria nas análises do experimento de RNA-seq. Lucas, eu devo a você um agradecimento especial por tantos anos de amizade, espero que você saiba que nunca vai se livrar de mim.

Agradeço enormemente a todos os meus alunos do curso de biofísica básica que me proporcionaram a oportunidade de aprender a lecionar no curso superior. Ainda estou aprendendo e tenho a ambição de um dia me tornar uma grande mestra.

Agradeço a todos os alunos que ocuparam o CAD1 juntamente comigo durante o período que lutamos contra a provação da PEC241. Aqueles dois meses em que parei o meu doutorado com o objetivo de discutir política, enquanto protestávamos contra as medidas que enfim estão contribuindo para o rápido sucateamento da educação pública e da ciência brasileira, foram essenciais para minha formação, pois acredito que o pior analfabeto que existe é o analfabeto político. Assim sendo, buscar o título de doutora, sem investir meu tempo para também crescer como cidadã e aprender sobre como funcionam as instituições políticas do meu país seria, na minha visão, buscar o reconhecimento para uma formação incompleta.

Agradeço a professora Juliana Tauil que durante o período das ocupações no CAD1 deu uma das melhores aulas de história que eu já tive na vida, ao lecionar sobre eugenia e darwinismo social.

Agradeço a todos os meus amigos conquistados nas ocupações da UFMG e também nas duas famigeradas idas a Brasília, aos amigos da gestão Jana Moroni do DA do curso de Ciências Biológicas e aos amigos da arquibancada desse DA pela amizade e companheirismo nos momentos em que eu mais cresci pessoalmente e como cidadã. Bem como, no período em que eu mais me desconstruí dos meus preconceitos. Eu sei que citar nomes me colocará em uma difícil situação, mas não posso deixar de agradecer de forma especial ao Otávio, a Yane, a Cyntia e a Larissa que sempre me socorrem e ajudam nos momentos que eu mais preciso.

Obrigada pelos conselhos e amizade. Ao Otávio, agradeço ainda pelo computador emprestado, sem ele eu nem estaria escrevendo esses agradecimentos.

Agradeço também, ao professor Luciano Capettini, que foi meu orientador no primeiro ano de doutorado e a Juliana e a Giane, minhas amigas e colegas de laboratório. Muito obrigada pela amizade e pelos conselhos. Agradeço também aos alunos de iniciação científica que pude orientar durante o período que trabalhei no LAFAC: Kyonis, Paulo, Michelle e Cyntia, vocês foram muito importantes durante o meu processo (ainda em curso) de aprender a ensinar.

E, por fim, mas não menos importante, agradeço imensamente a Alexandra Elbakyan, mulher que fundou e mantém o site [sci-hub.io](https://sci-hub.io), pois essa iniciativa realmente remove barreiras no caminho da ciência.

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



## RESUMO

**Introdução:** De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo. A hipertrofia cardíaca constitui-se em processo adaptativo em resposta a sobrecargas hemodinâmicas crônicas, representando importante fator de risco para doenças cardíacas, tais como isquemia, arritmia e morte súbita. Uma das principais lacunas associadas ao tratamento das doenças cardiovasculares é a complexidade dos eventos que levam à sua progressão e as diversas formas de manifestação. Tonina é uma serinilproteínase, capaz de liberar angiotensina II (Ang II). Estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram que camundongos transgênicos que expressam tonina de rato (TGM(rTon)) são “resistentes” a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (ISO).

**Objetivo:** Identificar quais fatores moleculares e vias de sinalização celular levam a resistência à hipertrofia cardíaca observada no animal TGM(rTon).

**Métodos:** TGM(rTon) e seu controle C57 foram submetidos a indução de hipertrofia cardíaca com ISO (20 mg/kg/dia), realizada durante 5 dias. Após processo de indução foi determinado o índice de hipertrofia cardíaca. Tonina de glândula submandibular de rato foi purificada e adicionada à cardiomiócitos neonatais isolados de ratos e submetidos a estímulo hipertrófico com Ang II. Nestes miócitos foram realizadas medidas de área celular e de translocação do GRK-5 para o núcleo, ambos por meio de imunofluorescência. Os níveis de expressão de tonina no coração foram mensurados por *Western Blot*. Os níveis de expressão de diversos genes relacionados com hipertrofia foram avaliadas por PCR tempo real, nos cardiomiócitos isolados e em coração de TGM(rTon) e seu controle. RNA-seq foi realizado para identificar o transcriptoma do coração. As bibliotecas foram agrupadas e sequenciadas a 300 ciclos, na sequência *paired-end*, e as análises de enriquecimento de vias foram feitas utilizando a ferramenta *enrichr 5*.

**Resultados:** Nossos dados confirmam a resistência a hipertrofia do TGM(rTon). Nos cardiomiócitos isolados, tonina reverteu a hipertrofia celular induzida por Ang II e diminuiu a translocação do GRK-5 para o núcleo dos miócitos. Tonina também

reduziu os níveis de expressão gênica de BNP, AT1 e MYH7, e aumentou os níveis de expressão gênica do receptor MAS. Não houve alteração nos níveis de expressão gênica do ANP e GRK-5. No coração dos animais TGM(rTon) os níveis de expressão de tonina foram maiores quando comparado a seu controle. Após tratamento com ISO os níveis de expressão de tonina foram ainda maiores no TGM(rTon). Os níveis de expressão gênica do receptor AT1, de MYH7 e de BNP também se mostraram diminuídas no coração de TGM(rTon) tratado com ISO, ao passo que os níveis de expressão de ANP mostraram-se aumentados. Por RNA-seq foi constatado que 18 genes diretamente ligados a hipertrofia cardíaca (POSTN, CRLF1, LTBP2, SSP1, LOX, COL5A2, CTGF, NMRK2, ACTA1, MEOX1, CILP, NPPB (ou BNP), THBS-4, TNC, SERPINB1A, C1QTNF3, 2200002DOIRICK e PRC1) se mostraram negativamente regulados nos TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 também tratados com ISO. Os resultados foram validados por q-PCR e confirmamos que os genes POSTN, LTBP2, LOX, COL5A2, ACTA1 e NPPB estavam menos expressos nos animais TGM(rTon) tratados com ISO.

**Conclusão:** Tonina, através da regulação negativa de diversos genes exerce papel cardioprotetor importante ao impedir a hipertrofia cardíaca e celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** According to the World Health Organization, cardiovascular diseases are the major cause of mortality in the world. Cardiac hypertrophy is an adaptive process in response to chronic hemodynamic overloads, representing an important risk factor for heart diseases, such as ischemia, arrhythmia and sudden death. One of the main gaps associated with the cardiovascular diseases treatment is the complexity of the events that lead to its progression and the various manifestation forms. Tonin is a serineproteinase, capable of releasing angiotensin II (Ang II). Preliminary studies from our research group have shown that transgenic mice expressing rat tonin (TGM(rTon)) are "resistant" to isoproterenol (ISO) induced cardiac hypertrophy.

**Objective:** To identify which molecular factors and cell signaling pathways lead to cardiac hypertrophy resistance observed in the TGM(rTon) animal.

**Methods:** TGM(rTon) and its control C57 were submitted to cardiac hypertrophy induction with ISO (20 mg / kg / day), performed during 5 days. After the induction process, the index of cardiac hypertrophy was determined. Tonina of submandibular mouse gland was purified and added to isolated neonatal cardiomyocytes from rats and subjected to hypertrophic stimulation with Ang II. In these myocytes, cell-area measurements and translocation of GRK-5 to the nucleus were performed, both by immunofluorescence. The tonin expression levels in the heart were measured by Western Blot. The expression levels of several genes related to hypertrophy were evaluated by real-time PCR, in isolated cardiomyocytes and in the TGM (rTon) heart and its control. RNA-seq was performed to identify the heart transcriptome. The libraries were pooled and sequenced at 300 cycles in the paired-end sequence, and pathway enrichment analyzes were performed using enrichr 5 tool.

**Results:** Our data confirm TGM(rTon) cardiac hypertrophy resistance. In the isolated cardiomyocytes tonin prevent cellular hypertrophy Ang II-induced and decreased GRK-5 translocation to the myocyte nucleus. Tonin also reduced BNP, AT1 and MYH7 gene expression levels and increased gene expression levels of MAS receptor. There was no change in the ANP and GRK-5 gene expression levels. TGM(rTon) hearts presented higher tonin expression levels when compared to their control. After ISO treatment, tonin expression levels were even higher in TGM(rTon).

AT1, MYH7 and BNP gene expression levels were also decreased in the TGM(rTon) heart after ISO treatment and ANP expression levels were increased. In the present study it was found that 18 genes are directly associated to cardiac hypertrophy: POSTN, CRLF1, LTBP2, SSP1, LOX, COL5A2, CTGF, NMRK2, ACTA1, MEOX1, CILP, NPPB (or BNP), THBS-4, TNC, SERPINB1A, C1QTNF3, 2200002DOIRICK and PRC1. These genes were negatively regulated in the TGM(rTon) treated with ISO compared to C57 also treated with ISO. The results were validated by q-PCR and we confirmed that POSTN, LTBP2, LOX, COL5A2, ACTA1 and NPPB were less expressed in the TGM(rTon) treated with ISO.

**Conclusion:** Tonin, through negative regulation of several genes, plays an important cardioprotective role in preventing cardiac and cellular hypertrophy.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de siglas e abreviaturas encontradas no corpo do texto desta tese:

<sup>125</sup>I: Isótopo radioativo do iodo

<sup>125</sup>I-Ang II: Angiotensina II marcada com isótopo radioativo do iodo

ACTA1: Gene que codifica a proteína alfa actina 1

AG: Angiotensinogênio

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica

Ang 1-7: Angiotensina 1-7

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

ANP: Peptídeo natriurético atrial

ARA-C: Arabinofuranosida-D-citosina

AT1: Receptor de Ang II tipo 1

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

bMHC: Cadeia pesada da miosina cardíaca

BNP: Peptídeo natriurético tipo b

C1QTNF3: Gene que codifica uma proteína complementar ao fator de necrose tumoral C1q/TNF: proteína complementar ao fator de necrose tumoral

CaMK: Calmodulina quinase

CaMKII: Calmodulina quinase II

cDNA: DNA complementar

CILP: Gene que codifica proteína da camada intermediária de cartilagem

COL5A2: Gene que codifica a expressão de colágeno tipo 5 alfa 2

CRLF: Gene que codifica o receptor para citocina tipo 1

CTGF: Gene que codifica fator de crescimento da mitose

CTR: Controle

DAPI: *4,6-diamidino-2-phenylindole*

DDBJ: *DNA Data Bank of Japan*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECA 2: Enzima conversora de angiotensina 2

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*  
ERK: Quinase regulada por sinal extracelular,  
FBS: Soro fetal bovino  
FC: Frequência cardíaca  
GAPDH: Gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GRK-2: Proteína G acoplada ao receptor quinase 2  
GRK-5: Proteína G acoplada ao receptor quinase 5  
Gs: Proteína G estimulatória  
GSM: Glândula submandibular  
HDAC5: Histona desacetilase 5  
ISO: Isoproterenol  
JUNK: Quinase c-jun NH<sub>2</sub>-terminal  
kDa: Quilodaltons  
LNE: Ligação não específica  
LOX: Gene que codifica a lisil oxidase  
LTBP2: Gene que codifica o fator de crescimento e transformação ligado a proteína beta 2  
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno  
MAS: Receptor de Ang 1-7  
MEOX1: Gene que codifica proteína mesenquimal  
MHC-β: Cadeia pesada de miosina beta  
MYH-7: Gene que codifica a cadeia pesada de miosina  
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*  
NE: Norepinefrina  
NF-κB: Fator nuclear IκB  
NMRK2: Gene que codifica integrina específica de músculo beta 1  
NPPB: Gene que codifica o BNP  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
p38-MPAK: Proteína quinase ativada por mitógeno  
PA: Pressão arterial  
PBS: Solução de tampão fosfato  
PFA: Paraformaldeído

PKA: Proteína quinase A  
PKC: Proteína quinase C  
PMSF: Fenilmetilsulfonilflúor  
POSTN: Gene que codifica a periostina  
qPCR: PCR em tempo real  
Ras / Rho: Proteínas da família das pequenas GTPases  
RIE: Radioimunoensaio  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNA-seq: Sequenciamento de RNA  
RT: Transcriptase reversa  
S26: Gene que codifica a proteína ribossomal S26  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SERPINB1: Gene que codifica proteína da família das serpinas  
SNG: Sequenciadores de nova geração  
SPP1: Gene que codifica a osteopontin  
TGF- $\beta$ : Fator de crescimento tumoral beta  
TGM(rTon): Camundongo que expressa tonina de rato  
THBS4: Gene que codifica a trombospondina  
TNC: Gene que codifica tenascina C.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Hipertrofia concêntrica e excêntrica..	21
<b>Figura 2</b> - Sistema tonina-angiotensina (Rezende et al., 2016).....	23
<b>Figura 3</b> - Etapas do RNA-seq.....	30
<b>Figura 4</b> - Genotipagem.....	45
<b>Figura 5</b> - Níveis de expressão proteica de tonina. ....	46
<b>Figura 6</b> - Índice de hipertrofia cardíaca .....	47
<b>Figura 7</b> - Cromatografia em gel de Superdex HR-200. ....	49
<b>Figura 8</b> - Cromatografia em coluna Q-Sepharose.....	50
<b>Figura 9</b> - Perfil eletroforético obtido em gel de poliacrilamida a 10% para a amostra de tonina eluída da coluna de troca iônica. ....	51
<b>Figura 10</b> - Área dos cardiomiócitos .....	52
<b>Figura 11</b> - Translocação do GRK-5.....	53
<b>Figura 12</b> - Níveis de expressão gênica do MYH7 e BNP .....	55
<b>Figura 13</b> - Níveis de expressão gênica do BNP e GRK-5 .....	56
<b>Figura 14</b> - Níveis de expressão gênica dos receptores MAS e AT1 .....	57
<b>Figura 15</b> - Vias de sinalização reguladas pela presença da tonina na célula.....	59
<b>Figura 16</b> - Expressão gênica de MYH7 e ANP no coração dos animais TGM(rTon) e dos camundongos C57. ....	60
<b>Figura 17</b> - Níveis de expressão gênica do receptor AT1 no coração dos animais TGM(rTon) e dos camundongos C57 .....	62
<b>Figura 18</b> - Diagrama de Venn da expressão gênica. ....	63
<b>Figura 19</b> - Rede de interação entre as 10 principais doenças associadas ao transcriptoma encontrado.....	74
<b>Figura 20</b> - Níveis de expressão gênica de POSTN e LTBP2 no coração dos animais TGM(rTon) e seus controles. ....	83
<b>Figura 21</b> - Níveis de expressão gênica de LOX e COL5A2.....	84
<b>Figura 22</b> - Níveis de expressão de Acta-1 e BNP no coração de TGM(rTon) e seus controles.....	84
<b>Figura 23</b> - Vias de sinalização reguladas pela presença da tonina nos animais TGM(rTon).....	85



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequência dos primers sense e antisense utilizados para PCR.....	40
<b>Tabela 2</b> - Tabulação do diagrama de Venn.....	64
<b>Tabela 3</b> - Descrição dos genes diferencialmente expressos nas quatro comparações entre TGM(rTon) e c57 e nas áreas de interseção observadas no diagrama de Venn.....	64
<b>Tabela 4</b> - Doenças compatíveis com a diferença de expressão gênica observada nos animais C57 comparados com os TGM(rTon) tratados com ISO.....	70
<b>Tabela 5</b> - Doenças compatíveis com as diferenças de expressão gênica observadas nos animais C57 comparados com os TGM(rTon) tratados com salina	72
<b>Tabela 6</b> - Ranking das 10 principais patologias associadas ao transcriptoma encontrado x principais genes diferencialmente expressos .....	74

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO .....	20
1. Hipertrofia Cardíaca .....	20
2. Tonina e o Sistema Cardiovascular .....	23
3. Hipertrofia Cardíaca e Tonina .....	26
4. Genômica, Transcriptoma e Sequenciamento de RNA .....	27
5. RNA-seq .....	29
II. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS .....	31
1. Justificativa .....	31
2. Hipótese .....	32
3. Objetivos .....	32
3.1. <i>Geral</i> .....	32
3.2. <i>Específicos</i> .....	32
III. MÉTODOS .....	33
1. Considerações éticas .....	33
2. Reagentes .....	33
3. Purificação de tonina de glândula submandibular de rato .....	33
4. Determinação da atividade liberadora de Ang II .....	34
5. Radioimunoensaio para Ang II .....	35
6. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	36
7. Genotipagem .....	37
8. Animais e grupos experimentais .....	37
9. Administração do isoproterenol .....	38
10. Expressão proteica por western-blot .....	38
11. Avaliação da expressão gênica .....	38
12. Cultura de Cardiomiócitos Neonatais e Tratamentos .....	41
13. Imunofluorescência .....	42
14. Preparação das Amostras para RNA-seq .....	43
15. O Sequenciamento do RNA .....	43
16. Análise dos Dados de RNA-seq .....	43
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
1. Genotipagem dos Animais .....	45
2. Níveis de Expressão de Tonina em Coração dos Animais TGM(rTon) .....	46
3. Teste de Hipertrofia Cardíaca .....	47
4. Purificação de Tonina de Glândula Submandibular de Rato .....	48
5. Teste de Hipertrofia Celular .....	51

6. Translocação de GRK-5.....	52
7. Expressão Gênica em Cardiomiócitos Isolados de Rato.....	54
8. Expressão Gênica nos Animais TGM(rTon) .....	60
9. Transcriptoma .....	63
10. Validação dos Resultados Obtidos no Transcriptoma Através de qPCR .....	82
V. CONCLUSÕES .....	87
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
VII. ANEXO.....	102
Lista de significados dos 300 genes, diferencialmente expressos, exibidos na Tabela 3. ....	102

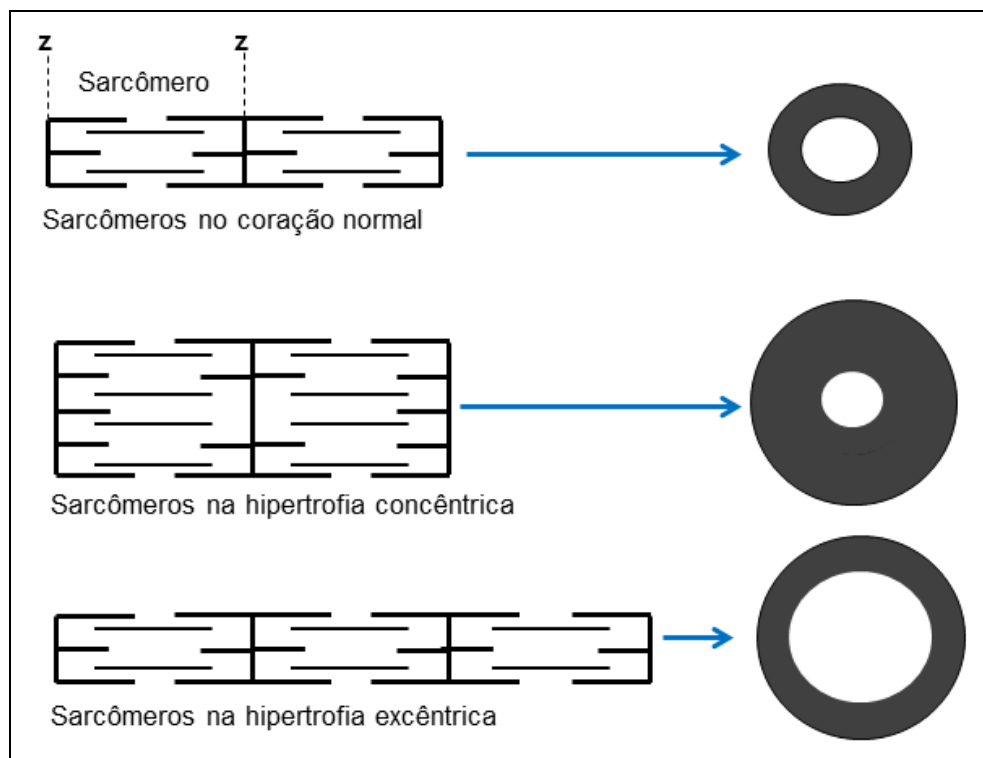
## I. INTRODUÇÃO

### 1. Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca constitui-se em processo adaptativo do miocárdio em resposta a sobrecargas hemodinâmicas crônicas e, por sua vez, representa importante fator de risco independente para doenças cardíacas (McKenna *et al.*, 1981; Levy *et al.*, 1990; Basso *et al.*, 2000; Tin *et al.*, 2002; Frey *et al.*, 2003). Segundo Anversa *et al.* (1986), a proliferação do tecido intersticial também contribui para as alterações estruturais na hipertrofia miocárdica. O remodelamento na hipertrofia, que ocorre durante aumento de fibrose intersticial, envolve interação entre os cardiomiócitos, células endoteliais e células inflamatórias (Burgoyne *et al.*, 2012).

Hipertrofias cardíacas podem ser concêntricas ou excêntricas. As hipertrofias concêntricas caracterizam-se pelo aumento da massa e da parede dos ventrículos, em especial do ventrículo esquerdo (VE), diminuição dos espaços nas cavidades ventriculares e podem ser causadas pelo aumento de resistência à ejeção ou à sobrecarga de pressão (Rossi e Carillo, 1991; de Simone, 2004). Na hipertrofia concêntrica a redução dos diâmetros das cavidades ventriculares permite ao ventrículo desenvolver maior pressão (Rossi e Carillo, 1991; de Simone, 2004). As hipertrofias excêntricas são caracterizadas pelo aumento da massa dos ventrículos, mas com aumento dos diâmetros das cavidades, geralmente, é uma resposta adaptativa a sobrecarga de volume (Rossi e Carillo, 1991; de Simone, 2004). Na hipertrofia concêntrica o incremento na síntese proteica provocado pela sobrecarga de pressão causa um “estiramento” ou adição de sarcômeros em paralelo, e na hipertrofia excêntrica os sarcômeros são adicionados em série (FIGURA 1) (Rossi e Carillo, 1991; Garcia e Incerpi, 2008; Fernandes *et al.*, 2011).

De acordo com Grossman (2013), a sobrecarga de pressão faz com que os miócitos cresçam em largura para aumentar a espessura da parede do ventrículo, regulando assim o aumento na tensão da parede.



**Figura 1** - Hipertrofia concêntrica e excêntrica. O crescimento dos cardiomiócitos na hipertrofia ventricular esquerda pode ocorrer pela adição de sarcômeros em paralelo ou em série (adaptado de Garcia e Incerpi, 2008).

Para Baker *et al.* (1992), o incremento na síntese proteica provocado pelo estresse mecânico por sobrecarga hemodinâmica induz à hipertrofia cardíaca via estiramento das fibras dos cardiomiócitos, sendo esta distensão capaz de ativar canais de  $Ca^{+2}$  tipo L, de  $Na^{+}$  e os trocadores de  $Na^{+}/H^{+}$ ; inativar canais de  $K^{+}$  ativar adenilato-ciclase e fosfolipase C (Morgan *et al.*, 1987), além de estar associado ao acúmulo de inositol de fosfato, que atua como segundo mensageiro (Von Harsdorf *et al.*, 1989; Baker *et al.* 1992).

As alterações no funcionamento dos canais iônicos do sarcolema levam a variações da concentração iônica intracelular, o que pode representar estímulo inicial para ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Heineke *et al.*, 2006). Dentre a superfamília das MAPK, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-jun NH<sub>2</sub>-terminal (JUNK) e a quinase p38 são mediadores da sinalização hipertrófica das células miocárdicas, pois induzem a transcrição de genes associados à hipertrofia (Bueno *et al.*, 2002; Heineke *et al.*, 2006). O estímulo mecânico também pode ativar as integrinas, receptores localizados na membrana celular entre a matriz extracelular (ECM) e o complexo de proteínas que formam a linha Z do sarcômero (Sussman, *et al.*, 2002).

Hipertrofias por consequência de sobrecargas de pressão, de volume e devidas ao treinamento físico apresentam características fenotípicas e funcionais distintas, mas têm como fator patogênico comum o aumento da carga hemodinâmica imposta ao coração (Frey *et al.*, 2003). É possível que o mecanismo adaptativo seja acompanhado (dependendo da intensidade e duração do estímulo) da ativação neuro-humoral, de fatores genéticos, de alterações intrínsecas dos miócitos cardíacos ou de outras células miocárdicas, predispondo o coração a um déficit no relaxamento, falência contrátil e instabilidade elétrica (Franchini, 2001; Frey *et al.*, 2003). Alguns estudos têm demonstrado que a hipertrofia ventricular em resposta à sobrecarga de volume e de pressão resultantes do treinamento físico não é acompanhada de alterações neuro-humorais, como visto na hipertrofia patológica com fibrose miocárdica (Batlouni *et al.*, 1999; Pelliccia, 1996; Frey *et al.*, 2003; Ghorayeb *et al.*, 2005).

Vários métodos têm sido utilizados para induzir hipertrofia cardíaca dentre os quais a administração crônica de isoproterenol (ISO), modelo experimental clássico de hipertrofia patológica, cujo aumento da massa ventricular é seguido por aumento de necrose e fibrose cardíaca (Tse *et al.*, 1979; Benjamin *et al.*, 1989; Leenen *et al.*, 2001). O ISO é um agonista não seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sendo que, a estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, ativa o adenilato ciclase pela interação com a proteína G estimulatória (Gs), a qual desencadeia cascatas intracelulares que ativam proteínas quinases A (PKA), estimulando também a p38-MAPK (Dash *et al.*, 2003; Heineke e Molkentin *et al.*, 2006).

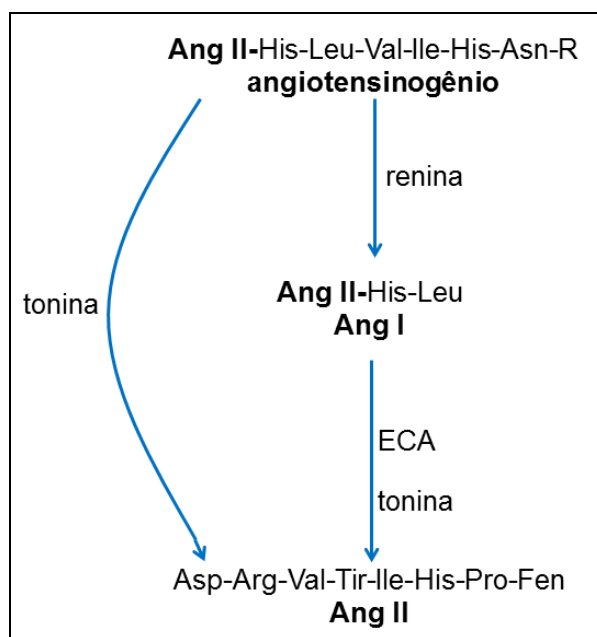
A estimulação aguda dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos é capaz de reduzir a vasodilatação, mas a estimulação crônica leva ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca concêntrica, promovendo necrose, alterações da matriz intersticial cardíaca e aumentando a expressão de *protooncogenes* que regulam o crescimento, a diferenciação celular e os estímulos à produção de colágenos e proliferação dos fibroblastos (Teerlink *et al.*, 1994; Oigman, 2000; Heineke e Molkentin *et al.*, 2006).

A hipertrofia também pode ser induzida em resposta a angiotensina II (Ang II) (Sadoshima *et al.*, 1993; Kuster *et al.*, 2005). Mutações e aumento de expressão de algumas proteínas, tais como o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético tipo b (BNP), bem como, a cadeia pesada de miosina cardíaca (bMHC), estão relacionados ao surgimento de hipertrofia cardíaca, sendo esses peptídeos

considerados marcadores hipertróficos cardíacos (Maass *et al.*, 2010; Panagopoulou *et al.*, 2013). A ativação das calmodulinas, como a calmodulina dependente de proteína quinase (CaMK) e a calmodulina dependente de proteína quinase II (CaMKII), também podem levar a transcrição de genes que promovem a hipertrofia cardíaca (Heineke e Molkentin *et al.*, 2006; Yamazaki *et al.*, 2010).

## 2. Tonina e o Sistema Cardiovascular

Tonina, conforme mostrado na Figura 2, é uma serinilproteínase que compõe o sistema tonina-angiotensina, pois é capaz de liberar Ang II por hidrólise da ligação Fen<sup>8</sup>-His<sup>9</sup> tanto na sequência do angiotensinogênio (AG) como da angiotensina I (Ang I) (Grisé *et al.*, 1981; Pesquero *et al.*, 1982; Rezende *et al.*, 2016). Tonina também pode liberar Ang II a partir de substratos sintéticos homólogos da porção N-terminal do AG, incluindo o tetradecapeptídeo AG(1-14) (Schiller *et al.*, 1976; Pesquero *et al.*, 1982).



**Figura 2** - Sistema tonina-angiotensina (Rezende *et al.*, 2016).

Em tecidos de rato, tonina está presente como uma única cadeia polipeptídica contendo 272 aminoácidos, com massa molecular de 27 kDa, determinado através de eletroforese em gel de poliacrilamida, e o pH ótimo para a sua atividade é de 6,8 (Boucher *et al.*, 1974). Esta enzima pode estar expressa em vários tecidos de rato,

tais como testículos, fígado, córtex, medula renal, baço, cérebro, pulmão, parótida, próstata, pâncreas e glândula submandibular (GSM), onde a enzima está presente em níveis mais elevados, representando cerca de 10% do total de proteínas expressas (Pesquero *et al.*, 1982; Rezende *et al.*, 2016). Uma revisão completa sobre a enzima tonina e o sistema tonina-angiotensina está disponível no capítulo de livro intitulado *Tonin: An overview and funcional analysis* (Rezende *et al.*, 2016).

Em ratos, tonina pode ser liberada na corrente sanguínea e na saliva após estimulação adrenérgica, pois esta aumenta a síntese de tonina na GSM de rato, e esses efeitos podem ser mediados pela adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (Garcia *et al.*, 1983, Rezende *et al.*, 2016). Contudo, é descrito na literatura que a administração de ISO, que é um agonista beta-adrenérgico, não estimula a liberação de tonina.

A capacidade da tonina de liberar Ang II aguçou o interesse de investigação sobre o papel dessa enzima no processo hipertensivo e no sistema cardiovascular, levando ao entendimento, por meio de diferentes estudos, que tonina pode realmente estar envolvida na gênese e manutenção da hipertensão arterial (Boucher *et al.*, 1978; Kondo *et al.*, 1980; Sciffin *et al.*, 1981; Araujo *et al.*, 1992; Damasceno *et al.*, 2013; Rezende *et al.*, 2016).

Em 1980, Kondo *et al.* determinaram os efeitos da administração intracerebroventricular (ICV) de tonina sobre o consumo de água e a PA (pressão arterial) no rato. Esses autores verificaram que a injeção de tonina no cérebro estimulou a ingestão de água e aumentou a pressão sanguínea. Tais respostas foram suprimidas pela administração de um antagonista de Ang II. Os autores concluíram que tonina pode participar da regulação fisiológica do equilíbrio hídrico e pressão arterial através da geração local e direta de Ang II no sistema nervoso central (Kondo *et al.*, 1980, Rezende *et al.*, 2016).

Schiffirin *et al.* (1981) também corroboraram a tese de que tonina tem efeito hipertensor quando observaram que, ao ser injetada por via intravenosa em ratos, a enzima produz aumento da pressão arterial dose-dependente e que a administração de um antagonista da Ang II pode abolir esse efeito. Em outros dois estudos, os autores demonstraram que, após infusão de tonina via intravenosa em ratos, ocorreu aumento nos níveis de secreção de aldosterona e corticosterona, enquanto a



atividade da renina no plasma foi significativamente reduzida (Scriffin *et al.*, 1981, 1982; Rezende *et al.*, 2016).

Araujo *et al.* (1992) também observaram aumento de PA e frequência cardíaca no período de 10 a 20 minutos após a microinjeção central de tonina. Esses efeitos foram parcialmente bloqueados pela administração prévia de losartan (antagonista do receptor AT1). Esses dados sugerem que tonina pode ser uma via alternativa para a geração de Ang II no cérebro, participando dos efeitos fisiológicos exercidos pela Ang II.

Damasceno *et al.* (2013), verificaram que tonina é capaz de produzir o peptídeo vasoconstritor Ang II no coração isolado de ratos, e que a resposta cardiovascular induzida por tonina foi completamente bloqueada por candesartan (antagonista do receptor AT1), uma indicação de que a ação da Ang II sobre os receptores AT1 é o principal mecanismo dos efeitos cardíacos.

Quanto ao efeito que tonina teria sobre a reatividade vascular, foi descrito que tonina é capaz de potenciar a contração induzida por norepinefrina (NE) em aorta e mesentérica de ratos e coelhos hipertensos e normotensos. A administração de saralasin (antagonista do receptor de Ang II) não inibiu esse efeito, o que sugere que Ang II não é o mediador. Bloqueadores alfa e beta-adrenérgicos também não foram capazes de alterar a contração direta ou a contração induzida pela NE. Contudo, a utilização de um meio livre de cálcio, bem como a administração de verapamil (bloqueador de canal para cálcio), produziu uma inibição de 75% da contração induzida por tonina, o que sugere a participação do cálcio no efeito vasoativo da tonina (Garcia *et al.*, 1981; Rezende *et al.*, 2016).

Cardoso *et al.* (2010) publicaram trabalho no qual descrevem algumas características de um camundongo transgênico que expressa tonina de rato (TGM(rTon)). Os autores geraram o animal com a perspectiva de que o transgene fosse expresso somente no cérebro. No entanto, embora o animal tenha apresentado o cérebro como local de maior expressão do transgene, níveis menores de expressão foram observados em outros tecidos como coração e rim. Como consequência, os animais TGM(rTon) desenvolvem leve aumento da PA e da ingestão de água. Os autores mostraram ainda que lisinopril (um inibidor da enzima conversora de angiotensina) é menos hipotensor para TGM(rTon) que para os animais controle (selvagens). A administração de candesartan reduz igualmente a

PA em camundongos transgênicos e nos camundongos selvagens (Cardoso *et al.*, 2010).

Também foi verificado que os níveis de Ang II se encontram aumentados no plasma dos camundongos TGM(rTon) em comparação com o animal controle e que os receptores AT1 (receptor de Ang II) são menos sensíveis nesse modelo transgênico (Cardoso *et al.*, 2010). Cardoso *et al.* (2010) concluíram que tonina no cérebro pode representar uma via alternativa para gerar Ang II, o que poderia produzir diversos efeitos sobre o sistema cardiovascular.

Mais recentemente, Ribeiro *et al.* (2015) mostraram que a atividade de tonina está aumentada nos rins dos animais TGM(rTon) em comparação com os respectivos controles (selvagens). A atividade tonina foi correlacionada positivamente com a expressão de tonina no rim, tanto nos TGM(rTon) como nos camundongos selvagens, enquanto os níveis de atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), bem como, seus níveis de expressão também se mostraram significativamente aumentados nos rins dos TGM(rTon) quando comparados com os controles (Ribeiro *et al.*, 2015). Os níveis de expressão de ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2), se mostraram maiores no TGM(rTon), quando comparados com camundongos selvagens, e, os níveis de angiotensina 1-7 (Ang 1-7) e Ang I se apresentaram significativamente mais baixos nos TGM(rTon) (Ribeiro *et al.*, 2015).

### **3. Hipertrofia Cardíaca e Tonina**

Vários métodos têm sido utilizados para induzir hipertrofia cardíaca, dentre os quais, a administração de isoproterenol (ISO), que é um modelo experimental clássico e bem estabelecido de indução de hipertrofia ventricular esquerda, cujo aumento da massa ventricular é seguido por um aumento de necrose e fibrose cardíaca (Benjamin *et al.*, 1989). Cronicamente, a estimulação  $\beta$ -adrenérgica desenvolve a hipertrofia cardíaca patológica por promover a necrose, alterações da matriz intersticial cardíaca e por aumentar a expressão de *protooncogenes* que regulam o crescimento, a diferenciação celular e os estímulos à produção de colágenos e crescimento dos fibroblastos (Teerlink *et al.*, 1994; Oigman, 2000; Heineke e Molkentin *et al.*, 2006).

Outra via de indução de hipertrofia é a da Ang II, que, quando liberada a partir do miocárdio, em resposta a um estresse mecânico, se liga ao seu receptor, e ativa a proteína Gq e, em seguida, a proteína quinase C (PKC), para iniciar a sinalização para o complexo da enzima de proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase (Inagaki *et al.*, 2002). Alguns dos componentes do MAP-quinase promovem sinalização adaptativa que permite a sobrevivência dos cardiomiócitos (via ativação da ERK), ao passo que a ativação de outros componentes que estimulam a apoptose celular (via JUNK) leva a hipertrofia patológica (Inagaki *et al.*, 2002; Ghigo *et al.*, 2002; Heineke e Molkentin *et al.*, 2006).

Em estudos com hipertrofia cardíaca induzida por ISO em ratos, Borges *et al.* (2003) verificaram que os níveis de atividade tonina se mostraram duas vezes maiores nos átrios dos animais hipertrofiados, entretanto, a hipertrofia não alterou os níveis de atividade de tonina nos ventrículos. A expressão de renina não foi detectada nessas estruturas e os níveis de expressão da ECA também não se mostraram alterados com a hipertrofia. O mesmo estudo ainda observa que tanto os níveis de expressão de AG quanto os níveis de RNAm de tonina se mostraram aumentados nos átrios após a hipertrofia induzida por ISO. Com estes resultados, os autores concluíram que tonina pode desempenhar algum papel no processo de hipertrofia cardíaca no rato (Borges *et al.*, 2003). Mais recentemente Rezende e colaboradores (2016), com objetivo de contribuir para o estudo da participação de tonina no processo de hipertrofia cardíaca verificaram que o animal TGM(rTon) apresentou resistência a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol. Estes dados mostram a necessidade de um estudo aprofundado com objetivos de se determinar os fatores moleculares envolvidos na resistência a hipertrofia cardíaca apresentada pelo animal TGM(rTon). Uma alternativa para isso seria a utilização da genômica como ferramenta para determinação do transcriptoma dos animais TGM(rTon) e de seu controle em nível do coração.

#### **4. Genômica, Transcriptoma e Sequenciamento de RNA**

O primeiro método de sequenciamento de DNA foi descrito por Sanger *et al.* (1977), e o princípio geral do sequenciamento compreendia sintetizar uma fita de DNA marcada, complementar à fita de interesse. O trabalho desenvolvido por Sanger

viabilizou os primeiros projetos de sequenciamento de genomas, dando origem a genômica. Entretanto, os primeiros sequenciamentos completos de genomas foram publicados pela primeira vez apenas em 1995, quando foram descritos os genomas completos das bactérias *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium* (Fleischmann *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1995).

A partir dos primeiros sequenciamentos, a genômica passou a se desenvolver juntamente com a bioinformática, possibilitando a caracterização genômica de todo, e qualquer, ser vivo conhecido. A anotação de um genoma pode ser feita a partir da identificação de genes (anotação estrutural) ou predição da função do gene (anotação funcional). A anotação funcional é feita a partir da utilização de bancos de dados de sequências já conhecidas e programas de alinhamento entre sequências como, por exemplo, o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990). A utilização do alinhamento de uma nova sequência obtida no banco de dados biológicas contendo informações como ontologia, ortologia e vias metabólicas é de grande importância para a qualidade da anotação funcional (Thomas, *et al.*, 2007). Os bancos de genes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) são considerados importantes bases de dados para sequências anotadas. Contudo, a quantidade de dados em cada banco de gene não é diretamente proporcional à quantidade de conhecimento disponibilizado (Wren e Bateman, 2008). O NCBI é uma referência para bases de dados, onde podem ser encontradas bases para depósitos de sequências, consultas de artigos científicos, domínios conservados, e muitas outras informações relevantes para a pesquisa biológica (Sayers *et al.*, 2012).

Com o aumento da tecnologia disponível para pesquisa biológica e o desenvolvimento da técnica de Sanger, foi possível produzir sequenciadores automáticos de DNA. O primeiro sequenciador foi o ABI 370 lançado em 1986. Em 1998, foi a vez do primeiro sequenciador de eletroforese capilar, o ABI 3100. Com a automatização do processo foi possível realizar grandes projetos de sequenciamento, como o do genoma humano (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Os sequenciadores atuais, produzidos a partir de 2005, utilizam metodologias diferentes da descrita por Sanger, apostando em estratégias para eliminar as etapas

mais laboriosas, que são a clonagem em vetores bacterianos e a eletroforese, e assim baratear e aperfeiçoar todo o processo. Enquanto que um sequenciador de eletroforese capilar processa, no máximo, 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração (SNG) podem sequenciar mais de 500 milhões de fragmentos simultaneamente (Chevreux *et al.*, 2004).

A primeira plataforma de SNG comercializada foi a 454, da empresa Roche, que realiza o sequenciamento baseado em síntese, através da técnica de pirosequenciamento (Marguilies *et al.*, 2005). Posteriormente, surgiram muitas outras técnicas de sequenciamento, entre elas as plataformas MiSeq e HiSeq da Illumina e a SoliD e Ion Torrent da Life Technologies. Dentre as plataformas citadas, as da Illumina se destacam pelo grande volume de sequências obtidas, grande espectro de utilidade, além de ter menor custo por base sequenciada (Glenn, 2011; Quail *et al.*, 2012).

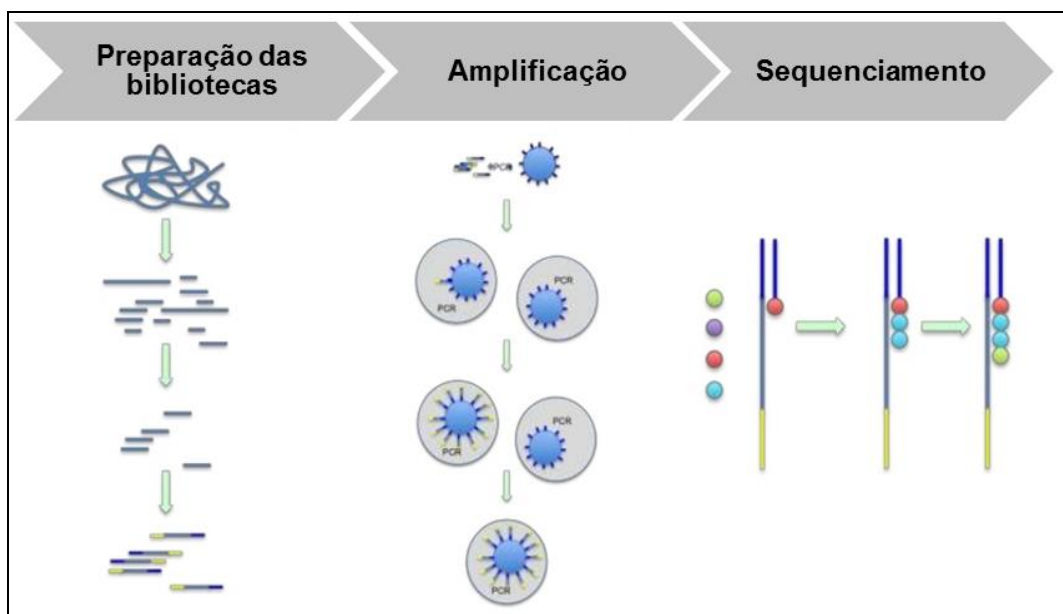
## 5. RNA-seq

É bem conhecido na literatura que o fenótipo de um organismo é em parte determinado pelos genes expressos em suas diferentes células e o transcriptoma é todo o conjunto de moléculas de RNA (transcritos) de uma célula, tecido ou organismo (Velculescu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009). Diferentemente do genoma, o transcriptoma varia de acordo com o tecido e função celular, bem como com o estágio de desenvolvimento ontogenético do organismo (Soares *et al.*, 2006). O transcriptoma pode ser definido como uma ponte que liga o genoma e o fenótipo de um organismo, portanto, representa um passo intermediário importante na expressão gênica. Além disso, o transcriptoma pode ser afetado por fatores externos, como, por exemplo, alterações no meio ambiente, tratamentos com drogas e interações com outros organismos (Velculescu *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009).

Recentemente, as plataformas de NSG propiciaram novas maneiras de se mapear e quantificar transcritos. O método mais atual de estudo do transcriptoma, através de plataformas de NSG, é o sequenciamento de RNA (RNA-seq) (Wang, *et al.*, 2009).

A técnica de RNA-seq permite que os fragmentos de RNA, que são convertidos em cDNA e se ligam a adaptadores em ambas as extremidades, sejam amplificados e

sequenciados em uma (*single-end*) ou ambas as extremidades (*paired-end*) (FIGURA 3) (Wang, *et al.*, 2009).



**Figura 3** - Etapas do RNA-seq. Primeiramente o RNA é convertido para uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores ligados a uma ou ambas as extremidades. Na sequência, o cDNA é amplificado e cada molécula (amplificada ou não) é então sequenciada para se obter sequências curtas.

No RNA-seq, cada sequência gerada (*read*) pode ter de 35 a 400 pares de bases (pb) e após o sequenciamento, as *reads* podem ser alinhadas contra um genoma de referência, que permite o mapeamento da estrutura e estimativa dos níveis de expressão de cada gene, ou podem ser utilizadas para a montagem de novo do transcriptoma (Holt e Jones, 2008). A técnica de RNA-seq oferece ainda muitas vantagens como, por exemplo, a detecção de transcritos desconhecidos, aplicabilidade em organismos sem genoma e transcriptoma caracterizados, detecção e diferenciação da expressão de alelos e isoformas, detecção de limites de íntrons e exons, detecção de polimorfismos de nucleotídeo único, além de não haver um limite máximo para quantificação dos transcritos (Cloonan e Sean, 2008; Nagalakshmi *et al.*, 2008).

## II. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 1. Justificativa

De acordo com os dados de saúde da população global, observados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa de mortalidade no mundo, sendo que as doenças cardíacas isquêmicas ocupam a primeira posição, seguidas por infarto, na segunda posição (Lloyd-Jones *et al.*, 2010; WHO, 2017 [acesso em 21 de agosto de 2017]). Ainda segundo a OMS, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 15 milhões de mortes no mundo, durante o ano de 2015 (WHO, 2017 [acesso em 21 de agosto de 2017]).

Uma das principais lacunas associadas ao tratamento das doenças cardiovasculares são a complexidade dos eventos que levam à sua progressão e as diversas formas de manifestação. Buscando compreender quais as principais doenças cardiovasculares que provocam mortes no mundo, Orn e Dickstein (2002) publicaram uma revisão de literatura abordando o tema, e chegaram à conclusão que, aproximadamente, 90% dos pacientes com insuficiência cardíaca morrem de complicações cardiovasculares, sendo que 50% vêm a óbito a partir da progressão da insuficiência cardíaca e a outra metade falece de morte súbita causada por arritmias e eventos isquêmicos. Ainda segundo os autores, metade dos óbitos por morte súbita tem como causa eventos isquêmicos agudos e 35% de todas as mortes por doença cardiovascular tem como causa a falência cardíaca isquêmica.

A hipertrofia ventricular esquerda é considerada fator de risco para insuficiência cardíaca e mortalidade cardiovascular, pois pode comprometer tanto a função contrátil, quanto o relaxamento do VE, e ainda produzir arritmias e eventos isquêmicos no coração (McKenna *et al.*, 1981; McKenna *et al.*, 1988; Basso *et al.*, 2000; Tin *et al.*, 2002, Houston *et al.*, 2002).

Estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa mostram que os animais TGM(rTon) são “resistentes” a estímulos hipertróficos quando se usa o isoproterenol

como modelo de indução de hipertrofia cardíaca. Entretanto, não há ainda, na literatura, dados que nos permitam entender os mecanismos pelos quais tonina poderia induzir essa “resistência” a hipertrofia cardíaca.

Tento em vista a relevância da morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares no mundo, considerou-se de grande importância científica e social compreender os mecanismos pelos quais as doenças cardiovasculares se estabelecem ou podem ser prevenidas. Assim sendo, o efeito protetor da tonina no coração e os fatores moleculares que levam a resistência à hipertrofia cardíaca no animal TGM(rTon) consistem nos objetos de estudo desta tese de doutorado.

## **2. Hipótese**

Tonina altera a expressão gênica que promove resistência a hipertrofia cardíaca.

## **3. Objetivos**

### *3.1. Geral*

Identificar os fatores moleculares envolvidos com a resistência à hipertrofia cardíaca induzida pela tonina.

### *3.2. Específicos*

1. Avaliar, em células isoladas de ratos *Wistar*, se a presença da tonina é capaz de reverter à hipertrofia cardíaca;
2. Verificar se a expressão do receptor AT1 encontra-se alterada com a presença da tonina, em células isoladas de ratos *Wistar*;
3. Avaliar se a presença da tonina influencia a expressão e translocação do GRK-5 nas células isoladas de ratos *Wistar*;
4. Verificar, em células isoladas de ratos *Wistar*, se a expressão dos marcadores pró-hipertroficantes BNP, ANP e MYH7 encontram-se alteradas na presença da tonina;
5. Avaliar se o tratamento com ISO produz hipertrofia cardíaca nos animais TGM(rTon);



6. Verificar, nos animais TGM(rTon), se a expressão dos marcadores pró-hipertróficos BNP, ANP e MYH7 e receptor AT1 encontram-se alteradas após o tratamento com ISO, em comparação com os camundongos C57;
7. Determinar, por meio de RNA-seq, quais genes são diferencialmente expressos no TGM(rTon), em comparação com os C57;
8. Determinar, por meio de RNA-seq, quais genes são diferencialmente expressos no TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 tratados com ISO.

### **III. MÉTODOS**

#### **1. Considerações éticas**

O projeto que deu origem a esta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número de protocolo 142/2010.

#### **2. Reagentes**

O  $^{125}\text{I}$  (isótopo radioativo do iodo) utilizado para radiomarcagem da Ang II foi de procedência *Amersham Internacional*. Os demais reagentes utilizados, de grau analítico, foram de procedência Merck ou Sigma. As colunas de filtração em gel *Superdex HR 200* e de troca iônica Q-Sepharose *fast flow* foram de procedência *Amersham Internacional*. O anticorpo anti-Ang II utilizado no radioimunoensaio (RIE), apresentando título de 1/4000, foi produzido no laboratório de Biofísica do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG. O anticorpo anti-tonina de rato também foi produzido pelo nosso grupo de pesquisa, em nosso laboratório, utilizando-se tonina isolada de glândula submandibular de rato conforme método proposto por Araújo *et al.* (1992).

#### **3. Purificação de tonina de glândula submandibular de rato**

As glândulas submandibulares de rato foram retiradas e lavadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) em abundância para retirada do excesso de sangue. Posteriormente, as glândulas foram homogeneizadas em solução sacarose 250 mM

gelada, contendo os inibidores enzimáticos EDTA, dipiridil, orto-fenantrolina e tetracionato de sódio, todos na concentração 10 mM e pH ajustado para 7,0. O homogenato bruto obtido foi tratado com sulfato de amônio a 80% de saturação para precipitação de proteínas, sendo em seguida, centrifugado por 60 minutos a 15.000xg a 4°C. A atividade liberadora de Ang II no homogenato bruto foi determinada através de radioimunoensaio (RIE). Para tal, o precipitado obtido na etapa anterior foi ressuspensionado em água, sendo uma alíquota dialisada exaustivamente contra tampão fosfato 75 mM e pH ajustado para 6,8. Alíquotas de 1,0 mL foram aplicadas em cromatografia de filtração em coluna *Superdex HR-200* (1,6 x 35,0 cm), pré-equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 75 mM contendo NaCl 150 mM (pH 6,8), num fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 1,0 mL. A eluição dos componentes proteicos foi acompanhada pela leitura da densidade óptica a 280 nm. Frações representativas de cada um dos picos de densidade óptica foram incubadas para identificação da atividade liberadora de Ang II. Os volumes das frações ativas desta cromatografia foram juntados e concentrados contra polietileno glicol 6000 e então dialisados contra tampão tris-HCl 20 mM, pH 8,4. Este material foi aplicado em coluna de troca iônica Q-Sepharose (1,5 x 2,0 cm), previamente equilibrada em tampão tris-HCl 20 mM, pH 8,4. Inicialmente, a coluna foi eluída com este tampão até densidade óptica zero. Em seguida, as proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas com tampão tris contendo concentrações crescentes de NaCl (100, 200, 300, 500 e 1000 mM). O fluxo foi mantido a 1,0 mL/min, sendo coletadas frações de 1,0 mL. A atividade liberadora de Ang II foi rastreada em todos os picos de densidade óptica, sendo o volume das frações ativas juntados. A fração ativa obtida nessa etapa foi dialisada contra tampão fosfato 50 mM e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação do grau de pureza da amostra.

#### **4. Determinação da atividade liberadora de Ang II**

A atividade liberadora de Ang II foi determinada a partir de substrato Ang I sintética. Alíquotas da amostra, da etapa anterior, contendo 1 µg de proteína foram incubadas com 160 µg de Ang I por 2 horas a 37° C em tampão fosfato 100 mM pH 6,8 contendo EDTA 12 mM, dipiridil 25 mM, orto-fenantrolina 10 mM e tetracionato de

sódio 10 mM. A reação foi interrompida por adição de 5  $\mu\text{L}$  de HCl 6 M. A Ang II liberada foi determinada por RIE (Gualberto *et al.*, 1992).

## 5. Radioimunoensaio para Ang II

Foram utilizadas soluções padrões estoque de Ang II, em torno de  $10^{-3}\text{M}$ , que foram diluídas serialmente até uma faixa de concentração de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}\text{M}$  em tampão fosfato de sódio 0,02 M contendo gelatina 0,1% (p/v), azida sódica 0,1% (p/v), NaCl 150 mM e EDTA 1 mM e pH ajustado para 7,4 (tampão RIE). As amostras foram ensaiadas em triplicatas. O volume de Ang II padrão pipetado a cada tubo da curva, variava de 40 a 200  $\mu\text{L}$ . A Ang II marcada com iodo radioativo ( $^{125}\text{I}$ -Ang II) foi inicialmente diluída em tampão RIE de modo a ser obtido aproximadamente 8000 cpm (contagens por minuto) em 100  $\mu\text{L}$  de solução. Desta solução, pipetava-se 100  $\mu\text{L}$  em cada tubo do ensaio. A seguir, as amostras provenientes das incubações prévias, como descrito anteriormente, foram pipetadas em triplicatas. Após essa etapa, foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-Ang II (previamente diluído 1/800) em todos os tubos do ensaio, exceto nos referentes à ligação não específica e total. O volume de cada tubo foi ajustado para 500 $\mu\text{L}$  com tampão RIE. Após agitação dos tubos, estes foram incubados a 4°C por 18-24 horas. Transcorrido este período, realizou-se a separação da Ang II radioativa livre daquela ligada ao anticorpo por adsorção em uma suspensão de carvão contendo 0,625g de carvão e 0,0625g de *dextran T-70* para cada 100 mL de tampão RIE. Esta suspensão foi mantida em banho de gelo e dela pipetávamos 1,0 mL em cada tubo de ensaio, exceto nos tubos referentes ao controle do total. Após agitação dos tubos, estes foram mantidos em repouso por 15 minutos, em banho de gelo, e então, os tubos foram submetidos à centrifugação a 4°C, por 20 minutos, a 2000xg. O sobrenadante foi decantado e levado para contagem em contador gama (minigama LKB), sendo os cálculos baseados na dependência do logito B/Bo e em função do logaritmo da concentração do padrão (Rodbard *et al.*, 1969), sendo B e Bo, as contagens obtidas referentes a Ang II marcada ligada ao anticorpo, na presença e na ausência da Ang II padrão, respectivamente.

A reação cruzada entre substrato e o anticorpo anti-Ang II também foi descontada através de curva padrão obtida somente para a interação entre o substrato e o

anticorpo. No ensaio, incluíamos ainda, outros três tubos que continham somente a  $^{125}\text{I}$ -Ang II para a determinação da ligação não específica, representada pela contagem registrada na ausência do anticorpo anti-Ang II e outros três tubos, nos quais a suspensão de carvão foi substituída por 1,0 mL de tampão RIE. Esses tubos indicavam o valor da atividade radioativa total adicionada a cada tubo do ensaio.

## **6. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A eletroforese vertical foi realizada em escala analítica, empregando-se o método descrito por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi efetuada à temperatura ambiente, utilizando-se tampão tris-glicina 20 mM pH 8,3, tanto para o ânodo como para o cátodo e tensão constante de 100 V. As frações ativas obtidas nas várias etapas do processo de purificação, contendo de 5 a 50  $\mu\text{g}$  de proteínas, foram solubilizadas em tampão tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v) na ausência de agentes redutores e desnaturantes. As amostras e os padrões de massa moleculares conhecidos, foram submetidos à fervura por 5 minutos e logo após, foram rapidamente centrifugados e aplicados nas canaletas do gel de concentração. Para coloração dos géis pela prata, utilizamos o método descrito por Tunon e Johansson (1984), parcialmente modificado. Todo o processo foi efetuado sob lenta agitação. Após a corrida eletroforética, o gel foi pré-fixado por 60 minutos, sequencialmente em cada uma das soluções contendo metanol, ácido acético glacial e água deionizada nas proporções de 100:15:85 e 10:15:175. Na terceira etapa de fixação, o gel foi imerso em solução de glutaraldeído a 10% (v/v) durante 60 minutos. Após este tempo, o gel foi lavado com água deionizada por 45 minutos, sendo realizadas sucessivas trocas de água a cada intervalo de 5 minutos. Terminado o procedimento de lavagem, o gel foi mergulhado em solução de nitrato de prata a 0,4% (p/v) e aí permanecia por um período de 30 minutos. Ao término deste tempo o gel foi lavado com água deionizada por 15 minutos, sendo esta trocada a cada 5 minutos. A seguir o gel foi submetido ao processo de revelação em solução de ácido cítrico ( $5,7 \times 10^{-4}$  M) contendo 0,1% (v/v) de formaldeído. O processo de revelação foi interrompido pela transferência do gel para uma solução de ácido acético a 1% (v/v).

## **7. Genotipagem**

Para confirmar o genótipo dos camundongos utilizados, foi retirado um pedaço da calda dos animais (aproximadamente 0,5 cm) e realizada a extração do DNA utilizando proteinase K (10 mg/mL) e posteriormente tratamento para eliminar contaminação de RNA com RNase (4 mg/mL). A concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro com leituras a 260 e 280 nm. Foi utilizado aproximadamente 1 µg de DNA para realizar a reação de polimerase em cadeia (PCR) com os óligos TONEX 3 e TONEX 4 (tabela 1).

O produto da reação de cadeia de polimerase (PCR) foi aplicado em gel de poliacrilamida 6% e a eletroforese realizada por 2 horas a 60 V. Os géis foram fixados com solução fixadora (ácido acético glacial 0,5% e etanol 10%) por 5 minutos sob agitação baixa. Após fixação os géis foram lavados com água mili-Q e colocados em solução corante (prata 0,02 mg/mL) dissolvida em solução fixadora diluída 3x por 8 minutos sob baixa agitação. Em seguida os géis foram lavados com água mili-Q e colocados em solução reveladora (NaOH 0,75 M acrescido de 150 µL de formaldeído) sob baixa agitação até o surgimento das bandas, que foram comparadas com padrão de massa molecular de DNA.

## **8. Animais e grupos experimentais**

Foram utilizados camundongos machos, com idade entre 12 e 14 semanas, das linhagens TGM(rTon) e C57. Todos os animais foram submetidos ao ciclo claro-escuro natural, criados em número máximo de cinco animais por gaiola, à temperatura de 24°C e livre acesso a alimento e água. Foram distribuídos em quatro grupos, a saber:

Grupo 1: camundongos C57 que não receberam estímulo hipertrófico, somente veículo (solução salina);

Grupo 2: camundongos C57 que receberam estímulo hipertrófico (isoproterenol);

Grupo 3: camundongos TGM(rTon) que não receberam estímulo hipertrófico, somente veículo (solução salina);

Grupo 4: camundongos TGM(rTon) que receberam estímulo hipertrófico (isoproterenol).

## **9. Administração do isoproterenol**

O ISO foi administrado na dose de 20 mg/kg/dia, dissolvido em salina 0,9%, e os animais do grupo controle receberam somente salina 0,9%. O tratamento crônico teve duração de 5 dias. No sexto dia os animais foram sacrificados. O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado pela razão da massa em miligramas (mg) de tecido cardíaco pelo comprimento da tibia em milímetros (mm).

## **10. Expressão proteica por western-blot**

Para determinar o efeito do tratamento com ISO sobre os níveis de expressão das proteínas envolvidas na função cardíaca, as amostras de coração foram homogeneizadas em tampão de lise, centrifugadas, e o sobrenadante foi misturado ao tampão de amostra (desnaturante). Na sequência, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida. Os géis foram colocados em tampão de corrida e foi aplicado campo elétrico (100 V durante 120 minutos, aproximadamente). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, utilizando um sistema de transferência *semi-dry* (*Trans-blot turbo*, Biorad, Singapore) e as membranas incubadas durante 3 horas com solução de bloqueio. Posteriormente as membranas foram incubadas pernoite com anticorpo primário. Cada membrana foi incubada com o anticorpo específico para a proteína investigada, e o anticorpo secundário específico para o primário. As bandas proteicas foram detectadas por reação de quimiluminescência no C-DiGit *Chemiluminescence Western Blot Scanner* (Li-cor, USA).

## **11. Avaliação da expressão gênica**

Para determinar o efeito dos tratamentos com isoproterenol e Ang II sobre a expressão gênica de marcadores hipertróficos cardíacos foi utilizada a técnica de transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

(qPCR). Para a extração de RNA total utilizou-se o reagente Trizol® (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA-USA*) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total foi quantificado em *NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)*, utilizando-se 1 µL de cada amostra. Todas as amostras de RNA total foram tratadas com *DNase (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA)*, e quantificadas novamente. A reação de transcrição reversa foi feita a partir de 733 ng de RNA total em 20,3 µL de volume final de reação, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a transcriptase reversa (RT) dos transcritos alvos. O RNA total foi desnaturado a 70°C por 10 minutos juntamente com os iniciadores reversos (10 pmols cada). Em seguida incubados com transcriptase reversa em tampão RT (KCl 50 mM, tris-HCl 20 mM, pH 8,4), 2 µL de dNTP mix (10 mM de cada) e água livre de *RNase* para completar o volume final. A reação foi incubada a 45°C por 1 hora, finalizada a 4°C e utilizada imediatamente para a PCR. Todos os reagentes foram provenientes da *Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR)*.

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas a qPCR realizada no equipamento *ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System*, utilizando-se o *SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)*. As amostras foram aplicadas em placas de 384 poços (*ABI PRISM®, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), em duplicata, em volume final de reação de 20 µL. Em cada poço foram pipetados 1,6 µL de amostra, e adicionados posteriormente 18,4 µL do mix contendo 4 µL do *SYBR Green PCR master mix kit*, 0,15 µL de cada iniciador (sense e anti-sense) (10 pmols) e água estéril filtrada para completar o volume. A placa foi selada com adesivo óptico (*ABI PRISM® optical adhesive covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*).

As reações de qPCR ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem foi realizada a curva de *melting* a 60°C por 1 minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados. A expressão dos genes ANP, BNP, MYH7, receptor AT1, receptor MAS, GRK-5, LTBP2, COL5A2, Acta-1, LOX, e POSTN foram avaliadas por qPCR. Na Tabela 1, estão descritas as sequências dos *primers* utilizados.

**Tabela 1** - Sequência dos primers sense e antisense utilizados para PCR

<b>Gene alvo</b>	<b>Sequência do <i>oligonucleotídeo</i></b>
<b>Acta 1</b>	<b>Sense:</b> GGGTGTTCATGGTAGGTATG <b>Antisense:</b> GTACTTCAGGGTCAGGATAC
<b>ANP</b>	<b>Sense:</b> GGATTTCAAGAACCTGCTAG <b>Antisense:</b> CCCTGCTTCCTCAGTCTGC
<b>AT1</b>	<b>Sense:</b> GCACCGTGAACGAGGGGGTG <b>Antisense:</b> GGGGTCTGCAGCAGCGTCTG
<b>BNP</b>	<b>Sense:</b> CCACCTTTGAAGTGATCC <b>Antisense:</b> TGTGGCAAGTTTGTGC
<b>COL5A2</b>	<b>Sense:</b> CTGTGCCAATCCTATAACAC <b>Antisense:</b> TGTCCCTTTCTTCCTCTAC
<b>GAPDH</b>	<b>Sense:</b> CAGCGACTCCCCTCTTCCACC <b>Antisense:</b> GTTGCTGTAGCCGAACCTCATTG
<b>GRK-5</b>	<b>Sense:</b> CCATTTTCGAGGTCGCAAGGAGA <b>Antisense:</b> CTGCTTCGAGTCTTTGGTGAGC
<b>LOX</b>	<b>Sense:</b> GGATGTTATGACACCTATGC <b>Antisense:</b> GGGTTTACACTGACCTTTAG
<b>LTBP2</b>	<b>Sense:</b> AGTGGTCAAGGTTACATCC <b>Antisense:</b> GCCCAAACAGTACACATTC
<b>MAS</b>	<b>Sense:</b> CCCACCCATTCCCATAGTGC <b>Antisense:</b> CCGAGAGGAGAGATGCTCATG
<b>MYH7</b>	<b>Sense:</b> GAGACGGAGAATGGCAAGAC <b>Antisense:</b> GGTCAGCATGGCCATGTC
<b>POSTN</b>	<b>Sense:</b> GGCGATGGTCACTTATTTG



	<b>Antisense:</b> GTTGGCTGGTATCTTCTTTG
<b>S26</b>	<b>Sense:</b> CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT <b>Antisense:</b> CGATTCTAACAACCTTGCTATG
<b>TONEX 3</b>	<b>Sense:</b> AGGTGGTGTGAAGGTTATCG
<b>TONEX 4</b>	<b>Antisense:</b> CCTCCTTCCATCTCTCCTGC

O teste t não pareado e *One-way ANOVA* foram utilizados para avaliar a expressão dos transcritos dos genes alvos. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 6*. Os resultados normalizados foram expressos pelo  $\Delta$ CT do gene alvo –  $\Delta$ CT do normalizador S26 (gene que codifica a proteína ribossomal S26) (Livak e Schmittgen, 2001).

## 12. Cultura de Cardiomiócitos Neonatais e Tratamentos

Cardiomiócitos neonatais foram isolados de acordo com metodologia previamente descrita por Guatimosim *et al.*, (2008). No dia 0 (zero), os animais foram esterilizados com solução de etanol 70% e decapitados e o coração retirado. O tecido cardíaco foi picotado e lavado com solução gelada de HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*), livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . A digestão com tripsina (0,5 mg/mL em HBSS) ocorreu sob agitação a 2-8°C pernoite (16-20 horas) em tubo de centrífuga de 50 mL devidamente vedado. Após o período de tripsinização (1º dia), as células foram tratadas com inibidor de tripsina (1-2 mg por preparação) e posteriormente submetidas à digestão com colagenase (5 mg por preparação, diluídos em 5 mL de meio L-15) por 40 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante e o preparado foi filtrado para a remoção do tecido não digerido (membrana de 70  $\mu\text{m}$ ). O material celular foi centrifugado a 50-100 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 2 mL de meio M199, suplementado com penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), 10% de FBS (soro fetal bovino), 2,2 g de  $\text{NaHCO}_3$  e 2 mmol/L de L-glutamina. Após essas etapas foi realizado o pré-plaqueamento das células em frascos (garrafas) de cultura T-75, por aproximadamente duas horas em estufa de  $\text{CO}_2$ , temperatura 37°C,

objetivando a aderência dos fibroblastos ao plástico. Em seguida, o material em suspensão foi recolhido e devidamente plaqueado em placas de seis poços previamente tratadas com fibronectina. As placas de cultura foram mantidas na estufa de CO<sub>2</sub>, temperatura 37°C, por 16-20 horas para a aderência dos cardiomiócitos. No 2º dia ARA-C (*cystosine-D-arabinofuranoside*) foi adicionado ao meio, para concentração final de 20 µg/mL, para impedir o crescimento e divisão de fibroblastos remanescentes. Após 48 horas (no 4º dia) os poços foram lavados por três vezes com meio sem soro e iniciado o tratamento dos cardiomiócitos com Ang II, Ang II + tonina 10 nM, Ang II + tonina 100 nM, tonina 10 nM ou tonina 100 nM. As células controle não receberam tratamento. Após 36h de tratamento as células foram lavadas.

### **13. Imunofluorescência**

Cardiomiócitos neonatos foram fixados com solução 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em solução tampão fosfato (PBS), por 15 minutos à temperatura ambiente. Logo após, procedeu-se à lavagem para remoção do PFA e permeabilização da membrana celular utilizando solução de PBS/Triton 0,5%. Após o bloqueio por 1 hora, os cardiomiócitos foram incubados, pernoite, a 4°C com um dos seguintes anticorpos: anti- $\alpha$ -actinina (1:150, Sigma-Aldrich) e anti-GRK-5 (1:50, Santa Cruz Biotecnologia). As células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a *Alexa Fluo 488* (1:500, Invitrogen) e *Alexa Fluo 633* (1:500, Invitrogen) por 1 hora a 4°C. Entre a incubação do primário com secundário e após a incubação do secundário, as lâminas foram lavadas por 30 minutos com PBS (6 vezes de 5 minutos). A marcação nuclear foi obtida incubando as células com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 mg/mL, 1:25). As lâminas foram observadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (CAPI, ICB, UFMG). A análise da fluorescência foi realizada usando o software *ImageJ* e a medida da área celular foi avaliada utilizando o software *LSM Image Browser* da Zeiss. A área celular foi calculada com base na marcação com  $\alpha$ -actinina.

## 14. Preparação das Amostras para RNA-seq

A extração do RNA total das amostras de coração foi realizada com o kit *Qiagen RNeasy Micro* (Qiagen: 74004), e posteriormente as amostras de RNA total foram tratadas com *DNase TURBO* (Ambion: AM2238) pelo período de 1 hora e após esta etapa as amostras foram repurificadas com o mesmo kit utilizado para extração de RNA. Todas as amostras de RNA foram quantificadas usando o kit *Qubit RNA HS Assay* (Q32852, Thermo Fisher Scientific) e avaliadas no espectrofotômetro *NanoDrop ND- 1000* (*NanoDrop Technologies*).

## 15. O Sequenciamento do RNA

Após a extração e purificação do RNA, a integridade do RNA obtido foi verificada usando o kit *Agilent RNA 6000 Pico* (5067-1513 *Agilent Technologies*) e em seguida o RNA foi analisado no equipamento *2100 Bioanalyzer Instrument* (*Agilent Technologies*). As bibliotecas de cDNA foram preparadas usando o kit *Ion Total RNA-Seq* (*Ion Torrent*, Cat number 4475936). A geração de clusters foi realizada no sequenciador *Ion Torrent* (*Thermo Fisher*) usando o kit *Ion Total RNA-Seq*. As bibliotecas foram agrupadas e sequenciadas a 300 ciclos, na sequência *paired-end*, usando o kit *HiSeq 4000 SBS* (*Thermo Fisher*, Cat number FC-410- 1003) no mesmo sequenciador já descrito.

## 16. Análise dos Dados de RNA-seq

O controle de qualidade das *reads* foi por meio do programa *Fast QC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). E o processamento foi realizado com o programa de trimagem e remoção de adaptadores *Trimmomatic* v.0.30 de acordo com os protocolos descritos por Bolger *et al.* (2014). Com esse comando foi possível remover os adaptadores utilizados durante o sequenciamento, além de filtrar *reads* menores que 36 pares de base e remover pontas com o valor de qualidade médio menor que 15 pares de bases (bases com incerteza de leitura maiores que 3%) em uma janela de 4 nucleotídeos.

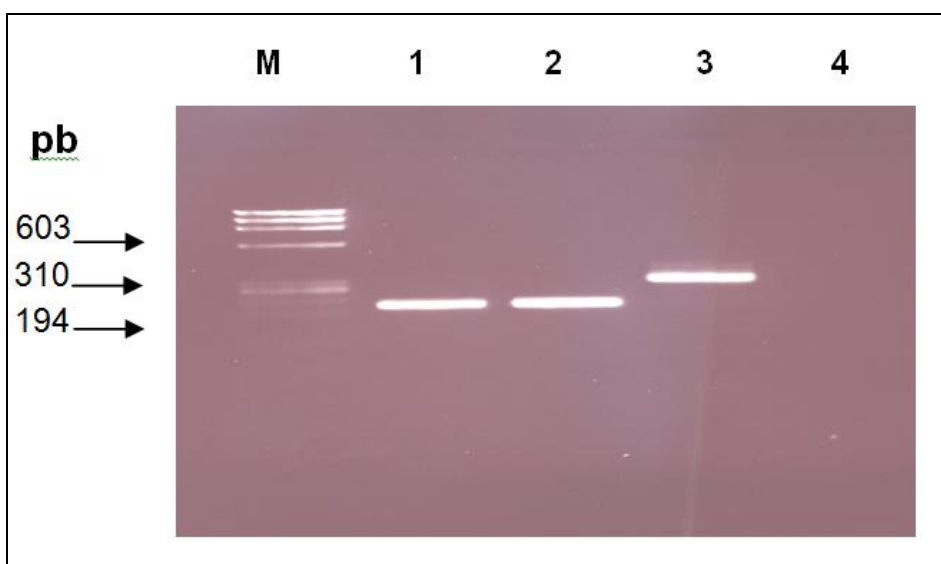
As sequências do transcriptoma foram alinhadas contra a versão *GRCm38* do genoma através do alinhador *STAR* (v. 2.5.0a) conforme descrito por Dobin *et al.* (2013). Os alinhamentos das amostras apresentaram uma média de 90% de mapeamento e as *reads* mapeadas foram utilizadas para a procura de genes diferencialmente expressos nas condições experimentais propostas. Para isso utilizamos o pacote de contagem escrito para a ferramenta “R” chamado *GenomicRanges*, de acordo com o protocolo descrito por Lawrence *et al.* (2013), usando como o transcriptoma referência a versão M11 do *gencode*. A expressão diferencial foi testada entre as condições com a ferramenta *EdgeR* (v. 3.16.5) (Robinson *et al.*, 2010). A ferramenta *EdgeR* foi ajustada para simular replicadas e foi utilizado o filtro de genes diferencialmente expressos para os genes que possuíam um valor de FDR (*False Discovery Range*) menor que 5%.

As análises de enriquecimento de vias foram feitas utilizando os genes diferencialmente expressos em cada condição como entrada para a ferramenta *enrichr* (5) (Kuleshov *et al.*, 2016).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Genotipagem dos Animais

Inicialmente, os camundongos TGM(rTon) e seus controles selvagens (C57) foram genotipados e separados em matrizes. Biópsias das caudas dos camundongos na idade de 4 semanas foram submetidas à extração do DNA genômico para verificação da incorporação do transgene no genoma do animal. Para tal análise procedeu-se com a técnica de PCR, sendo utilizados iniciadores específicos, os quais abrangem as regiões do exon 3 (TONEX3) e exon 4 (TONEX4) do cDNA da tonina de rato. Os produtos de amplificação foram então analisados em gel de agarose 1% como pode ser observado na Figura 4.

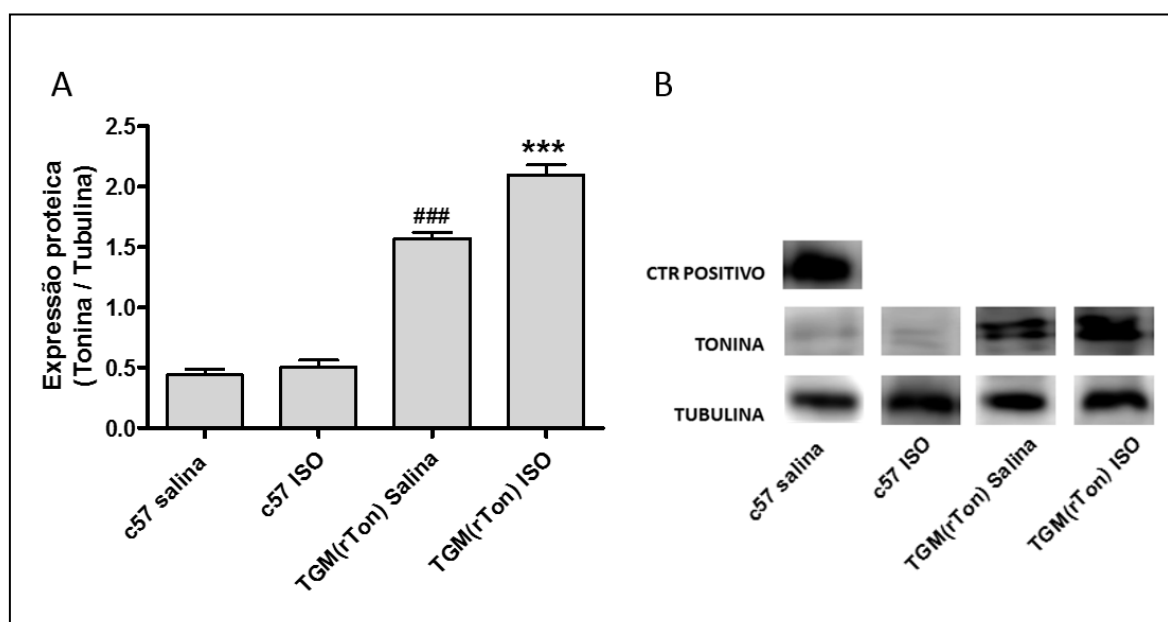


**Figura 4** - Genotipagem. Produtos de amplificação por PCR do DNA genômico das biópsias das caudas dos ratos e camundongos. Canaleta M: marcador de massa molecular de DNA ( $\phi$ X174); Canaletas 1 e 2: produto da amplificação do DNA genômico de camundongos positivos; Canaleta 3: produto da amplificação do DNA genômico de rato (controle positivo); Canaleta 4: amplificação do DNA genômico de camundongo considerado negativo.

Foram considerados positivos os camundongos cujo DNA, após amplificação, apresentou como produto uma banda de 215 pares de bases (pb), referente à sequência dos exons 3 e 4 do gene da tonina de rato, sem o intron (FIGURA 4). O DNA genômico de rato apresentou um produto com 315 pb, pois nesse caso existe um intron entre os exons 3 e 4.

## 2. Níveis de Expressão de Tonina em Coração dos Animais TGM(rTon)

Em seguida, foi verificada se a expressão da enzima tonina estava aumentada nos camundongos TGM(rTon). Para tal, os experimentos foram realizados com os camundongos c57 tratados com salina e ISO, bem como com os camundongos transgênicos tratados com salina e ISO. Conforme pode ser visto na Figura 5, há um aumento de expressão da tonina nos animais TGM(rTon) e após o estímulo pró-hipertrófico com ISO, a expressão de tonina aumenta ainda mais nos animais TGM(rTon). Nos camundongos c57 podemos ver uma expressão baixa de tonina que provavelmente corresponde a reatividade cruzada com tonina endógena de camundongo.



**Figura 5 - A.** Níveis de expressão proteica de tonina no átrio dos animais TGM(rTon) e seus controles, determinados por Western blotting. \*\*\*p < 0,001 = TGM(rTon) salina vs. C57 salina e C57 ISO; ###p < 0,001 = TGM(rTon) ISO vs. TGM(rTon) salina. **B.** Imagem representativa da expressão proteica de tonina na glândula submandibular de rato (controle positivo) e nos átrios dos camundongos TGM(rTon) e selvagens.

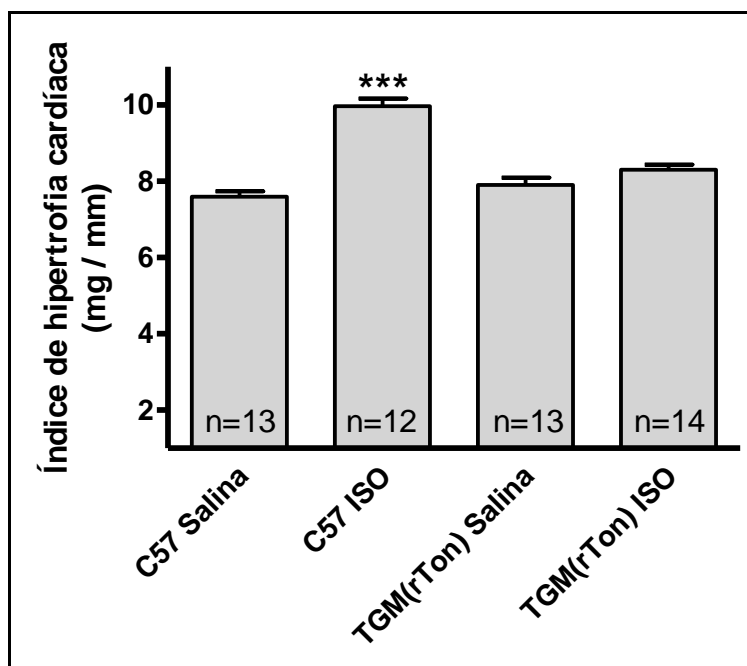
As médias e desvios padrão, em unidades arbitrárias, são: Selvagem salina =  $0,44 \pm 0,09$ ; Selvagem ISO =  $0,5 \pm 0,11$ ; Tonina salina =  $1,57 \pm 0,1$  Tonina ISO =  $2,1 \pm 0,16$ .

Os resultados de expressão de tonina no TGM(rTon) após tratamento com ISO corroboram os dados obtidos por Borges *et al.* (2002), que descreveu um aumento na atividade da enzima no átrio dos ratos com ISO. Entretanto, esse autor relacionou

o aumento da atividade de tonina com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em ratos, sugerindo que tonina teria atividade pró-hipertrofica.

### 3. Teste de Hipertrofia Cardíaca

Para verificar se o aumento da expressão de tonina nos animais TGM(rTon) pode estar relacionado com a resistência à hipertrofia cardíaca induzida por ISO, o índice de hipertrofia cardíaca foi determinado nos animais TGM(rTon) e selvagens tratados com ISO ou salina. Verificamos que os animais TGM(rTon) tratados com ISO não apresentaram aumento no índice de hipertrofia cardíaca quando comparados com seus respectivos controles. Contudo, podemos observar que os camundongos selvagens apresentaram aumento no índice de hipertrofia cardíaca após receberem tratamento com isoproterenol, mostrando que o modelo utilizado para induzir hipertrofia foi ineficaz apenas nos camundongos transgênicos (FIGURA 6).



**Figura 6** - Índice de hipertrofia cardíaca determinado pela razão entre a massa do coração e comprimento da tíbia. As médias e desvios padrão são: Selvagem salina =  $7,6 \pm 0,5$ ; Selvagem ISO =  $9,97 \pm 0,7$ ; Tonina salina =  $7,9 \pm 0,7$ ; Tonina ISO =  $8,3 \pm 0,5$ .\*\*\*p < 0,001= selvagem salina vs. Grupos TGM(rTon).

Foram obtidos os seguintes valores para o índice de hipertrofia cardíaca (médias e desvios padrão): Selvagem salina =  $7,6 \pm 0,5$ ; Selvagem ISO =  $9,97 \pm 0,7$ ; Tonina salina =  $7,9 \pm 0,7$ ; Tonina ISO =  $8,3 \pm 0,5$ .

Os resultados desses experimentos, que avaliaram o índice de hipertrofia cardíaca (FIGURA 6), corroboram dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Rezende *et al.* 2016). Entretanto, tais resultados contrastam com os resultados publicados por Borges *et al.* (2002), no qual os autores apontam tonina como responsável pela hipertrofia cardíaca induzida por ISO em ratos. Como os resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 mostram que o mesmo grupo experimental que apresenta aumento da expressão de tonina também se mostra resistente à hipertrofia cardíaca, esses dados nos induziram a associar a presença da tonina a uma função cardioprotetora.

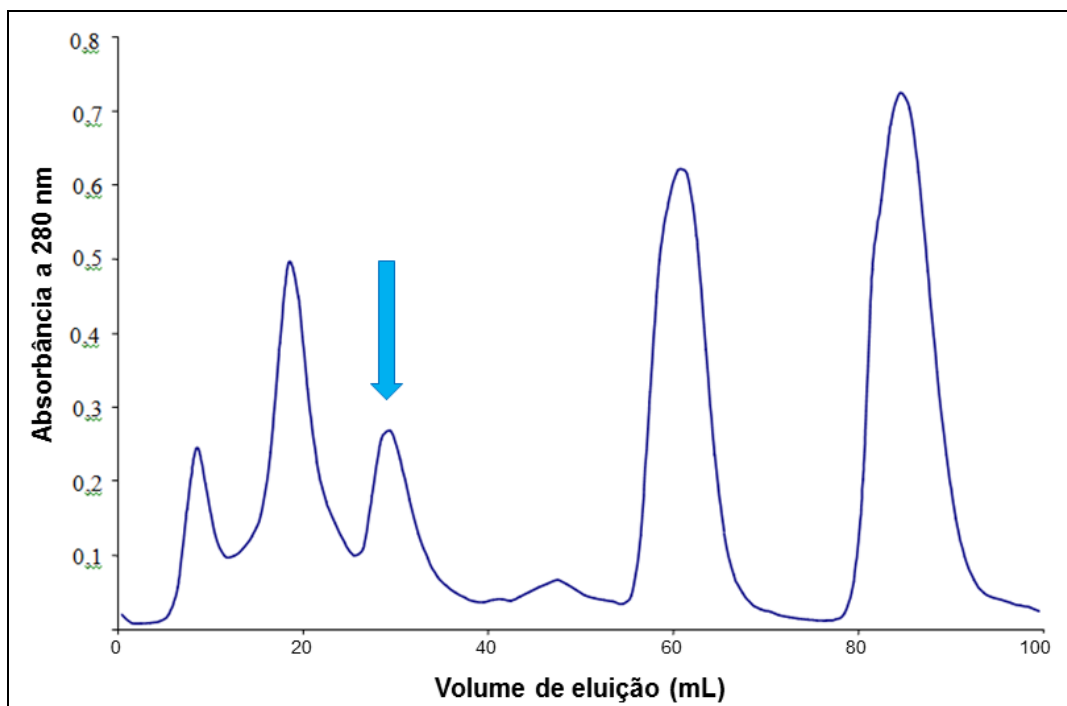
Contudo, a aparente resistência a hipertrofia cardíaca dos TGM(rTon) poderia estar relacionada a espécie, ou a manipulação genética para inserção do transgene. Surgiu, então, um questionamento sobre o significado do aumento de expressão e atividade de tonina nos ratos tratados com ISO (Borges *et al.*, 2002). Estariam esses níveis aumentados por um mecanismo cardioprotetor?

#### **4. Purificação de Tonina de Glândula Submandibular de Rato**

A partir desses primeiros resultados, o presente trabalho tomou dois caminhos. O primeiro deles tinha a intenção de elucidar qual o papel da enzima tonina na resistência a hipertrofia e, para isso, outro modelo experimental foi adotado: o tratamento de cardiomiócitos de rato *Wistar* com a enzima tonina isolada de glândula submandibular de ratos. O segundo caminho teve o objetivo de compreender quais os genes estariam envolvidos na resistência à hipertrofia cardíaca do animal geneticamente modificado. As duas linhas de pensamento visaram, desde o começo, identificar se a presença da tonina poderia promover a resistência à hipertrofia, ou se a modificação genética realizada nos animais TGM(rTon) poderia estar influenciando na cardioproteção observada.

Com objetivo de verificar o efeito da adição de tonina sobre a hipertrofia, induzida por Ang II em cardiomiócitos isolados de ratos, a enzima tonina foi obtida e purificada a partir de glândula submandibular de ratos *Wistar* adultos, utilizando o método de cromatografia de filtração em gel *Superdex HR 200*. A cada cromatografia eram aplicadas 3,2 mg de proteína. A Figura 7 ilustra o perfil cromatográfico obtido nesta etapa de purificação.

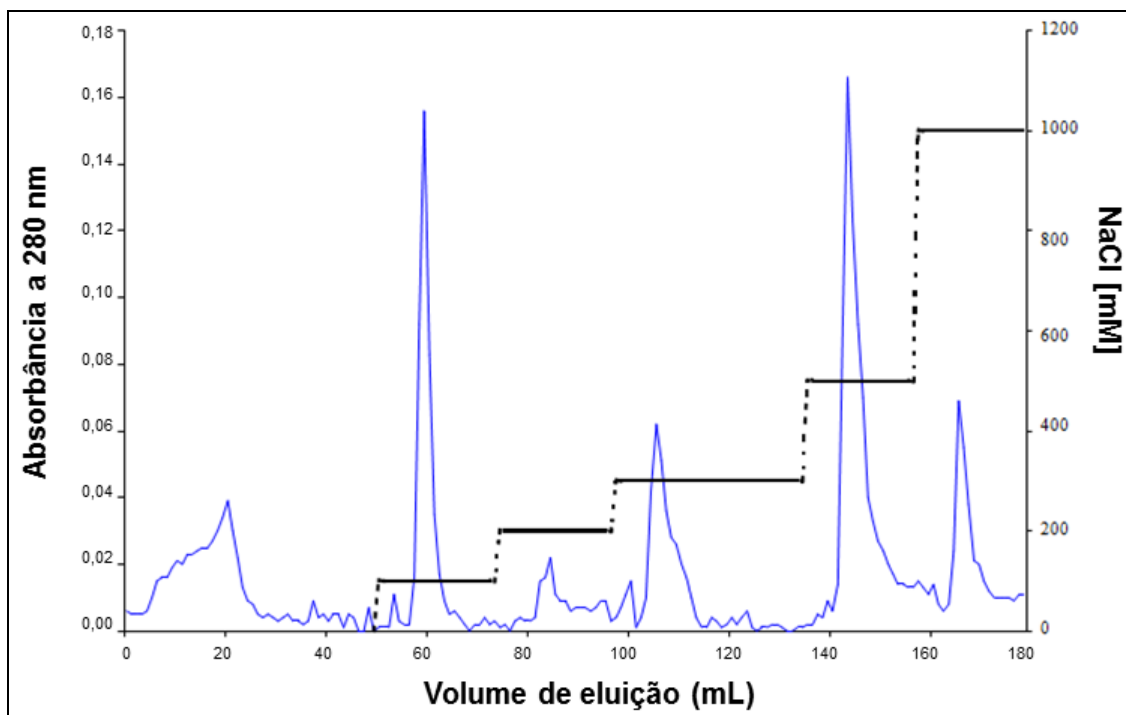




**Figura 7** - Cromatografia em gel de Superdex HR-200. Perfil de eluição do material proveniente do homogeneizado de glândula submandibular de rato, obtido em coluna de filtração em gel de Superdex HR-200 (1,6 x 35,0 cm), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 75 mM contendo NaCl 100 mM (pH 6,8), em fluxo 1 mL/min, foram coletadas frações de 1,0 mL. A seta azul representa as frações com atividade de tonina.

Foi verificado que, a atividade liberadora de Ang II estava presente nas frações correspondentes ao 3º pico de eluição, conforme indicado pela seta azul no gráfico. Foram realizadas três corridas cromatográficas desse material para que se pudesse obter quantidade suficiente da fração ativa para dar continuidade ao processo de purificação. Todas as frações ativas foram juntadas, resultando num volume final de 42,0 mL. Este material foi colocado para concentrar contra polietileno glicol 6000 e em seguida para dialisar contra tampão tris-HCl 20 mM pH 8,4 contendo EDTA 1 mM. O volume obtido após a diálise foi de 22,0 mL, e a proteína total foi estimada em 1,46 mg.

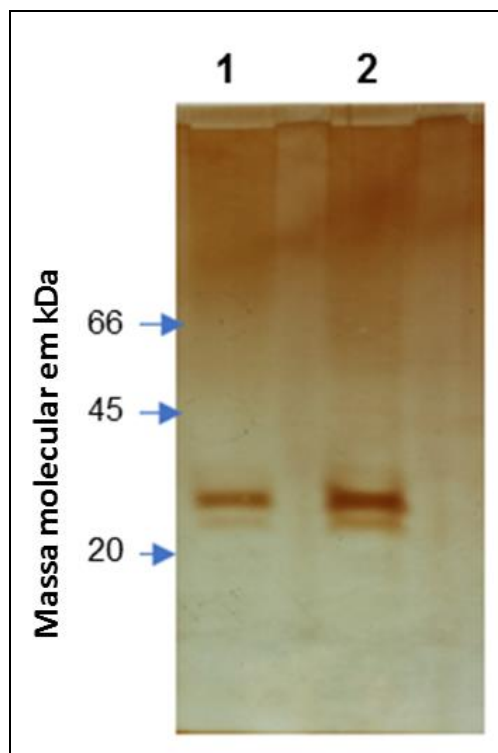
A fração ativa, obtida na etapa anterior, foi aplicada em coluna de troca iônica Q-Sepharose e as proteínas adsorvidas a matriz da coluna foram eluídas, previamente, em tampão tris-HCl 20 mM pH 8,4 contendo EDTA 1 mM e, em seguida, com este mesmo tampão contendo NaCl nas concentrações de 100, 200, 300, 500 e 1000 mM. O perfil de eluição obtido na cromatografia de troca iônica está apresentado na Figura 8.



**Figura 8** - Cromatografia em coluna Q-Sepharose. Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca iônica Q-Sepharose (1,6 x 2,0 cm) do material proveniente da cromatografia em Superdex HR 200, eluída com tampão tris-HCl 20 mM contendo EDTA 1 mM (pH 8,4) em fluxo de 1,0 mL/min. Foram coletadas frações de 1,0 mL. A linha tracejada (---) indica a concentração de NaCl no tampão de eluição.

Foi encontrada atividade liberadora de Ang II nas frações correspondentes às frações eluídas com 100 mM de NaCl. As frações ativas deste pico foram juntadas e foram determinados atividade específica e conteúdo proteico. O conteúdo proteico foi estimado em 0,125 mg/mL e a atividade específica encontrada foi de 1,984  $\mu$ M de Ang II liberados /min/mg de proteína.

As frações com atividade tonina foram juntadas, o conteúdo proteico determinado e aplicado em eletroforese em gel de poliacrilamida para verificar o grau de pureza (FIGURA 9).

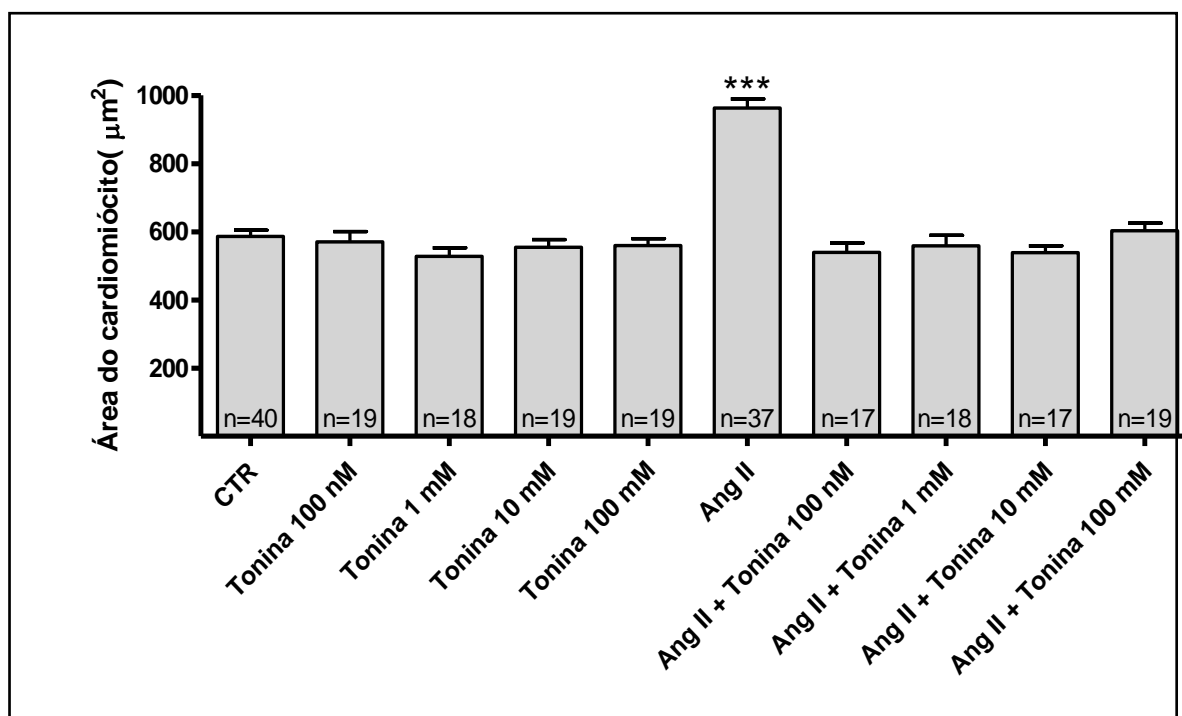


**Figura 9** - Perfil eletroforético obtido em gel de poliacrilamida a 10% para a amostra de tonina eluída da coluna de troca iônica. Na canaleta **1** foi aplicado 1  $\mu$ g de proteína e na canaleta **2** foram aplicados 2  $\mu$ g de proteína.

Como pode ser observado na Figura 9, a enzima encontra-se, após cromatografia de troca iônica *Q-Sepharose*, com alto grau de pureza. Além disso, a atividade específica da tonina foi mensurada em 1980  $\mu$ Moles de Ang II liberados /min/mg de proteína, semelhante ao descrito por Pesquero *et al.* (1982) para a enzima pura.

## 5. Teste de Hipertrofia Celular

Tonina purificada de glândula submandibular de rato foi utilizada como tratamento para cultura de cardiomiócitos neonatos, a fim de verificar o papel da enzima na hipertrofia celular induzida por Ang II. Observou-se que o tratamento das células cardíacas com Ang II de fato promoveu hipertrofia celular (FIGURA 10). Entretanto, foi constatado que os miócitos que receberam tratamento com tonina e Ang II não apresentaram alterações significativas na área celular, quando comparadas com o controle (CTR), bem como, com as células tratadas apenas com tonina.

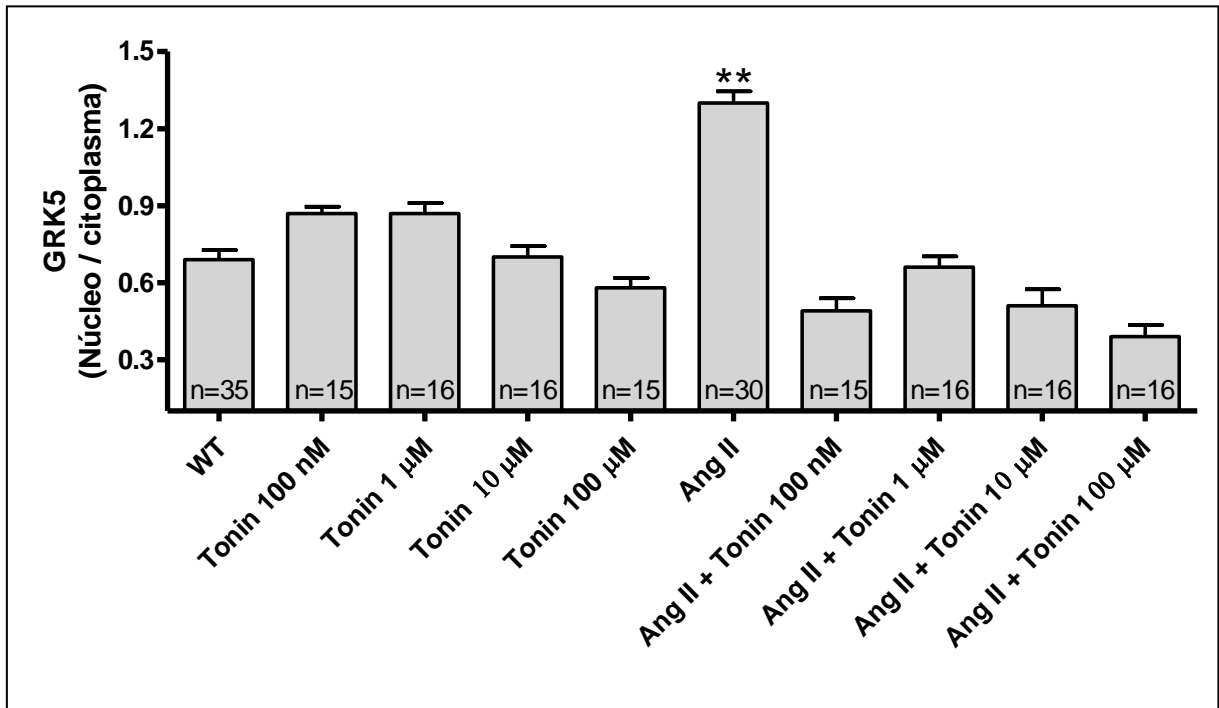


**Figura 10** - Área dos cardiomiócitos, medida no programa Zen, da Zeiss por meio da medida da área total do cardiomiócito em  $\mu\text{m}^2$ . \*\*\* $p < 0,001$  = Ang II vs. demais grupos.

As médias e desvios padrão, expressos em  $\mu\text{m}^2$ , foram os seguintes: CTR =  $587 \pm 112$ ; Tonina 100 nM =  $571 \pm 1290,1$ ; Tonina 1  $\mu\text{M}$  =  $528 \pm 109$ ; Tonina 10  $\mu\text{M}$  =  $555 \pm 98$ ; Tonina 100  $\mu\text{M}$  =  $560 \pm 88$ ; Ang II =  $963 \pm 160$ ; Ang II + Tonina 100 nM =  $540 \pm 113$ ; Ang II + Tonina 1  $\mu\text{M}$  =  $559 \pm 130$ ; Ang II + Tonina 10  $\mu\text{M}$  =  $539 \pm 83$ ; Ang II + Tonina 100  $\mu\text{M}$  =  $603 \pm 101$ . Esses resultados sustentam a hipótese de que a presença da tonina pode atuar impedindo a hipertrofia celular.

## 6. Translocação de GRK-5

Em seguida foram avaliadas as medidas da translocação da proteína G acoplada ao receptor quinase 5 (GRK-5) para o núcleo nas células isoladas de rato tratadas com tonina. Notou-se que a adição de tonina no meio de cultura celular não influenciou na translocação do GRK-5 para o núcleo dos cardiomiócitos nas concentrações testadas. Entretanto, quando essas células foram tratadas com Ang II houve aumento na translocação do GRK-5, mas esse aumento não ocorreu nos cardiomiócitos tratados com Ang II e tonina. Esses resultados podem indicar que a via de sinalização do GRK-5 está envolvida na hipertrofia celular induzida por Ang II, mas é bloqueada na presença da tonina (FIGURA 11).



**Figura 11** - Translocação do GRK-5 para o núcleo celular, determinada pela razão entre a fluorescência do núcleo pelo citoplasma. \*\*p < 0,01 = Ang II vs. demais grupos.

Estes resultados podem indicar que a via de sinalização do GRK-5 está envolvida na hipertrofia celular induzida por Ang II, mas é bloqueada na presença de tonina. As médias e desvios padrão, em unidades arbitrárias, para os níveis de translocação de GRK-5 são os seguintes: CTR =  $0,69 \pm 0,22$ ; Tonina 100 nM =  $0,67 \pm 0,1$ ; Tonina 1 µM =  $0,87 \pm 0,16$ ; Tonina 10 µM =  $0,7 \pm 0,17$ ; Tonina 100 µM =  $0,58 \pm 0,15$ ; Ang II =  $1,3 \pm 0,25$ ; Ang II + Tonina 100 nM =  $0,49 \pm 0,19$ ; Ang II + Tonina 1 µM =  $0,66 \pm 0,17$ ; Ang II + Tonina 10 µM =  $0,51 \pm 0,24$ ; Ang II + Tonina 100 µM =  $0,39 \pm 0,18$ .

O GRK-5 é considerado um dos principais mediadores da fosforilação da histona desacetilase 5 (HDAC5) e da fosforilação e translocação do fator nuclear IκB (NF-κB) para o núcleo da célula, e que estão fortemente ligados a hipertrofia celular cardíaca (Martini *et al.*, 2008; Hullmann *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016). Park *et al.* (2016) demonstraram que na hipertrofia celular induzida por urotensina, o GRK-5 desempenha um importante papel como mediador da ativação de NF-κB e HDAC5. Park *et al.* (2016) apontam ainda, que os animais GRK-5 nocaute apresentavam níveis reduzidos de IκB no núcleo da célula e o aumento da atividade de NF-κB foi observado. Outro estudo demonstrou que, as interações entre GRK-5 e IκB promoveram a acumulação nuclear de IκB, o que levou à inibição da atividade de NF-κB e, conseqüentemente, a hipertrofia celular (Sorriento *et al.*, 2008).

Assim sendo, os efeitos observados (FIGURAS 10 e 11) corroboram a nossa hipótese de que tonina atua conferindo cardioproteção contra a hipertrofia cardíaca, independentemente da manipulação genética realizada nos TGM(rTon). A prevenção do aumento da área celular após indução da hipertrofia com Ang II (Figura 10) e a prevenção da translocação do GRK-5 para o núcleo (Figura 11) pode ser atribuída à presença da tonina na cultura celular e mostram que tonina exerce papel modulador sobre as vias de sinalização que levam a hipertrofia celular.

## 7. Expressão Gênica em Cardiomiócitos Isolados de Rato

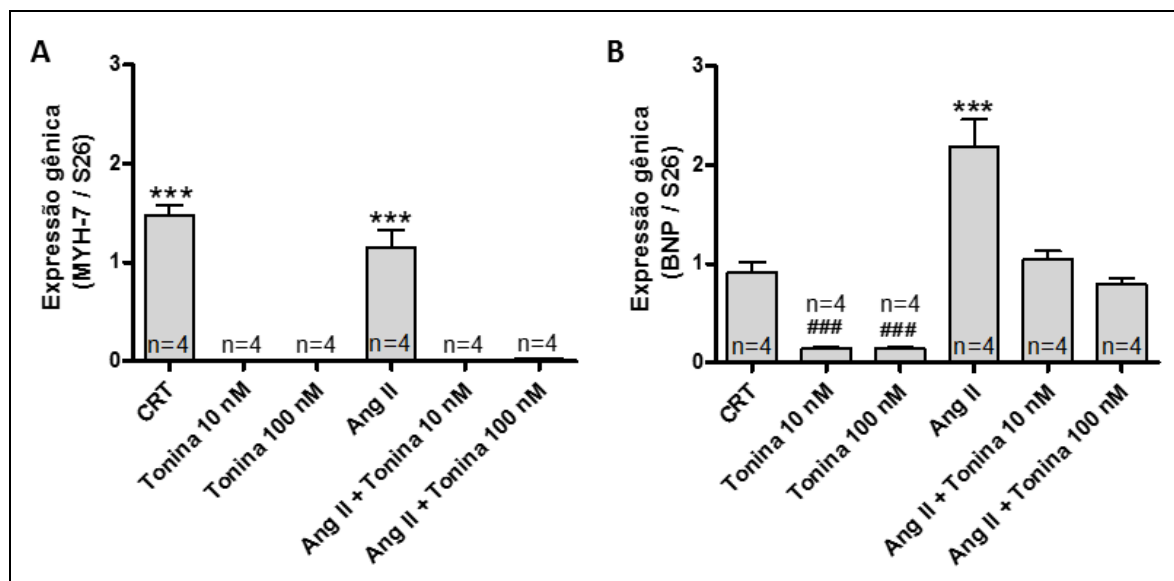
Além do GRK-5, a avaliação da expressão do MYH7, gene que codifica a cadeia pesada de miosina beta (MHC- $\beta$ ) e expressão de ANP e BNP são comumente utilizados como marcadores pró-hipertroficados, já que muitos autores associam o aumento de expressão desses genes à hipertrofia cardíaca (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990)

Assim sendo, foram avaliadas, por meio de qPCR, a expressão gênica de alguns dos marcadores de hipertrofia cardíaca nas células tratadas com tonina na menor concentração utilizada anteriormente e na concentração de 10 nM. Os genes analisados foram: MYH7, ANP, BNP, AT1, AT2 e GRK-5.

Primeiramente, foram avaliados os níveis de expressão gênica de ANP e MYH7. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos para o ANP. Os resultados obtidos para MYH7 e BNP são mostrados na Figura 12.

Os níveis de expressão do gene MYH7 se mostraram aumentados no controle e nas células tratadas com Ang II quando comparadas com as células que foram tratadas com tonina. Observa-se que a presença da tonina leva os níveis de expressão gênica próximos à zero (FIGURA 12B).

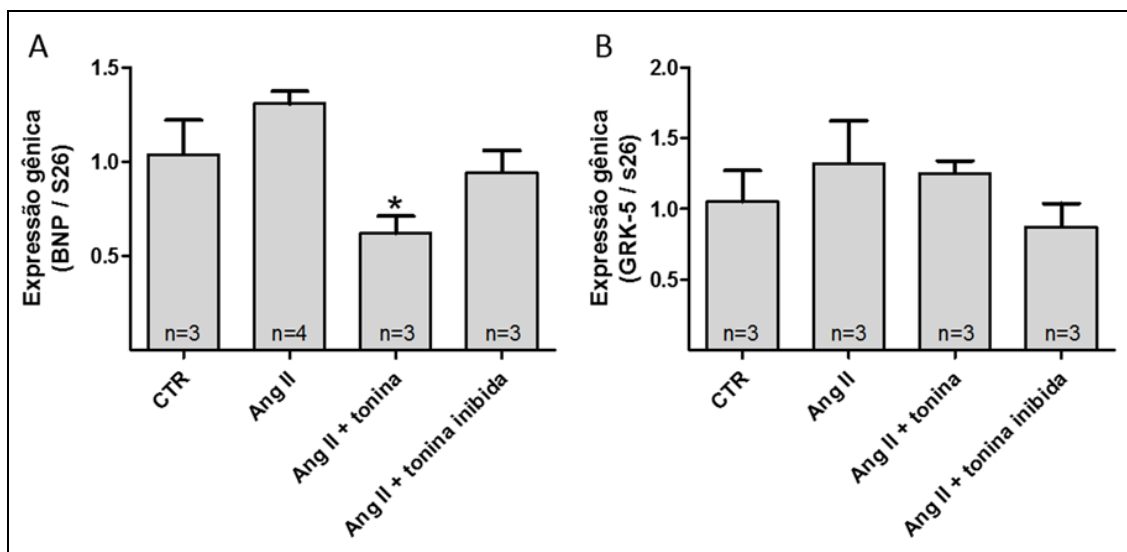
Os níveis de expressão de BNP nas células tratadas com tonina e no grupo controle foram os seguintes: CTR =  $0,91 \pm 0,22$ ; Tonina 10 nM =  $0,14 \pm 0,03$ ; Tonina 100 nM =  $0,14 \pm 0,02$ ; Ang II =  $2,19 \pm 0,54$ ; Ang II + Tonina 10 nM =  $1,05 \pm 0,16$ ; Ang II + Tonina 100 nM =  $0,79 \pm 0,12$ .



**Figura 12** - Níveis de expressão gênica do MYH7 (A) e BNP (B), determinada por qPCR. Os cardiomiócitos tratados com Ang II e tonina purificada de glândula submandibular de rato e grupo controle (sem tratamento com tonina). **A:** \*\*\* $p < 0,001$  = CTR e Ang II vs. demais grupos. **B:** \*\*\* $p < 0,001$  = Ang II vs. demais grupos; ### $p < 0,001$  = Tonina 10 nM e tonina

Os níveis de expressão de MYH7 (gene que codifica a cadeia pesada de miosina) nas células tratadas com tonina e no grupo controle foram os seguintes: CTR =  $1,48 \pm 0,2$ ; Tonina 10 nM =  $0,001 \pm 0,0003$ ; Tonina 100 nM =  $0,002 \pm 0,0002$ ; Ang II =  $1,15 \pm 0,36$ ; Ang II + Tonina 10 nM =  $0,014 \pm 0,006$ ; Ang II + Tonina 100 nM =  $0,019 \pm 0,002$ .

Os resultados da expressão de BNP foram repetidos em um novo experimento, no qual foi analisado o efeito do tratamento da tonina em comparação com o efeito da tonina inibida. A tonina foi inibida com PMSF (100  $\mu$ M), que é um inibidor irreversível conhecido das serinoproteínases. No entanto, a inibição da atividade da tonina não foi capaz de reverter o efeito da diminuição da expressão gênica do BNP nas células tratadas com tonina, em comparação com as células tratadas apenas com Ang II. Os resultados da expressão gênica nesse segundo experimento reproduzem o que se percebeu no experimento anterior (FIGURA 12A), no qual as células tratadas com Ang II apresentaram aumento na expressão gênica de BNP, entretanto, as células tratadas com Ang II + tonina não apresentaram resultados significativamente diferentes do controle. A expressão gênica de GRK-5 também foi avaliada, contudo, não observamos diferença estatística entre os grupos analisados (FIGURA 13B).



**Figura 13** - Níveis de expressão gênica do BNP (A) e GRK-5 (B) nos cardiomiócitos isolados de rato. Os cardiomiócitos tratados com Ang II e tonina purificada de glândula submandibular de rato e grupo controle (sem tratamento com tonina). **A:** \* $p < 0,05$  = Ang II + tonina (10 nM) vs. demais grupos. **B:**  $p < 0,05$ .

As médias e desvios padrão do BNP, em unidades arbitrárias, são: CTR =  $1,04 \pm 0,31$ ; Ang II =  $1,31 \pm 0,11$ ; Ang II + Tonina 10 nM =  $0,62 \pm 0,16$ ; Ang II + Tonina 10 nM inibida =  $0,94 \pm 0,2$ . \* $p < 0,05$  Ang II + Tonina 10 nM inibida vs. Ang II;

E as médias e desvios padrão do GRK-5, em unidades arbitrárias, são: CTR =  $1,53 \pm 0,37$ ; Ang II =  $1,32 \pm 0,66$ ; Ang II + Tonina 10 nM =  $1,25 \pm 0,16$ ; Ang II + Tonina 10 nM inibida =  $0,87 \pm 0,28$ .  $P < 0,05$ .

Segundo Marian e Roberts (1994), o gene da cadeia pesada de miosina (MYH7) é uma das principais causas de hipertrofia cardíaca, pois mutações neste gene são encontradas em metade dos pacientes que apresentam hipertrofia cardíaca. A cadeia pesada de miosina é a proteína predominante no VE humano, representando 95% de todas as miosinas expressas. Gerçek *et al.* (2017) também associaram o aumento da expressão de MYH7 com a hipertrofia cardíaca ao estudarem hipertrofia do cardiomiócito.

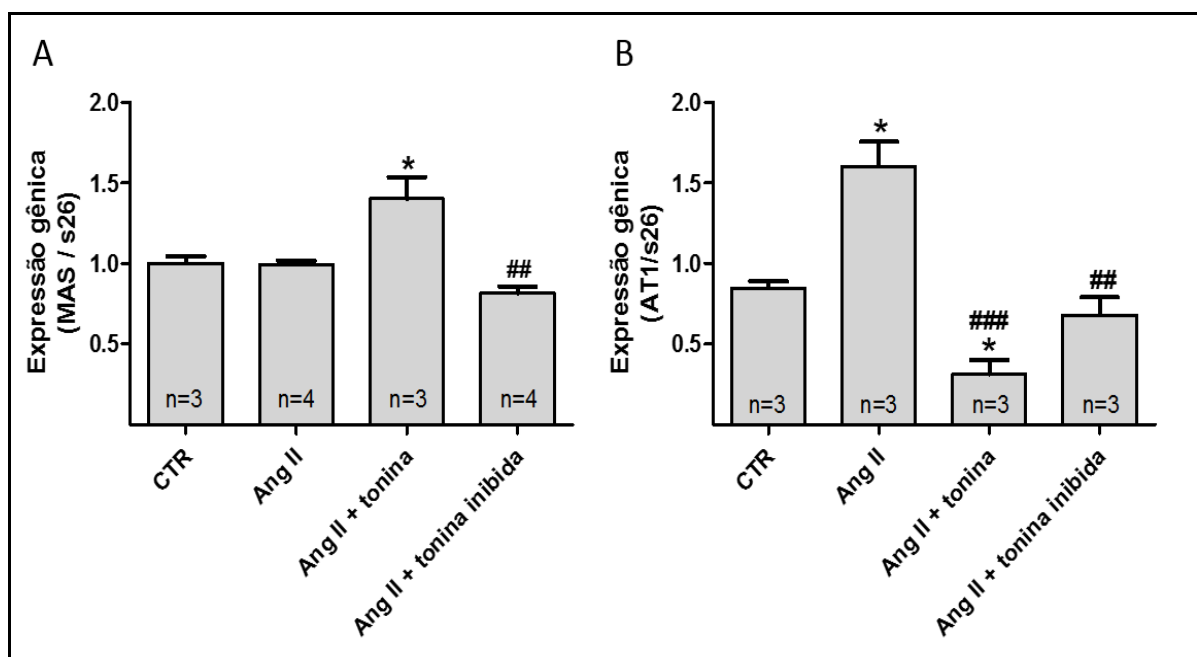
O BNP também tem sido descrito como um marcador da hipertrofia cardíaca desde o início da década de 1990. Brown *et al.* (1993) descreveram que a hipertrofia cardíaca é acompanhada por um aumento da expressão de BNP em átrio esquerdo de ratos e Nakayama *et al.* (2015) o BNP como um peptídeo pró-hipertrofico que está aumentado na hipertrofia induzida por Ang II em ratos.

É bem conhecido na literatura que o aumento da ativação do receptor AT1, via Ang II, leva a um aumento do GRK-5 para o núcleo promovendo hipertrofia cardíaca,



dentre outras patologias do sistema cardiovascular. O aumento de expressão e ativação da proteína G acoplada ao receptor quinase 2 (GRK-2) e GRK-5, que são as isoformas cardíacas, desempenha papel importante nas cascatas de sinalização que podem comprometer a função cardíaca ao regular apoptose, inflamação, hipertrofia, cardiomiopatia e o aumento da expressão e atividade de GRK-5 no rim, via aumento de ativação de receptor AT1 que está envolvido na regulação da hipertensão arterial (Dorn *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

Independente de alteração de expressão de GRK-5, o fato de ter sido constatado aumento da translocação do mesmo para os núcleos dos cardiomiócitos (FIGURA 11), induziu o interesse em avaliar os níveis de expressão gênica dos receptores AT1 e também do receptor MAS, os resultados obtidos podem ser visto nas Figura 14.

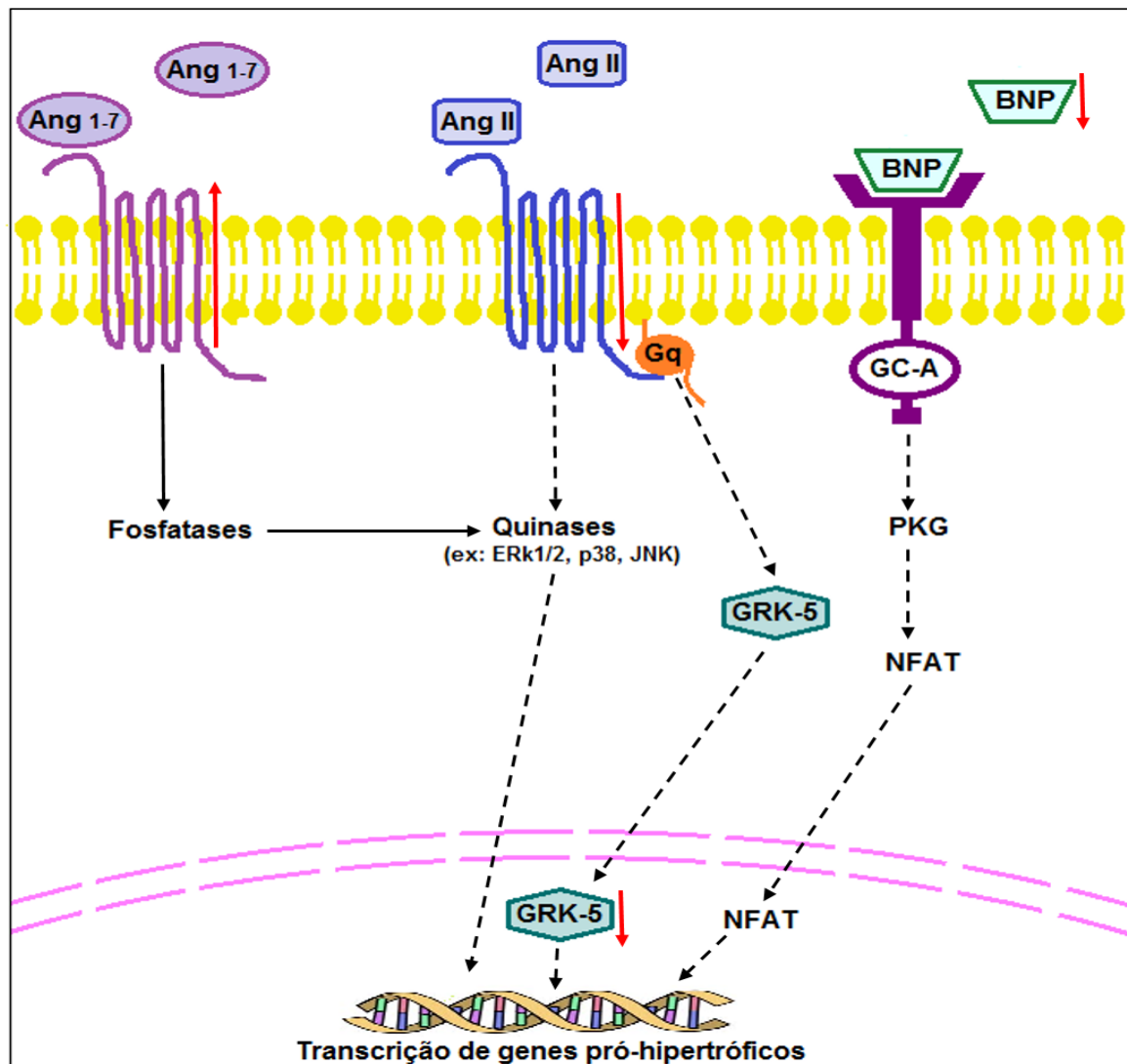


**Figura 14** - Níveis de expressão gênica dos receptores MAS (A) e AT1 (B) nas células isoladas de rato antes e após tratamento com Ang II e tonina isolada de glândula submandibular de rato. **A:** \*p < 0,05 Ang II + Tonina 10 nM vs. CTR e Ang II; ##p < 0,01 Ang II + Tonina 10 nM inibida vs. Ang II + tonina; **B:** \*p < 0,05 Ang II e Ang II + Tonina 10 nM vs. CTR; ###p < 0,001 Ang II + Tonina 10 nM vs. Ang II, ##p < 0,01 Ang II + Tonina 10 nM inibida vs. Ang II.

Os níveis de expressão dos receptores para angiotensina 1-7 (receptor MAS) dos diferentes grupos foram os seguintes: CTR = 1,03 ± 0,08; Ang II = 0,99 ± 0,03; Ang II + Tonina 10 nM = 1,40 ± 0,20; Ang II + Tonina 10 nM inibida = 0,82 ± 0,07. E os níveis de expressão do receptor AT1 foram: CTR = 1,03 ± 0,33; Ang II = 1,60 ± 0,26; Ang II + Tonina 10 nM = 0,31 ± 0,15; Ang II + Tonina 10 nM inibida = 0,68 ± 0,15.

Foi observado que nas células tratadas com Ang II + tonina não inibida há um aumento da expressão gênica do receptor MAS em comparação aos demais grupos, o que pode indicar um efeito cardioprotetor via Ang 1-7 na resistência a hipertrofia mediada por tonina. Entretanto, essa cardioproteção é revertida com a inibição da atividade da tonina por PMSF. Já na avaliação da expressão gênica do receptor AT1, percebeu-se que tanto a adição de tonina, quanto de tonina inibida por PMSF ao meio contendo Ang II são capazes de diminuir a expressão do receptor AT1 em comparação com as células que foram tratadas somente com Ang II. No entanto, a expressão gênica do receptor AT1 nas células que foram expostas a Ang II + tonina inibida não é significativamente diferente do controle. Observamos também que há uma tendência de reversão da diminuição da expressão do receptor AT1 nas células tratadas com tonina inibida em comparação com as células tratadas com tonina enzimaticamente ativa. Mas essa reversão parcial acaba não sendo significativa quando o dado é contrastado com os resultados obtidos no grupo que foi tratado somente com Ang II.

Na Figura 15 pode-se observar uma sugestão de quais vias de sinalização podem estar envolvidas na resistência a hipertrofia celular observada nos resultados. As vias de sinalização que induzem hipertrofia a partir do aumento de BNP na célula, e provavelmente induzem hipertrofia a partir da translocação de NFAT para o núcleo da célula, também podem estar diminuídas, uma vez que a expressão de BNP está diminuída na presença da tonina. A observação do aumento da estimulação dos receptores MAS pela Ang 1-7 pode estar diretamente envolvida na diminuição hipertrofia cardíaca observada em células de ratos neonatos.



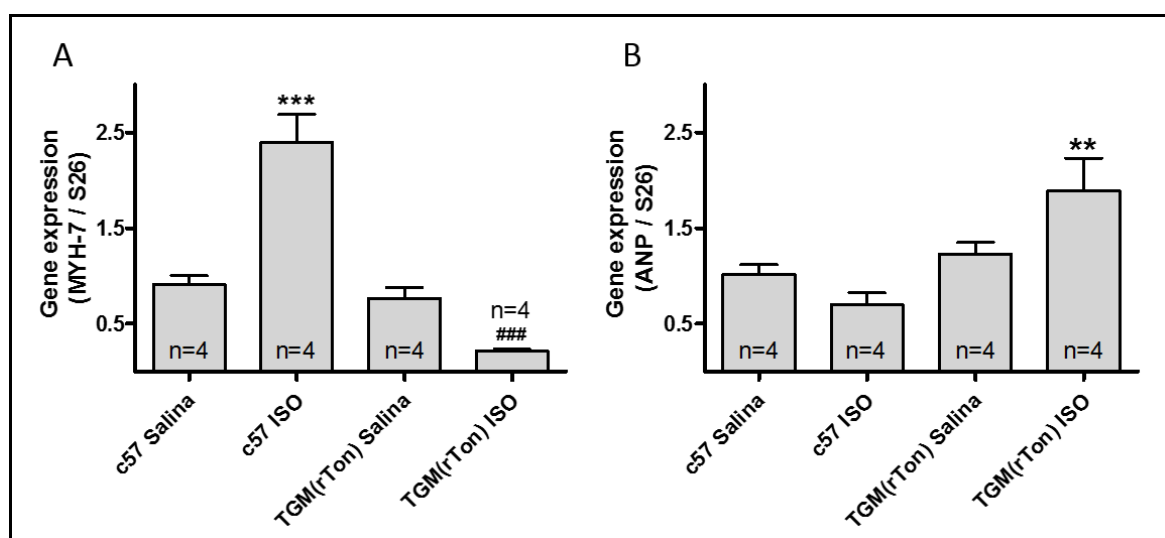
**Figura 15** - Vias de sinalização reguladas pela presença da tonina na célula.

Contudo, como citado anteriormente que o aumento da ativação do receptor AT1, via Ang II, pode levar a um aumento da translocação do GRK-5 para o núcleo da célula, promovendo hipertrofia cardíaca (Sato *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). O aumento de expressão e ativação das proteínas GRK-2 e GRK-5, que são as isoformas cardíacas, desempenha um importante papel nas cascatas de sinalização que podem comprometer a função cardíaca ao regular apoptose, inflamação, hipertrofia cardíaca e cardiomiopatias (Patil *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2016).

A partir dos resultados obtidos com cardiomiócitos isolados, pode-se concluir parcialmente que, a tonina, e não a modificação genética feita nos animais TGM(rTon), é responsável pela resistência a hipertrofia cardíaca observada.

## 8. Expressão Gênica nos Animais TGM(rTon)

A partir das informações obtidas nos experimentos com cardiomiócitos isolados de rato, foram realizados experimentos de qPCR a fim de verificar como estariam os níveis de expressão dos genes ANP, MYH7 e receptor AT1 no coração dos animais TGM(rTon). A Figura 16 mostra os resultados obtidos para os genes MYH7 e ANP. Pode-se observar, pela Figura 16A, aumento nos níveis de expressão gênica de MYH7 nos animais que foram tratados com ISO em comparação com o controle. Entretanto, para os animais TGM(rTon) tratados com ISO, nota-se uma diminuição do MYH7 em comparação com seu controle. Na Figura 16B observa-se que apenas no grupo dos animais TGM(rTon) tratados com ISO há um aumento dos níveis de ANP, em comparação com o controle e os outros grupos experimentais.



**Figura 16** - Expressão gênica de MYH7 (A) e ANP (B) no coração dos animais TGM(rTon) e dos camundongos C57. **A:** \*\*\* $p < 0,001$  C57 ISO vs. demais grupos. ### $p < 0,001$  TGM(rTon) ISO vs. demais grupos. **B:** \*\* $p < 0,01$  TGM(rTon) ISO vs. demais grupos.

As médias e desvios padrão da expressão gênica de MYH7, em unidades arbitrárias, são: C57 salina =  $0,91 \pm 0,19$ ; C57 ISO =  $2,40 \pm 0,58$ ; TGM(rTon) salina =  $0,77 \pm 0,22$ ; TGM(rTon) ISO =  $0,22 \pm 0,03$ . As médias e desvios padrão da expressão gênica do ANP são: C57 salina =  $1,02 \pm 0,22$ ; C57 ISO =  $0,70 \pm 0,22$ ; TGM(rTon) salina =  $1,23 \pm 0,21$ ; TGM(rTon) ISO =  $1,89 \pm 0,59$ .

Conforme discutido anteriormente, o aumento da expressão de MYH7 é considerado um fator pró-hipertrofico (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990; Marian e Roberts 1994;

Richard *et al.*, 1999; Gerçek *et al.*, 2017). Contudo, o papel do ANP é controverso, pois alguns autores o consideram marcador hipertrófico, sem discutir sua função, e outros consideram esse peptídeo anti-hipertrófico (Calderone *et al.*, 1999; Calderone *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001. Nishikimi *et al.*, 2006). Porém, os resultados mostrados na Figura 16B endossam a tese de que o ANP seria cardioprotetor, uma vez que a expressão de ANP está aumentada nos animais TGM(rTon) tratados com ISO, sendo justamente esse grupo experimental que se mostrou resistente a hipertrofia cardíaca induzida por ISO.

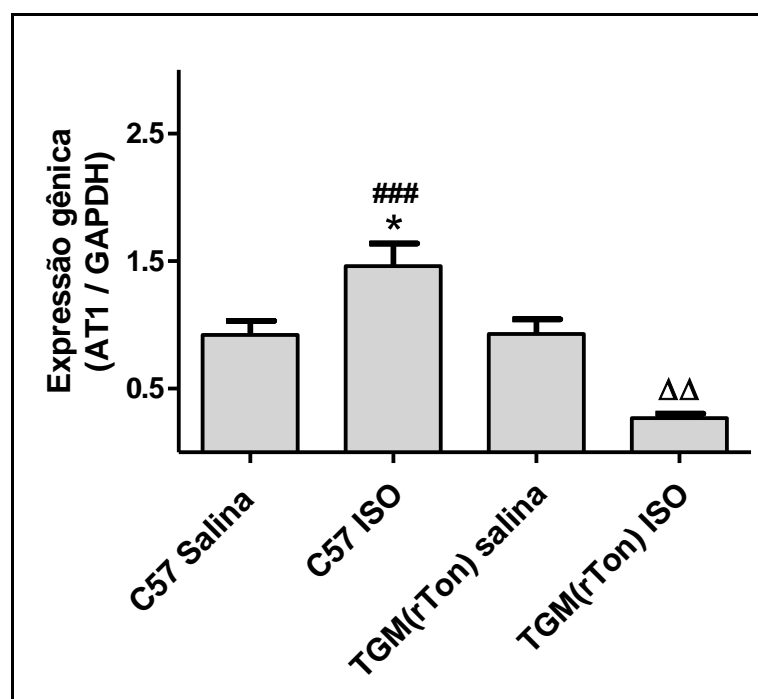
Alguns estudos corroboram a nossa hipótese de que o ANP pode ser anti-hipertrófico. Oliver *et al.* (1997), por exemplo, mostraram que a deficiência do receptor para ANP em camundongos levou a hipertrofia cardíaca, sugerindo que o ANP endógeno pode ter papel inibitório na regulação do crescimento de células cardíacas. Calderone *et al.* (1998) investigaram o efeito do ANP administrado exogenamente em culturas de cardiomiócitos isolados, após indução de hipertrofia com NE e concluíram que o ANP pode agir atenuando os efeitos da NE sobre o crescimento dos miócitos cardíacos. Segundo estes autores, a inibição da hipertrofia celular aconteceu por meio da inibição do influxo de cálcio estimulada pela NE mediado pelo cGMP.

Horio *et al.* (2000) investigaram os efeitos de um antagonista específico dos receptores peptídicos natriuréticos, o HS-142-1, na expressão de genes de proteínas contráteis do tipo fetal, bem como a síntese protéica em cultura de miócitos cardíacos. Os autores constataram que o HS-142-1 aumenta a síntese de proteínas basais e estimuladas por fenilefrina, de forma concentração dependente. Este antagonista também induziu um aumento significativo no tamanho dos miócitos e, além disso, aumentou os níveis de expressão dos genes que codificam a actina esquelética, a MHC- $\beta$  e o ANP (Horio *et al.*, 2000). Assim sendo, a diminuição do ANP observada na Figura 16B corrobora com a literatura, no sentido de que esse aumento do ANP pode estar relacionado a cardioproteção conferida pela tonina.

Em seguida foi avaliada também a expressão gênica do receptor AT1 no coração dos camundongos transgênicos e dos controles (FIGURA 17).

As médias e desvios padrão da expressão de AT1, em unidades arbitrárias, são: c57 salina =  $0,92 \pm 0,22$ ; c57 ISO =  $1,46 \pm 0,31$ ; TGM(rTon) salina =  $0,92 \pm 0,23$ ; TGM(rTon) ISO =  $0,27 \pm 0,06$ .

Quanto a expressão do receptor AT1 no TGM(rTon), a literatura não traz ainda informações, apesar de muito ter sido estudado sobre o sistema tonina-angiotensina. Em 1980, Kondo *et al.* determinaram que a administração intracerebroventricular de tonina aumentava a pressão arterial (PA) e a ingestão de água em ratos, efeito este que era abolido por antagonistas da Ang II.



**Figura 17** - Níveis de expressão gênica do receptor AT1 no coração dos animais TGM(rTon) e dos camundongos C57. \* $p < 0,05$  C57 ISO vs. C57 salina e TGM(rTon) salina; ### $p < 0,001$  C57 ISO vs. TGM(rTon) ISO; ΔΔ $p < 0,01$  TGM(rTon) ISO vs. TGM(rTon) salina.

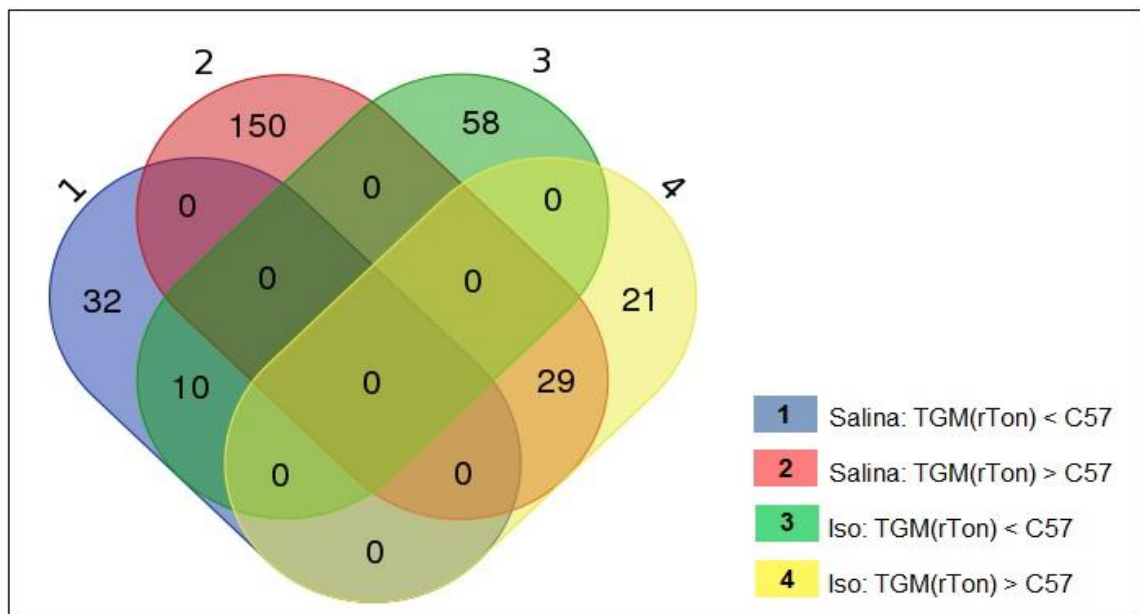
Vários estudos mostraram que a administração de tonina (por microinjeção central ou administração intravenosa) era capaz de promover o aumento da PA e da frequência cardíaca, efeito este que poderia ser abolido pela administração de antagonistas do receptor AT1 (Schiffirin *et al.*, 1981a, 1981b, Araújo *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 2010). Foi verificado, também, que os níveis de Ang II estão aumentados nos camundongos transgênicos em comparação com os controles. Contudo, Cardoso *et al.* (2010) concluíram que a tonina pode representar uma via alternativa para gerar Ang II, o que poderia produzir diversos efeitos sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, os autores sugeriram que os receptores AT1 seriam menos sensíveis nos TGM(rTon).

A diminuição da expressão dos receptores AT1, tanto nas células de rato tratadas com tonina (FIGURA 14B), quanto nos animais TGM(rTon) tratados com ISO,

corroboram, em parte, a sugestão de Cardoso *et al.* (2010), pois na verdade ocorre uma diminuição da expressão dos receptores AT1 e não, necessariamente, uma insensibilidade dos mesmos.

## 9. Transcriptoma

A partir das informações obtidas, foi realizado um sequenciamento dos mRNAs, por meio da técnica de RNA-seq, nos animais utilizados nos experimentos de indução de hipertrofia com isoproterenol. Os resultados de sequenciamento foram alinhados contra o genoma de camundongo e as amostras apresentaram uma média de 90% de mapeamento. As *reads* mapeadas apresentaram 300 genes diferencialmente expressos quando avaliadas nos animais TGM(rTon) comparados com o c57 (FIGURA 18 e TABELA 2). Os dados foram obtidos utilizando as informações no banco de dados da plataforma *Enrich 5*.



**Figura 18** - Diagrama de Venn da expressão gênica.

Nas comparações entre os animais TGM(rTon) e c57 observa-se que poucos genes são diferencialmente expressos de forma compartilhada (ver tabulação do diagrama de Venn na tabela 2).

A distribuição numérica dos genes diferencialmente expressos após tratamento com salina ou isoproterenol pode ser observada na tabulação do diagrama de Venn (TABELA 2) e a descrição desses genes pode ser observada na Tabela 3.

**Tabela 2** - Tabulação do diagrama de Venn

Grupo Analisado	Nº de genes diferencialmente expressos	Nº de genes diferencialmente expressos em um único grupo
Grupo 1 = azul	42	32
Grupo 2 = rosa	179	150
Grupo 3 = verde	68	58
Grupo 4 = amarelo	50	21
Interseção 1:3		10
Interseção 2:4		29
Número total de genes		300

Observa-se que entre os grupos tratados com salina existem 42 genes que são menos expressos nos animais TGM(rTon) em relação aos c57 (Grupo 1, azul), enquanto 179 genes são mais expressos nos TGM(rTon) (Grupo 2, rosa). Na comparação dos animais tratados com isoproterenol temos que 68 genes são menos expressos nos TGM(rTon) (Grupo 3, verde) e 50 genes menos expressos nesses animais (Grupo 4, amarelo), em comparação com os camundongos c57. Nas áreas de interseção existem 10 genes que são menos expressos nos animais TGM(rTon) independentemente do tratamento com isoproterenol (interseção 1:3) e 29 genes que são mais expressos nos TGM(rTon) independentemente do tratamento com isoproterenol (interseção 2:4).

**Tabela 3** - Descrição dos genes diferencialmente expressos nas quatro comparações entre TGM(rTon) e c57 e nas áreas de interseção observadas no diagrama de Venn

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	Interseção 1:3	Interseção 2:4
1	PTPRN2	EPHA8	PTPRN2	GBP6	GM7609	F830016B08 RIK



2	SNORA52	CD74	SERPINA3H	HMGCS2	FMN1	ADGRB2
3	ZFP975	GBP8	SERPINA3I	9430037G07 RIK	SERPINA3H	MTM1
4	LUM	GM11127	MMP12	F830016B08 RIK	PTPRN2	CADPS2
5	AI464131	TAP1	CRLF1	MIR149	FAM107A	CACNA1H
6	EMP1	TBR1	ACTA1	B230208H11 RIK	ACTA1	GM6034
7	SERPINA3H	H2-AA	CLEC4D	SCGB1A1	IFI202B	BPIFA1
8	HDHD3	F830016B08 RIK	COL5A2	KCNS3	SERPINA3I	SCGB1A1
9	SERPINA3I	RUNX3	P4HA3	GM6416	A530032D15 RIK	RTP2
10	MIR1839	HIST1H4A	CILP	SCGB3A2	BAIAP2L1	GALR3
11	IFI202B	HIST1H4B	2200002D01 RIK	IGTP		MROH6
12	ACTA2	SCGB1A1	ADAM8	GM4951		FOXE1
13	ACTA1	SPINT1	MYL9	OLFR1033		GBP11
14	GM7609	IFI27	COL12A1	REG3G		IGTP
15	1810022K09 RIK	MTCP1	SERPINE1	UCP1		CILP2
16	PAH	HIST1H4I	TNC	FOXO6		CYP2F2
17	HSPA1A	MIR6236	IQGAP3	MTM1		NNAT
18	TROAP	HIST1H4J	CTGF	MROH6		ART4
19	TAGLN3	IGTP	SERPINA1B	NNAT		REG3G
20	MET	HIST1H4K	BAIAP2L1	CADPS2		SCGB3A2
21	GM20594	HNRNPD	SERPINA1C	LGI2		MIR1961
22	GM11627	CDK14	ADAMTS16	4933409K07 RIK		CYP2A5
23	MIR684-1	ACOT5	MEOX1	IIGP1		KCNS3
24	SPRN	MIR30B	TUBB3	ZFP654		ZFP654
25	HSPA1B	H2-BL	SERPINA1A	WTAP		OLFR1033
26	SMIM3	OLFR1033	CD300LB	E330017L17 RIK		ARNTL2
27	RTN4R	GM10046	SPP1	IRGM2		WTAP
28	FAM107A	LRP2	MROH7	GBP11		GM4841
29	LRRC4	NXPH4	GPR39	CYP2A5		MIR6538

30	FMN1	H2-K1	PIANP	GBP10		
31	AF357426	SLC5A1	POSTN	MIR1961		
32	GRIK3	MRM1	GM38423	PPP1R1B		
33	GM14440	HOTAIRM1	TDRD9	ADGRB2		
34	CIART	LSM11	PRC1	MIR6538		
35	MIR568	PLAC9A	IFI202B	D830026I12 RIK		
36	MFSD4A	NNAT	MAP1A	C130080G10 RIK		
37	BAIAP2L1	ZDBF2	GM7609	GM6034		
38	FGF7	PLAC9B	LOX	PTGFR		
39	SLC25A29	MYC	ANGPTL7	RTP2		
40	A530032D15 RIK	UCP3	STAR	FOXE1		
41	MEST	MIR5132	COL8A2	ART4		
42	PACSIN1	SEMA6C	ATP6V0D2	CACNA1H		
43		CADPS2	SPRR1A	ARNTL2		
44		IGFBP2	GCHFR	9330175E14 RIK		
45		H2-D1	CEMIP	BPIFA1		
46		POU3F1	GM11237	RPRL3		
47		H2-EB1	FAM107A	GALR3		
48		CMC4	FMN1	CILP2		
49		FIBCD1	ENO2	GM4841		
50		EVX2	WISP1	CYP2F2		
51		MIR22	LTBP2			
52		OVOL2	METTTL11B			
53		BPIFB1	THBS4			
54		CCDC88B	SERPINB1A			
55		EFNA3	XLR4A			
56		STAG3	C1QTNF3			
57		MIR1961	LGALS3			
58		CYP2A5	CNN1			
59		MIR320	SERPINA3F			
60		MIR3107	NMRK2			
61		MIR5126	NPPB			
62		VSX2	GPNMB			
63		H2-AB1	A530032D15			

			RIK			
64		H2-Q10	HMOX1			
65		SPON2	GM11239			
66		DOC2B	PIEZO2			
67		FOXO1	COL11A1			
68		MIR30C-1	PCBD1			
69		H2-L				
70		LIN7B				
71		SNORD1A				
72		CYP46A1				
73		SOX21				
74		FGF2				
75		ART4				
76		CACNA1H				
77		C1QTNF4				
78		SOX1				
79		BPIFA1				
80		GALR3				
81		BLOC1S4				
82		PDK4				
83		PIM1				
84		GM4841				
85		AMZ1				
86		MIR7654				
87		TRIM67				
88		KL				
89		SNORD88A				
90		MIR133A-2				
91		4933407K13 RIK				
92		GM7030				
93		DUSP2				
94		MIR125B-1				
95		ABCC6				
96		MIR133A-1				
97		PAX7				
98		MT2				
99		GM12250				

100		H2-T-PS				
101		TTC9B				
102		MIR345				
103		RNF149				
104		KCNS2				
105		MIR5107				
106		KCNS3				
107		SCGB3A1				
108		ESRP1				
109		BCL3				
110		SCGB3A2				
111		DOCK3				
112		MIR5100				
113		MIR7005				
114		TRMT61B				
115		CD22				
116		ANKRD60				
117		REG3G				
118		FAM43A				
119		OAS1B				
120		NLRC5				
121		MTM1				
122		MIR378A				
123		SEC14L3				
124		GM8909				
125		MROH6				
126		EMILIN2				
127		PCK1				
128		CIITA				
129		TEAD3				
130		HIST1H1C				
131		HIST1H1D				
132		HGFAC				
133		GM15663				
134		ZFP654				
135		WTAP				
136		MUC5B				

137		MIR99A				
138		RNF26				
139		SUSD3				
140		KCTD1				
141		LMTK3				
142		ATRN				
143		GBP11				
144		ADGRB2				
145		MIR6538				
146		ANGPTL4				
147		LTB				
148		F2RL1				
149		KCNQ5				
150		ZFP131				
151		SFTPA1				
152		SNORD66				
153		LTF				
154		TAF4				
155		CTXN1				
156		GM6034				
157		FOXA1				
158		APOL9B				
159		APOL9A				
160		MIR7051				
161		H2-Q9				
162		RTP2				
163		PIGR				
164		H2-Q7				
165		H2-Q8				
166		H2-Q5				
167		H2-Q6				
168		H2-Q1				
169		SCARNA17				
170		SNORD15A				
171		ARNTL2				
172		SLC25A28				
173		SERP2				

174		SCML2				
175		DCDC2B				
176		CILP2				
177		SCD3				
178		NEFH				
179		CYP2F2				

As descrições das siglas que representam os genes descritos na Tabela 3 constam no Anexo. A partir da obtenção da lista de genes diferencialmente expressos entre os grupos trabalhados, os dados obtidos foram cruzados, na plataforma *Enrich*, utilizando como referência a expressão gênica dos animais TGM(rTon) comparada aos C57, contra a expressão gênica encontrada no banco de dados, dos trabalhos publicados com tecidos e/ou animais controles comparados com tecidos e/ou animais doentes.

Nas Tabelas 4 e 5 foram analisadas quais doenças descritas na literatura eram compatíveis com a diferença de expressão gênica observada nos animais C57 comparados com os TGM(rTon). As doenças foram ranqueadas de 1 a 100 levando em consideração dois fatores: valor de p (já ajustado pelo desvio padrão) e a porcentagem de dados na literatura que coincidem com a diferença de expressão gênica encontrada.

Na tabela 4 observa-se a comparação entre os animais C57 tratados com ISO, em comparação com os TGM(rTon) também tratados. As doenças listadas estão relacionadas aos camundongos C57 em comparação com os TGM(rTon), que apresentam menor expressão dos genes relacionados as mesmas. Foram demonstradas as doenças ranqueadas de 1 a 10 e após as 10 primeiras, apenas as doenças relacionadas a desordens cardiovasculares foram exemplificadas, respeitando a sua posição no ranking.

**Tabela 4** - Doenças compatíveis com a diferença de expressão gênica observada nos animais C57 comparados com os TGM(rTon) tratados com ISO

Ranking	Nome da doença / desordem	Valor de p
1	Hipertrofia Cardíaca (Ref. C1383860 / camundongo GSE5500)	6,23E-11

<b>2</b>	Adenocarcinoma de ducto pancreático (Ref. DOID-3498 / humano GSE15471)	6,23E-11
<b>3</b>	Miocardite aguda (Ref. DOID-3951 / camundongo GSE35182)	7,20E-05
<b>4</b>	Epilepsia progressiva mioclônica (Ref. DOID-891 / camundongo GSE47516)	1,14E-05
<b>5</b>	Doença cardíaca congestiva (Ref. C0018802 / camundongo GSE2236)	1,96E-05
<b>6</b>	Psoríase (Ref. DOID-8893 / camundongo GSE27628)	1,77E-05
<b>7</b>	Adenocarcinoma de ducto pancreático (Ref. DOID-3498 / camundongo GSE61412)	5,13E-05
<b>8</b>	Câncer do colo do intestino (Ref. DOID-219 / camundongo GSE63032)	2,83E-04
<b>9</b>	Cardiomiopatia dilatada (Ref. C0007193 / humano GSE3585)	8,92E-05
<b>10</b>	Displasia bronco-pulmonar (Ref. UMLS CUI-C0006287 / humano GSE8586)	0.09344
<b>13</b>	Infarto agudo do miocárdio (Ref. DOID-9408 / camundongo GSE775)	3,28E-04
<b>23</b>	Miocardite aguda (Ref. DOID-3951 / camundongo GSE35182)	0.00003018
<b>30</b>	Infarto do miocárdio (Ref. C0027051 / rato GSE4105)	0.00004597
<b>35</b>	Diabetes mellitus TIPO 2 (Ref. C0011860 / camundongo GSE2899)	0.0001252
<b>47</b>	Infarto agudo do miocárdio (Ref. DOID-9408 / camundongo GSE775)	0.0003759
<b>50</b>	Taquicardia (Ref. C0039231 / rato GSE7999)	0.0006839
<b>61</b>	Cardiomiopatia dilatada (Ref. DOID-12930 / humano GSE42955)	0.0007585

<b>86</b>	Falência cardíaca (Ref. C0018801 / camundongo GSE1988)	0.002823
<b>88</b>	Hipertrofia cardíaca (C1383860 / camundongo GSE1621)	0.003377
<b>89</b>	Cardiomiopatia (Ref. C0878544 / humano GSE5406)	0.003592
<b>93</b>	Infarto agudo do miocárdio (Ref. DOID-9408 camundongo GSE775)	0.004857
<b>94</b>	Infarto agudo do miocárdio (Ref. DOID-9408 camundongo GSE775)	0.004585
<b>97</b>	Hipertrofia ventricular (Ref. C0340279 camundongo GSE4678)	0.005355

Na tabela 5 está mostrada a comparação entre as doenças relacionadas a diferença de expressão gênica observada nos animais C57 tratados com salina comparados com os TGM(rTon) que também receberam apenas veículo. Os resultados estão demonstrados da mesma forma que na Tabela 4, entretanto, observamos que o valor de p nessa segunda comparação não se mostra significativo para a maioria das doenças.

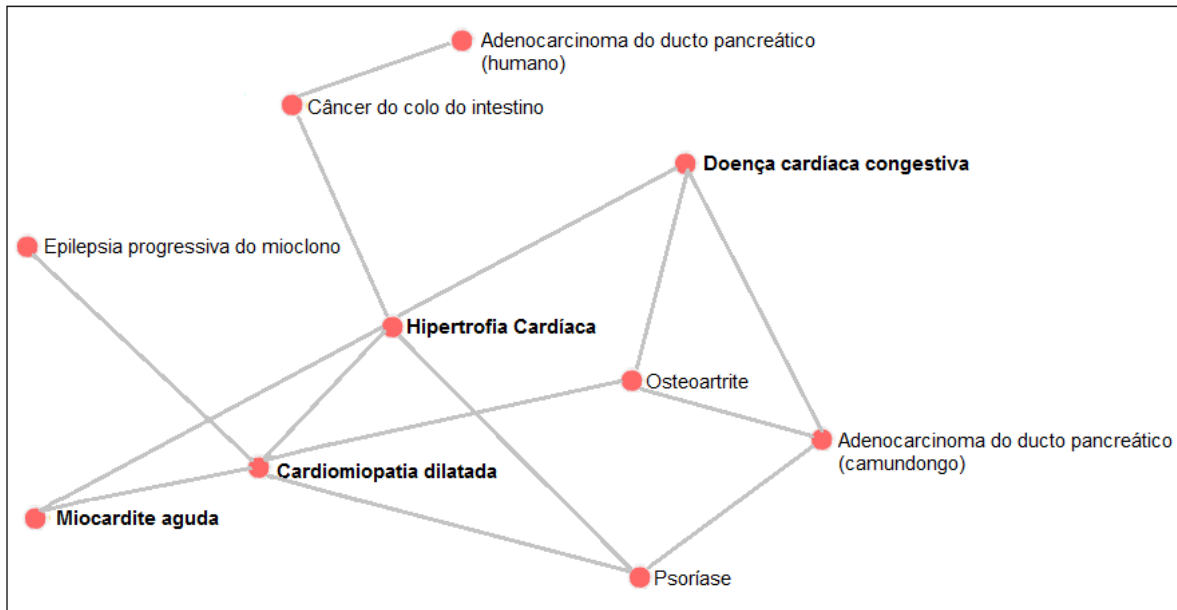
**Tabela 5** - Doenças compatíveis com as diferenças de expressão gênica observadas nos animais C57 comparados com os TGM(rTon) tratados com salina

<b>Ranking</b>	<b>Nome da doença / desordem</b>	<b>Valor de P</b>
<b>1</b>	Epilepsia progressiva mioclônica (Ref. DOID-891 / camundongo GSE47516)	0.070
<b>2</b>	Fibrose pulmonar (Ref. DOID-3770 / camundongo GSE43695)	0.005
<b>3</b>	Infarto agudo do miocárdio (Ref. DOID-9408 / camundongo GSE775)	0.070
<b>4</b>	Distrofia miotônica tipo 1 (Ref. DOID-11722 / humano GSE7178)	0.070



5	Mesotelioma maligno da pleura (Ref. C0812413 / humano GSE2549)	0.093
6	Obesidade (Ref. DOID-9970 / camundongo GSE55389)	0.093
7	Transtorno bipolar (Ref. C0005586 / humano GSE5389)	0.092
8	Miopatia da nemalina (Ref. DOID-3191 / camundongo GSE3384)	0.093
9	Osteoartrite (Ref. DOID-8398 / humano GSE16464)	0.093
10	Displasia bronco-pulmonar (Ref. UMLS CUI-C0006287 / humano GSE8586)	0.093
11	Hipertrofia cardíaca (Ref. C1383860 / camundongo GSE5500)	0.120
15	Hipertrofia do ventrículo esquerdo (Ref. C0149721 / rato GSE2116)	0.093
16	Hipertensão essencial (Ref. C0085580 / rato GSE1675)	0.093
19	Obesidade (Ref. C0028754 / rato GSE1813)	0.093
21	Cardiomiopatia dilatada (Ref. DOID-12930 / humano GSE42955)	0.093

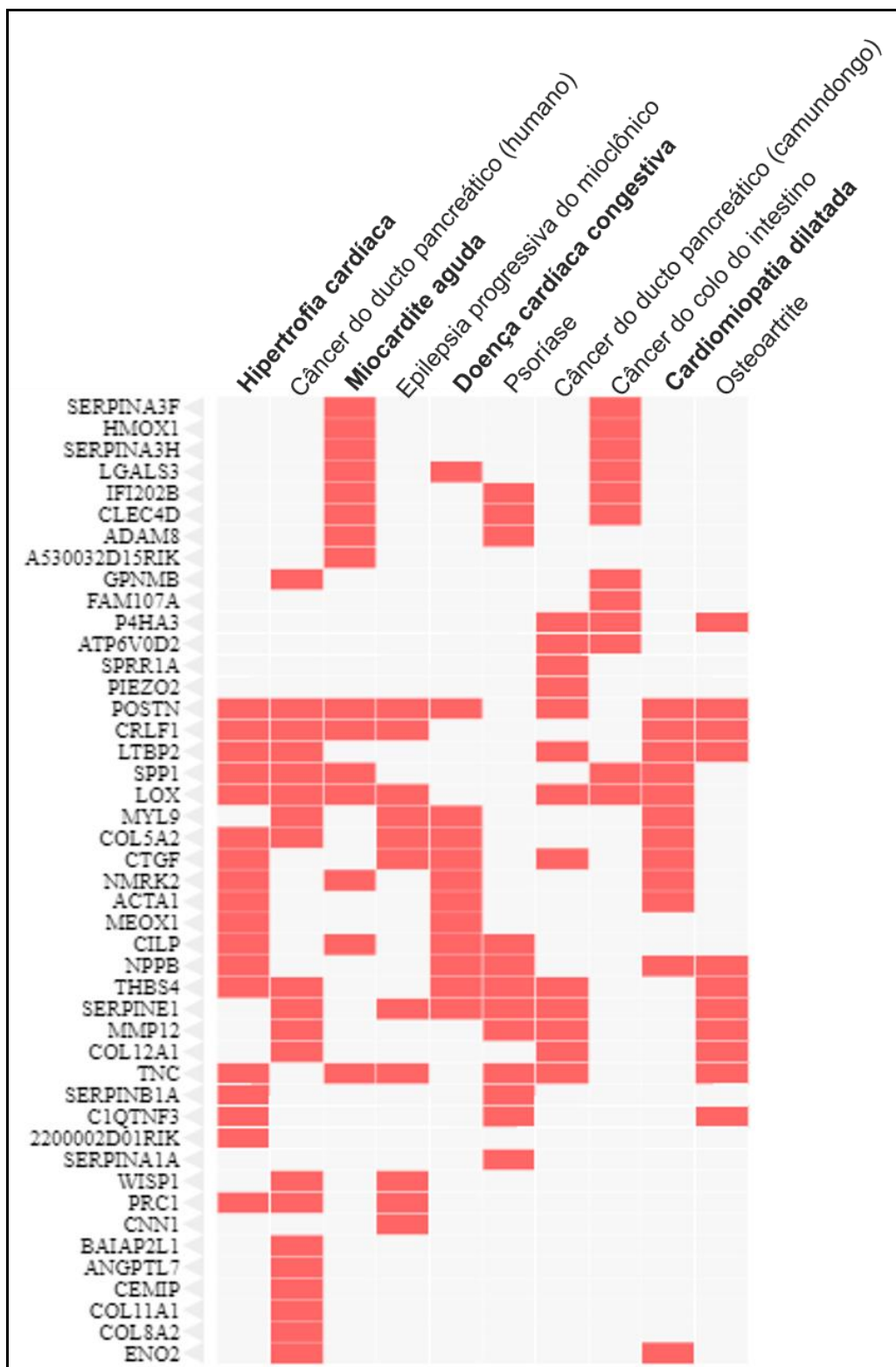
O resultado do cruzamento mostra que existe uma rede de interação entre a expressão gênica nas 10 principais doenças associadas ao tratamento de isoproterenol nos camundongos c57, em comparação com os TGM(rTon) tratados com ISO (FIGURA 19).



**Figura 19** - Rede de interação entre as 10 principais doenças associadas ao transcriptoma encontrado.

Na Tabela 6, observa-se a descrição dos genes que se mostraram diferencialmente expressos para cada uma das 10 patologias mostradas na rede de interação da figura 19.

**Tabela 6** - Ranking das 10 principais patologias associadas ao transcriptoma encontrado x principais genes diferencialmente expressos



A Tabela 6 mostra as principais doenças associadas ao tratamento com isoproterenol e os genes, associados a essas patologias, que são mais expressos nos animais C57 tratados, em comparação com os TGM(rTon) também tratados com ISO.

Dos genes diferencialmente expressos, que se mostraram negativamente regulados nos animais TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com o grupo C57, também tratado com ISO, temos 18 genes que estão diretamente ligados a hipertrofia cardíaca, conforme mostrado na primeira coluna da Tabela 6, a saber: POSTN, CRLF1, LTBP2, SSP1, LOX, COL5A2, CTGF, NMRK2, ACTA1, MEOX1, CILP, NPPB (ou BNP), THBS-4, TNC, SERPINB1A, C1QTNF3, 2200002DOIRICK e PRC1.

A literatura traz diversos artigos publicados sobre a influência da diminuição da expressão desses genes na prevenção da hipertrofia cardíaca, ou sobre a relação do aumento da expressão dos mesmos no processo hipertrófico.

POSTN é o gene que codifica a periostina, que foi inicialmente identificada como uma proteína secretada por osteoblastos e que pode desempenhar diferentes papéis, em uma ampla variedade de condições fisiopatológicas, incluindo neoplasia, reparação tecidual e lesão cardíaca (Hamilton, 2008; Norris *et al.*, 2008). O aumento da expressão da periostina no miocárdio está relacionado com hipertrofia cardíaca, fibrose e cardiomiopatia dilatada induzida por sobrecarga de volume (Wang *et al.*, 2003; Stansfield *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). Por outro lado, a hipertrofia fisiológica em camundongos, induzida por exercício físico extenuante, não aumenta a expressão da periostina do miocárdio (Oka *et al.*, 2007).

E, segundo Oka *et al.* (2007), camundongos que superexpressam periostina apresentam hipertrofia cardíaca acentuada após indução por sobrecarga de pressão. Em adição a esses estudos, Katisuragi *et al.* (2004) publicaram que, em ratos transfectados com o gene da periostina, houve redução do número de cardiomiócitos, disfunção cardíaca, cardiomiopatia dilatada e fibrose.

Os achados na literatura evidenciam que, a regulação positiva da expressão da periostina está diretamente relacionada com o desenvolvimento de fibrose e cardiomiopatias, incluindo a hipertrofia cardíaca. O que nos leva a considerar que a diminuição da expressão do POSTN nos animais TGM(rTon), tratados com ISO, tem papel importante na resistência a hipertrofia cardíaca induzida por ISO nesses animais, em comparação com seus controles.

O CRLF1 é descrito na literatura como o gene que codifica o receptor para citocina tipo 1. Esse receptor está relacionado com a fibrose tecidual e destruição de cartilagem (Bateman *et al.*, 2013). Entretanto, não foram encontrados na literatura,

artigos que relacionassem essa proteína a hipertrofia cardíaca ou cardiomiopatias. Contudo, como a fibrose é uma das etapas do remodelamento cardíaco, que ocorre no processo de hipertrofia cardíaca, a regulação negativa da expressão de CRLF1 nos animais TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 tratados com ISO, pode indicar cardioproteção.

O gene LTBP2 codifica o fator de crescimento e transformação ligado a proteína beta 2, que é um fator específico de fibroblastos e está no aumento da ativação das vias de sinalização que tem participação do fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) induzindo hipertrofia cardíaca (Shiple *et al.*, 2000; Maass *et al.*, 2010). Hellman *et al.* (2010) demonstraram que LTBP2 e TGF- $\beta$ 2 estão associados ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, pois o LTBP2 regula a liberação de TGF- $\beta$ 1 estimulando a proliferação de cardiomiócitos (Sinha *et al.*, 2002). Como a regulação positiva da via do TGF- $\beta$  aumenta a ativação de Ras/Rho, podemos inferir que a diminuição do LTBP2 pode atuar diminuindo a ativação dessa via.

O gene SPP1 codifica a osteopontina, que é uma proteína envolvida no processo de fibrose induzida por Ang II. Além disso, a osteopontina pode interagir com as matrizes extracelulares, incluindo fibronectina e colágeno, atuando na organização e estabilidade da matriz (Ashizawa *et al.*, 1996; Kaartinen *et al.*, 1999). Segundo Singh *et al.* (1999) o aumento da expressão de osteopontina no coração está associado ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Além disso, a deficiência de osteopontina causou dilatação do VE e redução da deposição de colágeno em ratos transgênicos (com deleção do gene SPP1), em comparação com os controles (selvagens). Estes resultados sugerem que o OPN tem um papel fundamental na fibrose cardíaca e no remodelamento cardíaco (Trueblood *et al.*, 2001)

Outro dado interessante, que pode ser encontrado na literatura, é que a osteopontina pode mediar a inflamação vascular, como parte do mecanismo pelo qual o sistema renina-angiotensina-aldosterona participa do desenvolvimento de fibrose cardíaca e inflamação (Valiente *et al.*, 2016; Trueblood *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007). Sendo assim, a diminuição da expressão de SPP1 nos animais TGM(rTon) tratados com ISO também pode contribuir para a resistência a hipertrofia observada, uma vez que a fibrose e a inflamação constituem etapas importantes no processo hipertrófico.

Outro gene negativamente regulado nos TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 que receberam o mesmo tratamento é o LOX. Este gene codifica a lisil oxidase, uma enzima que também está envolvida no processo de fibrose, isquemia e remodelamento cardíaco (Rodríguez *et al.* 2008)

Em um modelo em que ratos superexpressam o gene LOX humano, Galán *et al.* (2017) demonstraram que o aumento da expressão LOX promoveu hipertrofia concêntrica do VE, além de agravar a hipertrofia cardíaca induzida por Ang II. Os autores ainda demonstraram que a regulação positiva do gene LOX foi responsável por uma maior resposta fibrótica, que foi caracterizada por deposição de colágeno no tecido cardíaco dos ratos que superexpressavam LOX. Além disso, os animais transgênicos apresentavam maior quantidade de infiltrado inflamatório no miocárdico, após administração Ang II (Galán *et al.*, 2017).

Galán *et al.* (2017) também demonstraram que o aumento da expressão de LOX induz o estresse oxidativo e potencializa a ativação de p38 MAPK cardíaca mediada por Ang II, uma das vias de sinalização sugerida pelos autores para explicar o da hipertrofia induzida por Ang II nos ratos que superexpressam LOX. Os dados de Galán *et al.* (2017) corroboram o resultados da Tabela 6, onde vemos que no animais TGM(rTon), que se mostraram resistentes a hipertrofia cardíaca induzida por ISO, a expressão de LOX está diminuída.

O mesmo ocorre com a diminuição da expressão de COL5A2 nos TGM(rTon) tratados com ISO, pois esse gene codifica a expressão de colágeno tipo 5 alfa 2, que é um tipo de colágeno encontrado durante o desenvolvimento embrionário e que tem sido associado a fibrose desenvolvida nas cardiomiopatias e isquemias (Azuage *et al.*, 2013; Peacock *et al.*, 2008).

O CTGF é um gene que codifica um fator de crescimento que atua na mitose e está relacionado à proliferação, diferenciação e adesão celular. Alguns autores afirmam que o CTGF além de induzir fibrose também participa do processo de hipertrofia cardíaca (Leask *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2015). Entretanto, Fontes *et al.* (2017) demonstraram que em um modelo animal que não expressava CTGF, após indução de hipertrofia cardíaca por coactação da aorta, a ausência de CTGF não foi capaz de prevenir fibrose e hipertrofia cardíaca. Essa controvérsia da literatura demonstra que ainda são necessários novos estudos para que seja definido o papel do gene CTGF na hipertrofia cardíaca. Contudo, nos TGM(rTon) tratados com ISO

há uma diminuição da expressão de CTGF, em comparação com os animais c57 que receberam o mesmo tratamento, o que pode significar que, de alguma forma a diminuição da expressão desse gene pode estar relacionado a cardioproteção, ou que a cardioproteção conferida pela tonina tem pouca relação com a expressão do CTGF.

O gene NMRK2 codifica uma integrina específica de músculo beta 1 que está envolvida na formação das fibras musculares. O aumento de expressão dessa integrina pode ser associado a miogênese, ou seja, proliferação e diferenciação de miócitos (Li *et al.*, 1999). Adicionado a isso, Mericskay *et al.* (2016) demonstraram que o aumento da expressão de NMRK2 pode estar associado a hipertrofia em cardiomiócitos. A regulação negativa do gene NMRK2 nos TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os camundongos C57 que também receberam ISO, corrobora a nossa tese que tonina expressa nos camundongos transgênicos confere cardioproteção nesses animais.

O gene ACTA1 codifica a proteína alfa actina 1 que é uma proteína altamente conservada que desempenha papel na mobilidade celular, estrutura e integridade (Papusheva e Heisenberg, 2010). As isoformas alfa actina são um dos principais componentes do aparelho contrátil, portanto, o aumento da expressão de alfa actina é de grande importância no desenvolvimento da hipertrofia dos miócitos cardíacos (Luther, 2009). Conseqüentemente, é possível inferir que a diminuição da expressão gênica do ACTA1 nos TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 que receberam o mesmo estímulo hipertrófico, está relacionada resistência a hipertrofia cardíaca observada nesse grupo experimental.

O gene MEOX1 codifica proteínas mesenquimais que desempenham papel importante na disfunção endotelial, por meio da regulação negativa de fatores de transcrição para angiogênese, diminuição da expressão de eNOS e aumento da expressão de p53 (Northcott *et al.*, 2017). Contudo, a diminuição da expressão desse gene nos TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 também tratados com ISO, pode tanto ser uma fator que favorece a resistência a hipertrofia cardíaca, quanto uma consequência da resistência à hipertrofia cardíaca.

O gene CILP codifica proteínas de camada intremediária de cartilagem e pode estar associado à microfibrilas de colágeno VI. (Nakamura *et al.*, 1999). A expressão de CILP é encontrada nos tecidos cartilagosos, mas também pode ser detectada no

músculo e no coração (Bernardo *et al.*, 2011). Como o aumento da expressão de CILP pode estar relacionado com o processo de fibrose (Wang *et al.*, 2012), a diminuição da expressão desse gene nos animais TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 tratados com ISO, pode ser considerado tanto um fator que contribui para a resistência a hipertrofia cardíaca, como pode ser uma consequência da resistência à hipertrofia cardíaca.

O gene NPPB (ou BNP) codifica o BNP, que é um peptídeo, conforme discutido anteriormente, considerado por muitos autores como sendo um marcador pró-hipertrófico, pois a expressão desse gene pode estar aumentada no tecido cardíaco, bem como nos cardiomiócitos isolados que sofreram hipertrofia induzida tanto por sobrecarga hemodinâmica, tratamento com ISO, Ang II e NE (Bronw *et al.*, 1993; Vuolteenaho *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 2015).

No entanto, alguns autores atribuem o aumento da expressão cardíaca do BNP a uma resposta anti-hipertrófica e cardioprotetora (Nishikimi *et al.*, 2006). Tokudome *et al.* (2005) demonstram que o BNP pode atuar protegendo o coração do remodelamento cardíaco excessivo, e que esta cardioproteção se dá por meio da inibição da via da calcineurina-NFAT. Contudo, a expressão gênica do BNP foi mensurada tanto em cardiomiócitos isolados de rato quanto em tecido cardíaco de camundongos, incluindo os TGM(rTon) (FIGURA 20B), e todos os resultados apontaram que após estímulo hipertrófico, tanto por administração de ISO quanto por Ang II, há aumento da expressão de BNP, que é revertido pela presença da tonina. O sequenciamento de RNA dos animais TGM(rTon) também apontou que na comparação entre o transcriptoma dos animais TGM(rTon) e dos camundongos C57, ambos tratados com ISO, a expressão gênica do BNP está diminuída nos camundongos transgênicos tratados com ISO. Conseqüentemente, podemos sugerir que, ao passo que tonina age conferindo resistência à hipertrofia, ocorre então à diminuição da expressão do BNP, como consequência da cardioproteção observada. E pode-se observar ainda que, se não há hipertrofia cardíaca nos animais TGM(rTon) tratados com ISO, a atuação do BNP como biomarcador para doença cardíaca não ocorre, bem como, a inativação das vias pró-hipertróficas pode não ocorrer via BNP.

O THBS4 é o gene que codifica a trombospondina, uma glicoproteína que tem como principal função mediar a interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular



(Adolph, 2002). É bem descrito na literatura que há um aumento de expressão da trombospondina na hipertrofia cardíaca em humanos e modelos animais, pois a trombospondina regula positivamente a fibrose e o remodelamento de órgãos e tecidos em diferentes patologias, incluindo hipertrofia e falência cardíaca (Rysa *et al.*, 2005; Gabrielsen *et al.*, 2007; Mustonen *et al.*, 2008).

Cingolani *et al.* (2011) demonstraram, ainda, que a trombospondina desempenha papel importante nas respostas contráteis ao estresse agudo no coração e conseqüentemente na transição para a hipertrofia dilatada crônica e falência cardíaca. Sendo assim, a diminuição da expressão do THBS4 nos TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 também tratados com ISO, é mais uma evidência da cardioproteção promovida pela tonina.

O gene TNC codifica uma proteína de matriz extracelular chamada tenascina C. Esta é apontada como uma proteína envolvida no processo de remodelamento cardíaco que ocorre na hipertrofia concêntrica e excêntrica, bem como na falência ventricular causada por sobrecarga de pressão (Elliott *et al.*, 2000; Franz *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2009).

Segundo Imanaka-Yoshida (2012), a tenascina também pode atuar regulando a expressão e atividade das metaloproteinases da matriz extracelular, modulando as respostas inflamatórias, promovendo o recrutamento de miofibroblastos e aumentando a fibrose no tecido cardíaco. Contudo, a diminuição da expressão do TNC nos animais TGM(rTon) em comparação com os camundongos C57, ambos tratados com ISO, é mais uma via que parece estar negativamente regulada pela tonina e contribui para a resistência a hipertrofia cardíaca observada.

O gene SERPINB1 codifica uma proteína da família das serpinas, que atua como inibidora das serinoproteinases. E o aumento da expressão das serpinas está associado a processos inflamatórios e diabetes (Takebayashi *et al.*, 2013). Como já descrito anteriormente, tonina é uma serinoproteinase, e como já foi demonstrado (FIGURA 5) ocorre um aumento de expressão de tonina no tecido cardíaco dos animais TGM(rTon) tratados com ISO comparativamente aos C57 tratados com ISO, assim sendo, a diminuição da expressão do gene SERPINB1 nos TGM(rTon) tratados com ISO corrobora este dado.

O gene C1QTNF3 codifica uma proteína complementar ao fator de necrose tumoral (C1q/TNF) que é descrito na literatura como uma proteína que desempenha um

importante papel biológico na promoção da proliferação de células de músculo liso após lesão na parede dos vasos sanguíneos e também pode atuar como uma adipocina antiapoptótica, reguladora positiva da angiogênese e cardioprotetora (Maeda e Wakisaka, 2010; Yi *et al.*, 2012). Contudo, o fato desse gene estar diminuído nos animais TGM(rTon) tratados com ISO, em comparação com os C57 também tratados com ISO, pode estar relacionado a resistência a hipertrofia neste grupo experimental.

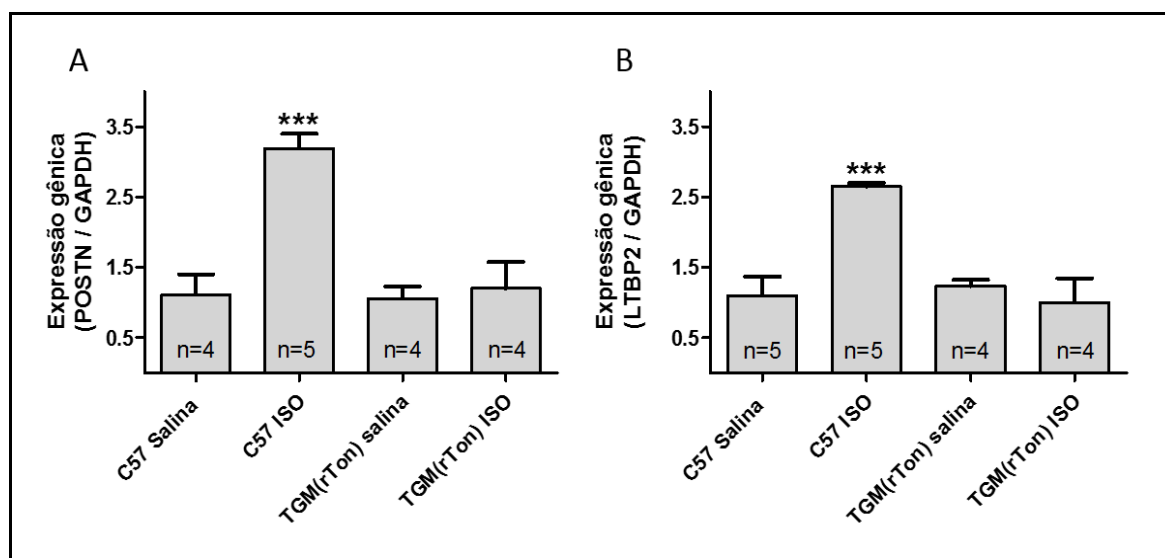
E o último gene a ser discutido é o PRC1, que codifica uma proteína chamada proteína reguladora de citocinese 1 (PRC1). Conforme o nome já indica, a PRC1 está envolvida na fase final dos processos de divisão celular e seus níveis de expressão caem dramaticamente quando a célula sai da mitose. A PRC1 está localizada no núcleo durante a interfase, associada ao fuso mitótico de forma altamente dinâmica durante a mitose e desempenha também um papel importante na montagem do anel contrátil durante a divisão celular (Walczak e Shaw, 2010). Como nos animais TGM(rTon) tratados com ISO não ocorre hipertrofia cardíaca, podemos inferir que esse é o motivo da baixa expressão do PRC1 nesse grupo experimental, comparativamente aos camundongos C57 que também foram tratados com ISO e hipertrofiaram.

## **10. Validação dos Resultados Obtidos no Transcriptoma Através de qPCR**

Após as análises no programa *Enrich*, dentre os 18 genes associados à hipertrofia cardíaca (TABELA 6), foram escolhidos 6 genes para serem validados por qPCR, são eles: POSTN, LTBP2, LOX, COL5A2, ACTA1, NPPB (ou BNP) e os resultados podem ser observados nas Figuras 20 a 23. Na Figura 20A, observa-se os resultados referentes aos níveis de expressão gênica de POSTN e na Figura 20B os resultados da expressão de LTBP2 no coração dos camundongos tratados com ISO, em comparação com os animais que receberam apenas salina.

Para o gene POSTN as médias e desvios padrão foram os seguintes: C57 salina =  $1,11 \pm 0,57$ ; C57 ISO =  $3,19 \pm 0,41$ ; TGM(rTon) salina =  $1,06 \pm 0,33$ ; TGM(rTon) ISO =  $1,20 \pm 0,65$ . Para o gene LTBP2 as médias e desvios padrão foram os seguintes: C57 salina =  $1,10 \pm 0,53$ ; C57 ISO =  $2,65 \pm 0,10$ ; TGM(rTon) salina =  $1,23 \pm 0,16$ ; TGM(rTon) ISO =  $1,00 \pm 0,60$ . As imagens representativas mostram que há um aumento desses marcadores pró-hipertrofos nos camundongos C57 que

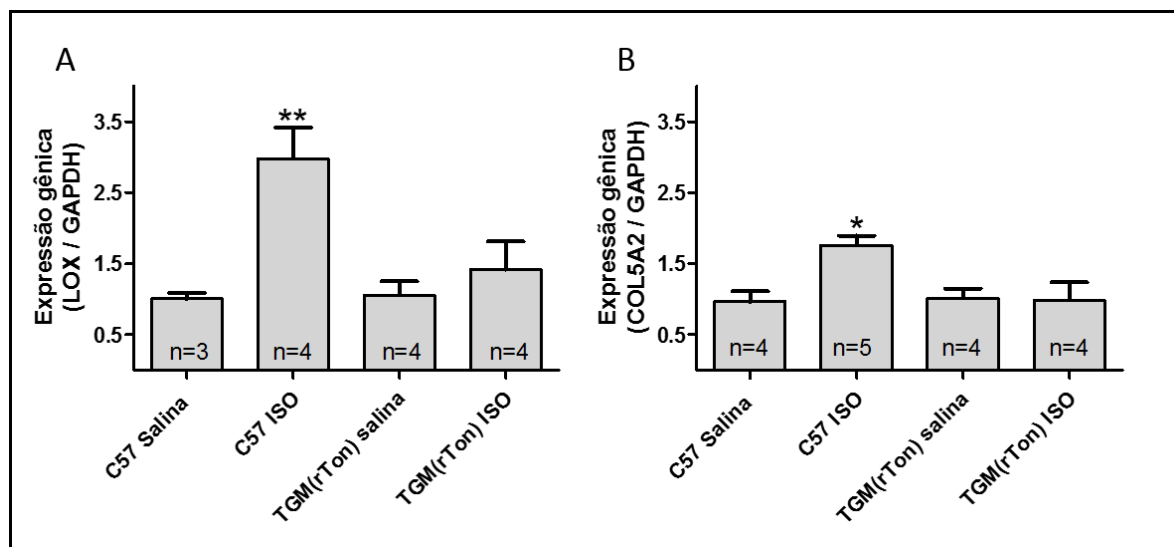
receberam tratamento com ISO, mas nos animais TGM(rTon) os níveis de ambos os marcadores estão parecidos com os controle respectivos controles.



**Figura 20** - Níveis de expressão gênica de POSTN (A) e LTBP2 (B) no coração dos animais TGM(rTon) e seus controles. **A:** \*\*\*p < 0,001 C57 ISO vs. demais grupos. **B:** \*\*\*p < 0,001 C57 ISO vs. demais grupos.

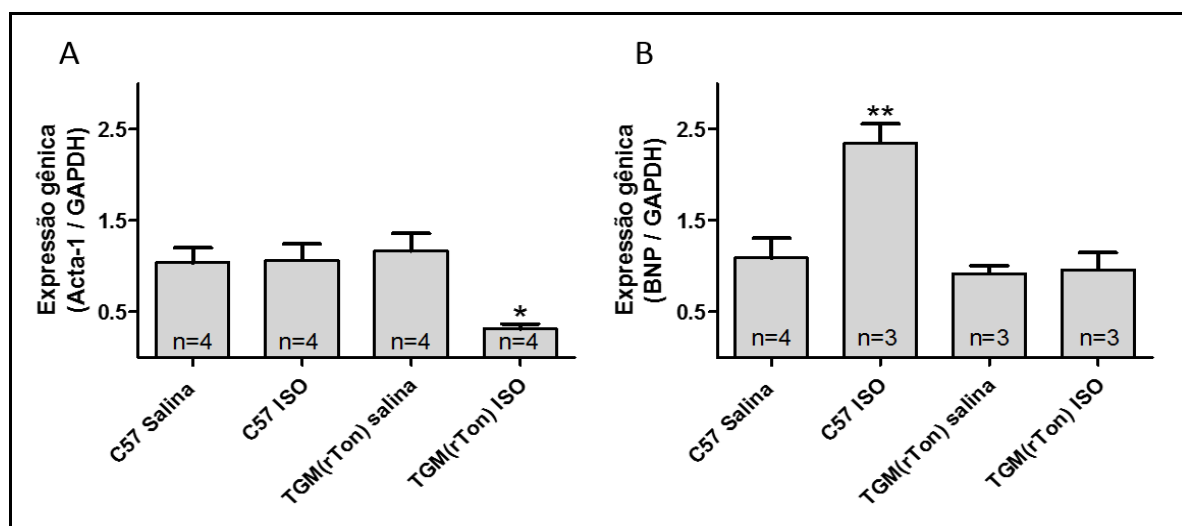
Na Figura 21A, observam-se os resultados referentes à expressão gênica de LOX e na Figura 21B os resultados da expressão de COL5A2. As imagens representativas demonstram um aumento de ambos os marcadores pró-hipertróficos nos camundongos C57 tratados com ISO, quando comparados com os demais grupos.

Para o gene LOX as médias e desvios padrão são as seguintes: C57 salina =  $1,00 \pm 0,13$ ; C57 ISO =  $2,97 \pm 0,98$ ; TGM(rTon) salina =  $1,05 \pm 0,39$ ; TGM(rTon) ISO =  $1,41 \pm 0,68$  e para o gene COL5A2 as médias e desvios padrão são: C57 salina =  $0,96 \pm 0,29$ ; C57 ISO =  $1,76 \pm 0,26$ ; TGM(rTon) salina =  $1,01 \pm 0,23$ ; TGM(rTon) ISO =  $0,98 \pm 0,34$ .



**Figura 21** - Níveis de expressão gênica de LOX (A) e COL5A2 (B) no coração dos animais TGM(rTon) e seus controles. **A:** \*\*p < 0,01 C57 ISO vs. demais grupos. **B:** \*p < 0,05 C57 ISO vs. demais grupos.

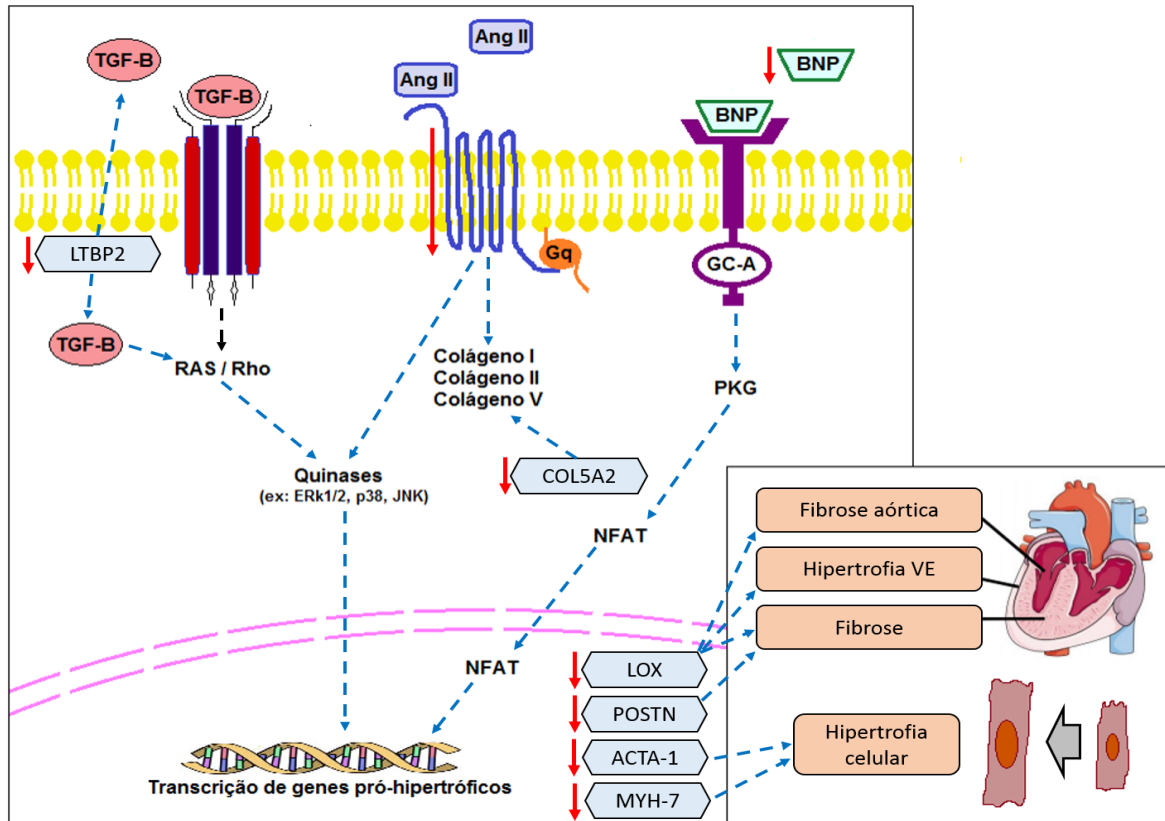
Na Figura 22A, observam-se os resultados referentes a expressão gênica de ACTA1, onde nota-se uma diminuição da expressão do gene pró-hipertrofico nos animais TGM(rTon), quando comparados com os demais grupos. Na Figura 22B, os resultados da expressão de BNP demonstram aumento do marcador nos camundongos C57 tratados com ISO, quando comparados com os demais grupos.



**Figura 22** - Níveis de expressão de Acta-1 (A) e BNP (B) no coração de TGM(rTon) e seus controles. **A:** \*p < 0,05 TGM(rTon) ISO vs. demais grupos. **B:** \*\*p < 0,01 C57 ISO vs. demais grupos.

As médias e desvios padrão são: C57 salina = 1,04 ± 0,32; C57 ISO = 1,06 ± 0,36; TGM(rTon) salina = 1,17 ± 0,38; TGM(rTon) ISO = 0,31 ± 0,10. As médias e desvios padrão são as seguintes: C57 salina = 1,09 ± 0,43; C57 ISO = 2,35 ± 0,29; TGM(rTon) salina = 0,92 ± 0,14; TGM(rTon) ISO = 0,96 ± 0,32.

A partir dos resultados obtidos com os experimentos de RNA-seq e qPCR, pode-se sugerir as vias de sinalização que levam a resistência a hipertrofia cardíaca nos animais TGM(rTon) (FIGURA 23).



**Figura 23** - Vias de sinalização reguladas pela presença da tonina nos animais TGM(rTon).

Na Figura 23 vemos que, a expressão de BNP, receptor AT1, LTBP2, COL5A2, LOX, POSTN, ACTA-1 e MYH7 encontra diminuída nos animais TGM(rTon) que receberam estímulo pró-hipertrofos com ISO, em comparação com os C57 que também foram tratados com ISO. A regulação negativa desses genes está exemplificada pelas setas vermelhas voltadas para baixo. Conforme já discutido anteriormente, a diferença de expressão gênica observada entre os grupos experimentais de camundongos transgênicos que receberam, ou não, tratamento com ISO, reflete um padrão cardioprotetor e anti-hipertrofos que corrobora a literatura.

As setas azuis pontilhadas demonstram a diminuição de ativação das vias de sinalização que levam a hipertrofia. Sendo que da esquerda para a direita temos que, a diminuição da expressão de LTBP2 regula negativamente a expressão de

TGF $\beta$  que pode levar a diminuição da ativação das vias pró-hipertróficas Ras/Rho e quinases.

A diminuição da expressão do receptor AT1 pode regular negativamente a produção de alguns tipos de colágeno e ativação das pró-hipertróficas das quinases. Sendo que, a diminuição da expressão do gene COL5A2 regula a produção de colágeno tipo V.

A diminuição da expressão de BNP no tecido cardíaco dos animais TGM(rTon) pode sugerir uma diminuição da via de ativação da PKG e conseqüentemente uma diminuição da translocação do NFAT para o núcleo da célula.

A diminuição da expressão dos genes LOX, POSTN, ACTA-1 e MYH7 regulam negativamente a fibrose e hipertrofia celular e hipertrofia do VE.

## V. CONCLUSÕES

Tonina, tanto nos animais TGM(rTon), como quando em contato com células cardíacas isoladas de rato, exerce papel cardioprotetor importante ao impedir a hipertrofia cardíaca e celular.

Tonina atua modulando negativamente a expressão de genes pró-hipertroficados, conferindo assim resistência à hipertrofia cardíaca induzida por ISO no coração dos TGM(rTon) e promovendo também resistência à hipertrofia celular induzida por Ang II em cardiomiócitos mantidos em cultura.

A cardioproteção conferida pela tonina parece estar ligada a sua presença propriamente dita no tecido ou célula cardíaca, e não necessariamente pela sua atividade liberadora de Ang II, pois além da tonina regular negativamente a expressão gênica dos receptores AT1 nas células isoladas de rato e no tecido cardíaco de camundongos, essa enzima age ainda prevenindo os efeitos pró-hipertroficados da Ang II nos cardiomiócitos isolados de rato.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adolph, Kenneth W. "The zebrafish thrombospondin 3 and 4 genes (thbs3 and thbs4): cDNA and protein structure." *DNA Sequence* 13.5 (2002): 277-285.
2. Altschul, S.F. et al. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410.
3. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: A review. *J Am Coll Cardiol* 7: 1140-1149, 1986.
4. Araujo RC, Lima MP, Lomez ES, Bader M, Pesquero JB, Sumitani M, et al. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. *Physiol Behav.* 2002 Jun 1;76(2):327-33. PubMed PMID: 12044607.
5. Ashizawa, Naoto, et al. "Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A (II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction." *Journal of Clinical Investigation* 98.10 (1996): 2218.
6. Azuaje, Francisco, et al. "Analysis of a gene co-expression network establishes robust association between Col5a2 and ischemic heart disease." *BMC medical genomics* 6.1 (2013): 13.
7. Baker, K.M, Booz, G.W, Dostal, D.E. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*, 54: 227–241, 1992.
8. Basso, Cristina, et al. "Hypertrophic cardiomyopathy and sudden death in the young: pathologic evidence of myocardial ischemia." *Human pathology* 31.8 (2000): 988-998.
9. Bateman, John. *Multimodality and genre: A foundation for the systematic analysis of multimodal documents.* Springer, 2008.
10. Batlouni, M., N. Ghorayeb, and T. L. Barros Neto. "Coração de atleta." *O Exercício: Preparação Fisiológica, Avaliação Médica, Aspectos Especiais e Preventivos.* Rio de Janeiro: Atheneu (1999): 147-72.
11. Benjamin, Ivor J., et al. "Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis." *Circulation research* 65.3 (1989): 657-670.
12. Bernardo, Bianca C., et al. "Cartilage intermediate layer protein 2 (CILP-2) is expressed in articular and meniscal cartilage and down-regulated in



- experimental osteoarthritis." *Journal of Biological Chemistry* 286.43 (2011): 37758-37767.
13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
  14. Borges, Júlio César, et al. "Tonin in rat heart with experimental hypertrophy." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284.6 (2003): H2263-H2268.
  15. Boucher R, Asselin J, Genest J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. *Circ Res* 34 & 35(suppl I): I-203-212, 1974.
  16. Boucher R, Said M, Genest J. A new Angiotensin I converting enzyme system. In: *Hypertension 72*, edited by Genest J and Koiv E, Springer-Verlag, New York, pp. 521-523, 1972.
  17. Brown, Lesley A., D. J. Nunez, and Martin R. Wilkins. "Differential regulation of natriuretic peptide receptor messenger RNAs during the development of cardiac hypertrophy in the rat." *Journal of Clinical Investigation* 92.6 (1993): 2702.
  18. Bueno, Orlando F., et al. "The MEK1–ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice." *The EMBO journal* 19.23 (2000): 6341-6350.
  19. Burgoyne, Joseph R., et al. "Redox signaling in cardiac physiology and pathology." *Circulation research* 111.8 (2012): 1091-1106.
  20. Calderone, Angelino, et al. "Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts." *Journal of Clinical Investigation* 101.4 (1998): 812.
  21. Calderone, Angelino, et al. "TGF- $\beta$  1 and prepro-ANP mRNAs are differentially regulated in exercise-induced cardiac hypertrophy." *Journal of Applied Physiology* 91.2 (2001): 771-776.
  22. Cardoso CC, Alenina N, Ferreira AJ, Qadri F, Lima MP, Gross V, Todiras M, Pesquero JB, Pesquero JL, Bader M. Increased blood pressure and water intake in transgenic mice expressing rat tonin in the brain. *Biol Chem* 391: 435–441, 2010.

23. Chen, Michelle M., et al. "CTGF expression is induced by TGF- $\beta$  in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis." *Journal of molecular and cellular cardiology* 32.10 (2000): 1805-1819.
24. Chevreux, Bastien, et al. "Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs." *Genome research* 14.6 (2004): 1147-1159.
25. Cingolani, Oscar H., et al. "Thrombospondin-4 is required for stretch-mediated contractility augmentation in cardiac muscle." *Circulation research*(2011): CIRCRESAHA-111.
26. Cloonan, Nicole, and Sean M. Grimmond. "Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution." *Genome biology* 9.9 (2008): 234.
27. Damasceno DD, Lima MP, Motta DF, Ferreira AJ, Quintao-Junior JF, Drummond LR, et al. Cardiovascular and electrocardiographic parameters after tonin administration in Wistar rats. *Regul Pept.* 2013 Feb 10;181:30-6. PubMed PMID: 23318501.
28. Dash, Rajesh, et al. "Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy." *Cardiovascular research* 57.3 (2003): 704-714.
29. de Simone, Giovanni. "Concentric or eccentric hypertrophy: how clinically relevant is the difference?." *Hypertension* 43.4 (2004): 714-715.
30. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
31. Dorn, Gerald W. "GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease." *Journal of molecular medicine* 87.5 (2009): 455-463.
32. Elliott, Kathryn, Hugh Watkins, and Charles S. Redwood. "Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy." *Journal of Biological Chemistry* 275.29 (2000): 22069-22074.
33. Fernandes, T., U. P. R. Soci, and E. M. Oliveira. "Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44.9 (2011): 836-847.

34. Fleischmann, Robert D., et al. "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd." *science* (1995): 496-512.
35. Fontes, Magda SC, et al. "CTGF knockout does not affect cardiac hypertrophy and fibrosis formation upon chronic pressure overload." *Journal of molecular and cellular cardiology* 88 (2015): 82-90.
36. Franchini, Kleber G. "Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares." *Rev Bras Hipertens* 8.1 (2001): 125-42.
37. Franz M, Berndt A, Altendorf-Hofmann A, Fiedler N, Richter P, Schumm J et al. Serum levels of large tenascin-C variants, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in concentric versus eccentric left ventricular hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2009;11:1057 –1062.
38. Franz, Marcus, et al. "Tenascin-C in cardiovascular remodeling: potential impact for diagnosis, prognosis estimation and targeted therapy." *Cell adhesion & migration* 9.1-2 (2015): 90-95.
39. Fraser, Claire M., et al. "The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*." *science* (1995): 397-403.
40. Frey, NaENO, and E. N. Olson. "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." *Annual review of physiology* 65.1 (2003): 45-79.
41. Gabrielsen, Anders, et al. "Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium." *Journal of molecular and cellular cardiology* 42.4 (2007): 870-883.
42. Galán, María, et al. "Lysyl oxidase overexpression accelerates cardiac remodeling and aggravates angiotensin II-induced hypertrophy." *The FASEB Journal* (2017): fj-201601157RR.
43. Garcia, José Antonio Dias, and Erika Kristina Incerpi. "Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico." *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 90.6 (2008): 443-450.
44. Geisterfer-Lowrance, Anja AT, et al. "A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a  $\beta$  cardiac myosin heavy chain gene missense mutation." *Cell* 62.5 (1990): 999-1006.

45. Geisterfer-Lowrance, Anja AT, et al. "A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a  $\beta$  cardiac myosin heavy chain gene missense mutation." *Cell* 62.5 (1990): 999-1006.
46. Gerçek, Mustafa, et al. "Cardiomyocyte Hypertrophy in Arrhythmogenic Cardiomyopathy." *The American Journal of Pathology* 187.4 (2017): 752-766.
47. Ghigo, Alessandra, et al. "PI3K and Calcium Signaling in Cardiovascular Disease." *Circulation Research* 121.3 (2017): 282-292.
48. Ghorayeb, Nabil, et al. "Left ventricular hypertrophy of athletes: adaptative physiologic response of the heart." *Arquivos brasileiros de cardiologia* 85.3 (2005): 191-197.
49. Giachelli, Cecilia M., Stephen M. Schwartz, and Lucy Liaw. "Molecular and cellular biology of osteopontin: potential role in cardiovascular disease." *Trends in cardiovascular medicine* 5.3 (1995): 88-95.
50. Glenn, Travis C. "Field guide to next-generation DNA sequencers." *Molecular ecology resources* 11.5 (2011): 759-769.
51. Gris  C, Boucher R, Thibault G, Genest J. Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. *Can J Biochem.* 1981 Apr;59(4):250-5. PubMed PMID: 6265047
52. Grossman, William, and Walter J. Paulus. "Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling." *The Journal of clinical investigation* 123.9 (2013): 3701.
53. Gualberto MP, Nunes RL, Beraldo WT, Pesquero JL. Tonin-like activity present in the human submandibular gland. *Agents Actions Suppl.* 1992;38 (Pt 1):392-400. PubMed PMID: 1334624.
54. Guatimosim, Silvia, et al. "Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function." *Cell calcium* 44.2 (2008): 230-242.
55. Hamilton, Douglas W. "Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease." *Journal of cell communication and signaling* 2.1-2 (2008): 9.
56. Heineke, Joerg, and Jeffery D. Molkentin. "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." *Nature reviews. Molecular cell biology* 7.8 (2006): 589.

57. Hellman U, Mörner S, Engström-Laurent A, Samuel JL, Waldenström A. Temporal correlation between transcriptional changes and increased synthesis of hyaluronan in experimental cardiac hypertrophy. *Genomics*. 2010;96:73–81. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.04.003.
58. Hirata Y, Tomita M, Fujita T, Ikeda M. In vitro secretion of immunoreactive tonin from
59. Horio, Takeshi, et al. "Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes." *Hypertension* 35.1 (2000): 19-24.
60. Houston, Brian A., and Gerin R. Stevens. "Hypertrophic cardiomyopathy: a review." *Clinical Medicine Insights. Cardiology* 8.Suppl 1 (2014): 53.
61. Hullmann, Jonathan E., et al. "GRK5-Mediated Exacerbation of Pathological Cardiac Hypertrophy Involves Facilitation of Nuclear NFAT Activity Novelty and Significance." *Circulation research* 115.12 (2014): 976-985.
62. Imanaka-Yoshida, K. (2012). Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling. *Circ J*. 76, 2513–2520. doi: 10.1253/circj.CJ-12-1033
63. Inagaki, Koichi, et al. "Tissue angiotensin II during progression of ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC $\epsilon$  and PKC $\beta$ ." *Journal of molecular and cellular cardiology* 34.10 (2002): 1377-1385.
64. Jones, Micheala N., and Robert G. Holt. "Cloning and characterization of an  $\alpha$ -enolase of the oral pathogen *Streptococcus mutans* that binds human plasminogen." *Biochemical and biophysical research communications* 364.4 (2007): 924-929.
65. Kaartinen, Mari T., et al. "Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties." *Journal of Biological Chemistry* 274.3 (1999): 1729-1735.
66. Katsuragi, Naruto, et al. "Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation." *Circulation* 110.13 (2004): 1806-1813.
67. Kondo K, Garcia R, Boucher R, Genest J. Effects of intracerebroventricular administration of tonin on water intake and blood pressure in the rat. *Brain Res* 200(2): 437-441, 1980.

68. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*. 2016; gkw377 .
69. Kuster DJ, Marshall GR. Validated ligand mapping of ACE active site. *J Comput Aided Mol Des* 19(8):609-615, 2005
70. Laemmli, Ulrich K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *nature* 227.5259 (1970): 680-685. Lander et al., 2001;
71. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, Morgan M and Carey V (2013). "Software for Computing and Annotating Genomic Ranges." *PLoS Computational Biology*, 9. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003118, <http://www.ploscompbiol.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pcbi.1003118>
72. Leask, Andrew. "Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis." *The Keio journal of medicine* 53.2 (2004): 74-77.
73. Leenen, Frans HH, Roselyn White, and Baoxue Yuan. "Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281.6 (2001): H2410-H2416.
74. Levy, D, Garrison, R.J, Savage, D.D, Kannel, W.B, Castelli, W.P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 322: 1561–1566, 1990.
75. Liu, Wei, et al. "A Novel Immunomodulator, FTY-720 Reverses Existing Cardiac Hypertrophy and Fibrosis from Pressure Overload by Targeting NFAT Signaling and Periostin." *Circulation: Heart Failure* (2013): CIRCHEARTFAILURE-112.
76. Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method." *methods* 25.4 (2001): 402-408.

77. Lloyd-Jones, D., et al. "Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association." *Circulation* 121.7 (2010): e46.
78. Luther, Pradeep K. "The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling." *Journal of muscle research and cell motility* 30.5-6 (2009): 171-185.
79. Maass, A. H., et al. "Cardiac gene expression profiling--the quest for an atrium-specific biomarker." *Netherlands Heart Journal* 18.12 (2010): 610.
80. Maeda, Takashi, and Satoshi Wakisaka. "CTRP3/cartducin is induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 and promotes vascular smooth muscle cell proliferation." *Cell biology international* 34.3 (2010): 261-266.
81. Margulies, Marcel, et al. "Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors." *Nature* 437.7057 (2005): 376.
82. Marian, Ali J., and Robert Roberts. "Molecular basis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy." *Texas Heart Institute Journal* 21.1 (1994): 6.
83. Martini, Jeffrey S., et al. "Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.34 (2008): 12457-12462.
84. McKenna, W. J., et al. "Arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. I: Influence on prognosis." *Heart* 46.2 (1981): 168-172.
85. McKenna, William J., et al. "Arrhythmia and prognosis in infants, children and adolescents with hypertrophic cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 11.1 (1988): 147-153.
86. Mericskay, Mathias. "Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential." *Archives of cardiovascular diseases* 109.3 (2016): 207-215.
87. Morgan HE, Gordon EE, Kira Y, Chua BHL, Russo LA, Peterson CI, et al. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Ann Rev Physiol*; 49: 533-43, 1987.
88. Mustonen E., Aro J., Puhakka J., Ilves M., Soini Y., Leskinen H., Ruskoaho H., Rysa J. (2008) Thrombospondin-4 expression is rapidly upregulated by cardiac overload. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 186–191

89. Nagalakshmi, Ugrappa, Karl Waern, and Michael Snyder. "RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis." *Current Protocols in Molecular Biology* (2010): 4-11.
90. Nakamura, Isao, et al. "Genomic organization, mapping, and polymorphisms of the gene encoding human cartilage intermediate layer protein (CILP)." *Journal of human genetics* 44.3 (1999): 203-205.
91. Nishikimi, Toshio, Nobuyo Maeda, and Hiroaki Matsuoka. "The role of natriuretic peptides in cardioprotection." *Cardiovascular research* 69.2 (2006): 318-328.
92. Norris, Russell A., et al. "Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1123.1 (2008): 30-40.
93. Northcott, Josette M., Michael P. Czubryt, and Jeffrey T. Wigle. "Vascular senescence and ageing: a role for the MEOX proteins in promoting endothelial dysfunction." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 99 (2017): 1-11.
94. Oigman, W. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipert* 3: 261-267, 2000.
95. Oka T, Xu J, Kaiser RA, Melendez J, Hambleton M, Sargent MA, Lorts A, Brunskill EW, Dorn GW, II, Conway SJ, Aronow BJ, Robbins J, Molkentin JD. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodelling. *Circ Res.* 2007;101:313–321.
96. Ørn, S., and K. Dickstein. "How do heart failure patients die?." *European Heart Journal Supplements* 4.suppl\_D (2002): D59-D65.
97. Panagopoulou, Vasiliki, et al. "NTproBNP: an important biomarker in cardiac diseases." *Current topics in medicinal chemistry* 13.2 (2013): 82-94.
98. Papusheva, Ekaterina, and Carl-Philipp Heisenberg. "Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis." *The EMBO journal* 29.16 (2010): 2753-2768.
99. Park, Cheon Ho, et al. "A novel role of G protein-coupled receptor kinase 5 in urotensin II-stimulated cellular hypertrophy in H9c2UT cells." *Molecular and cellular biochemistry* 422.1-2 (2016): 151-160.



100. Peacock IV, W. Frank, et al. "Cardiac troponin and outcome in acute heart failure." *New England Journal of Medicine* 358.20 (2008): 2117-2126.
101. Pelliccia, A. Determinants of morphologic cardiac adaptation in elite athletes: the role of athletic training and constitutional factors. *Int J Sports Med*, 17 (suppl.): 157-63, 1996.
102. Pesquero JL, Boschcov P, Oliveira MC, Paiva AC. Effect of substrate size on tonin activity. *Biochem Biophys Res Commun* 108(4): 1441-1446, 1982.
103. Rezende F, Ribeiro AA, Jara ZP, Fernandes VA, Lima MP, Casarini DE and Pesquero JL. Tonin: An Overview and Functional Analysis. In: *New Aspects of the Renin Angiotensin System in Cardiovascular and Renal Diseases*, Casarini DE, Arita DY, Colucci JA, Cunha TS eds, Pp. 154-174, 2016. DOI:10.2174/97816810831311160101
104. Ribeiro, Amanda A., et al. "Characterization of the renal renin-angiotensin system in transgenic mice that express rat tonin." *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 16.4 (2015): 947-955.
105. Richard, Pascale, et al. "Double heterozygosity for mutations in the  $\beta$ -myosin heavy chain and in the cardiac myosin binding protein C genes in a family with hypertrophic cardiomyopathy." *Journal of Medical Genetics* 36.7 (1999): 542-545.
106. Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2010). "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *Bioinformatics*, 26, pp. -1.
107. Rodbard, D., and J. E. Lewald. "Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data." *Acta Endocrinologica* 65.1 Suppl (1970): S79-S103.
108. Rodríguez, Cristina, et al. "Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases." *Cardiovascular research* 79.1 (2008): 7-13.
109. Rossi, Marcos A., and Sonia V. Carillo. "Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena?." *International journal of cardiology* 31.2 (1991): 133-141.

110. Rysa J., Leskinen H., Ilves M., Ruskoaho H. (2005) Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure. *Hypertension* 45, 927–933
111. Sadoshima, Jun-ichi, et al. "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." *Cell* 75.5 (1993): 977-984.
112. Sala, Valentina, et al. "Cardiac concentric hypertrophy promoted by activated Met receptor is mitigated in vivo by inhibition of Erk1, 2 signalling with Pimasertib." *Journal of molecular and cellular cardiology* 93 (2016): 84-97.
113. Sanger, Frederick, Steven Nicklen, and Alan R. Coulson. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the national academy of sciences* 74.12 (1977): 5463-5467.
114. Sayers, Eric W., et al. "Database resources of the national center for biotechnology information." *Nucleic acids research* 40.D1 (2012): D13-D25.
115. Schiffrin EL, Garcia R, Gutkowska J, Boucher R, Genest J. Pressor effect of tonin in anephric animals. *Can J Physiol Pharmacol* 59(8): 864-71, 1981.
116. Schiffrin EL, Garcia R, Gutkowska J, Lis M, Genest J. Effects of tonin on the adrenal secretion in the rat. *Hypertension* 3(6 Pt 2):II-9-13, 1981.
117. Schiller PW, Demassieux S, Boucher R. Substrate specificity of tonin from rat submaxillary gland. *Circ Res* 39(5): 629-632, 1976.
118. Shipley, J. Michael, et al. "Developmental expression of latent transforming growth factor  $\beta$  binding protein 2 and its requirement early in mouse development." *Molecular and cellular biology* 20.13 (2000): 4879-4887.
119. Singh, Krishna, et al. "Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure." *Hypertension* 33.2 (1999): 663-670.
120. Singh, Mahipal, et al. "Osteopontin: a novel inflammatory mediator of cardiovascular disease." *Front Biosci* 12.1 (2007): 214-221.
121. Sinha S, Heagerty AM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Expression of latent TGF-beta binding proteins and association with TGF-beta1 and fibrillin-1 following arterial injury. *Cardiovasc Res.* 2002;53:971–983. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00512-0.

122. Soares, Luis M. Mendes, and Juan Valcárcel. "The expanding transcriptome: the genome as the 'Book of Sand'." *The EMBO Journal* 25.5 (2006): 923-931.
123. Song, Wei, Hao Wang, and Qingyu Wu. "Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA)." *Gene* 569.1 (2015): 1-6.
124. Sorriento, Daniela, et al. "The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFκB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IκBα." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.46 (2008): 17818-17823.
125. Stansfield, William E., et al. "Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart." *The Annals of thoracic surgery* 88.6 (2009): 1916-1921.
126. Sussman A, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 91: 888-98, 2002.
127. Takebayashi, Kohzo, et al. "Circulating SerpinB1 levels and clinical features in patients with type 2 diabetes." *BMJ Open Diabetes Research and Care* 4.1 (2016): e000274.
128. Teerlink, J.R, Pfeffer, J.M, Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res* 75: 105-113, 1994.
129. Thomas, Karluss, et al. "The utility of an international sera bank for use in evaluating the potential human allergenicity of novel proteins." *Toxicological sciences* 97.1 (2007): 27-31.
130. Tin, Lwin Lwin, D. Gareth Beevers, and Gregory YH Lip. "Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden death." *Current cardiology reports* 4.6 (2002): 449-457.
131. Tokudome, Takeshi, et al. "Calcineurin–nuclear factor of activated T cells pathway–dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase a, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides." *Circulation* 111.23 (2005): 3095-3104.
132. Trueblood, Nathan A., et al. "Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin." *Circulation research* 88.10 (2001): 1080-1087.

133. TSE, JAMES, et al. "Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: Modifications in characteristics of  $\beta$ -adrenergic receptor, adenylate cyclase, and ventricular contraction." *Endocrinology* 105.1 (1979): 246-255.
134. Tunón, Peter, and Karl-Erik Johansson. "Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels." *Journal of biochemical and biophysical methods* 9.2 (1984): 171-179.
135. Valiente-Alandi, Iñigo, Allison E. Schafer, and Burns C. Blaxall. "Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart." *Journal of molecular and cellular cardiology* 91 (2016): 228-237.
136. Velculescu, Victor E., et al. "Characterization of the yeast transcriptome." *Cell* 88.2 (1997): 243-251.
137. Venter, J. Craig, et al. "The sequence of the human genome." *science* 291.5507 (2001): 1304-1351.
138. Von Harsdorf, Rudiger, et al. "Myocardial stretch stimulates phosphatidylinositol turnover." *Circulation research* 65.2 (1989): 494-501.
139. Vuolteenaho, Olli, Minna Ala-Kopsala, and Heikki Ruskoaho. "BNP as a biomarker in heart disease." *Advances in clinical chemistry* 40 (2004): 1-36.
140. Walczak, Claire E., and Sidney L. Shaw. "A MAP for bundling microtubules." *Cell* 142.3 (2010): 364-367.
141. Wang Z, Gerstein M, Snyder M, et al. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1): 57-63, 2009.
142. Wang, Dajun, et al. "Effects of Pressure Overload on Extracellular Matrix Expression in the Heart of the Atrial Natriuretic Peptide–Null Mouse." *Hypertension* 42.1 (2003): 88-95.
143. Wang, Zheng, et al. "Human GRK4 $\gamma$ 142V Variant Promotes Angiotensin II Type I Receptor–Mediated Hypertension via Renal Histone Deacetylase Type 1 Inhibition Novelty and Significance." *Hypertension* 67.2 (2016): 325-334.
144. Wang, Zili, et al. "Cartilage intermediate layer protein (CILP) regulation in intervertebral discs: the effect of age, degeneration, and bone morphogenetic protein-2." *Spine* 37.4 (2012): E203-E208.

145. World Health Organization (WHO). Media Centre about Cardiovascular diseases (CVDs). WHO fact sheet updated May 2017 [acesso em 21 de agosto de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/en>
146. Wren, Jonathan D., and Alex Bateman. "Databases, data tombs and dust in the wind." (2008): 2127-2128.
147. Yamazaki T, Wälchli S, Fujita T, Ryser S, Hoshijima M, Schlegel W, Kuroda S, Maturana AD. Splice variants of enigma homolog, differentially expressed during heart development, promote or prevent hypertrophy. *Cardiovasc Res*. Jun 1;86(3):374-82, 2010.
148. Yi, Wei, et al. "C1q/TNF-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel anti-apoptotic, pro-angiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart." *Circulation* (2012): CIRCULATIONAHA-112.
149. Zhu, Tian-Tian, et al. "LOX-1 promotes right ventricular hypertrophy in hypoxia-exposed rats." *Life Sciences* 174 (2017): 35-42.

## VII. ANEXO

**Lista de significados dos 300 genes, diferencialmente expressos, exibidos na Tabela 3. Os significados foram retirados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e do DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*)**

1810022K09RIK: RIKEN cDNA 1810022K09 gene  
2200002D01RIK: RIKEN cDNA 2200002D01 gene  
4933407K13RIK: RIKEN cDNA 4933407K13 gene  
4933409K07RIK: RIKEN cDNA 4933409K07 gene  
9330175E14RIK: RIKEN cDNA 9330175E14 gene  
9430037G07RIK: RIKEN cDNA 9330175E14 gene  
A530032D15RIK: RIKEN cDNA A530032D15Rik gene  
ABCC6: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 6 (ARA;PXE)  
ACOT5: acyl-CoA thioesterase 5 ( PTE-Ic; BC016076)  
ACTA1: Actin, Alpha 1, Skeletal Muscle (ACTA)  
ACTA2: Actin, Alpha 2, Smooth Muscle, Aorta  
ADAM8: ADAM Metallopeptidase Domain 8  
ADAMTS16: ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 16  
ADGRB2: Adhesion G Protein-Coupled Receptor B2 ( BAI2)  
AF357426: snoRNA AF357426 ( MBII-49)  
AI464131: AI464131 ( Gm762; NET37; AA408153 )  
AMZ1: Archaelysin Family Metallopeptidase 1  
ANGPTL4: angiopoietin like 4  
ANGPTL7: Angiopoietin Like 7  
ANKRD60: Ankyrin Repeat Domain 60 (C20orf86)  
APOL9A: apolipoprotein L 9a  
APOL9B:apolipoprotein L 9b ( 2310016F22Rik)  
ARNTL2: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like 2  
ART4: ADP-Ribosyltransferase 4 (DO)  
ATP6V0D2: ATPase H+ Transporting V0 Subunit D2  
ATRN: Attractin  
B230208H11RIK: IKEN cDNA B230208H11 gene  
BAIAP2L1: BAI1 Associated Protein 2 Like 1

BCL3: B-Cell CLL/Lymphoma 3  
BLOC1S4: Biogenesis Of Lysosomal Organelles Complex 1 Subunit 4  
BPIFA1: BPI Fold Containing Family A Member 1 ( PLUNC)  
BPIFB1: BPI Fold Containing Family B Member 1 ( C20orf114)  
C130080G10RIK: RIKEN cDNA C130080G10 gene  
C1QTNF3: C1q And TNF Related 3  
C1QTNF4: C1q And TNF Related 4  
CACNA1H: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 H  
CADPS2: Calcium Dependent Secretion Activator 2  
CCDC88B: Coiled-Coil Domain Containing 88B  
CD22: CD22 Molecule  
CD300LB: CD300 Molecule Like Family Member B  
CD74: D74 Molecule ( DHLAG)  
CDK14: Cyclin Dependent Kinase 14 ( PFTK1)  
CEMIP: Cell Migration Inducing Hyaluronan Binding Protein ( KIAA1199)  
CIART: Circadian Associated Repressor Of Transcription ( C1orf51)  
CIITA: Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator ( MHC2TA)  
CILP: Cartilage Intermediate Layer Protein  
CILP2: Cartilage Intermediate Layer Protein 2  
CLEC4D: C-Type Lectin Domain Family 4 Member D (CLECSF8)  
CMC4: C-X9-C Motif Containing 4 ( MTCP1 MTCP1NB)  
CNN1: Calponin 1  
COL11A1: Collagen Type XI Alpha 1 Chain ( COLL6)  
COL12A1: Collagen Type XII Alpha 1 Chain ( COL12A1L )  
COL5A2: Collagen Type V Alpha 2 Chain  
COL8A2: Collagen Type VIII Alpha 2 Chain ( FECD)  
CRLF1: Cytokine Receptor Like Factor 1  
CTGF: Connective Tissue Growth Factor  
CTXN1: Cortixin 1  
CYP2A5: cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5 ( Coh; CYP11A5; Cyp15a2)  
CYP2F2: cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2 (Cyp2f)  
CYP46A1: cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1 ( CP46; CYP46)

D830026I12RIK: RIKEN cDNA D830026I12 gene  
DCDC2B: Doublecortin Domain Containing 2B  
DOC2B: Double C2 Domain Beta ( DOC2BL)  
DOCK3: Dedicator Of Cytokinesis 3  
DUSP2: Dual Specificity Phosphatase 2  
E330017L17RIK: RIKEN cDNA E330017L17 gene  
EFNA3: Ephrin A3 ( EPLG3)  
EMILIN2: Elastin Microfibril Interfacer 2  
EMP1: Epithelial Membrane Protein 1  
ENO2: Enolase 2  
EPHA8: EPH Receptor A8 ( EEK)  
ESRP1: Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 (RBM35A)  
EVX2: Even-Skipped Homeobox 2  
F2RL1: F2R Like Trypsin Receptor 1 ( GPR11)  
F830016B08RIK: RIKEN cDNA F830016B08 gene (Ifgga4 )  
FAM107A: Family With Sequence Similarity 107 Member A  
FAM43A: Family With Sequence Similarity 43 Member A  
FGF2: Fibroblast Growth Factor 2 ( FGFB)  
FGF7: Fibroblast Growth Factor 7  
FIBCD1: Fibrinogen C Domain Containing 1  
FMN1: Formin 1 ( LD, FMN )  
FOXA1: orkhead Box A1 ( HNF3A )  
FOXE1: Forkhead Box E1 ( FKHL15;TITF2 )  
FOXO6: Forkhead Box O6  
GALR3: alanin Receptor 3  
GBP10: guanylate-binding protein 10  
GBP11: guanylate binding protein 11 (Gm7141; EG634650 )  
GBP6: Guanylate Binding Protein Family Member 6  
GBP8: guanylate-binding protein 8 ( mGBP8; 5830443L24Rik)  
GCHFR: GTP Cyclohydrolase I Feedback Regulator (  
GM10046: predicted gene 10046  
GM11127: predicted gene 11127  
GM11237: predicted gene 11237 ( Gm11236)



GM11239: predicted gene 11239  
GM11627: predicted gene 11627  
GM12250: predicted gene 12250 ( Irgb10 )  
GM14440: predicted gene 14440  
GM15663: predicted gene 15663 ( 9330159K06 )  
GM20594: predicted gene, 20594 ( Mtrnr2l)  
GM38423: predicted gene, 38423 ( Gm11237)  
GM4841: predicted gene 4841 9 ( Ifgga3; EG225594)  
GM4951: predicted gene 4951 ( Ifgga2; EG240327 )  
GM6034: predicted gene 6034 ( EG547347; H2-gs14-2 )  
GM6416: predicted gene 6416  
GM7030: predicted gene 7030 ( H2-t9; EG630294 )  
GM7609: predicted pseudogene 7609 ( EG665378 )  
GM8909: predicted gene 8909 ( H2-Tw5l; H2-gs17 )  
GPNMB: Glycoprotein Nmb  
GPR39: G Protein-Coupled Receptor 39  
GRIK3: Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 3  
H2-AA: histocompatibility 2, class II antigen A, alpha ( Ia1; H2Aa)  
H2-AB1: histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1 ( IAb; Ia2 )  
H2-BL: histocompatibility 2, blastocyst ( H2-B1; H2-BI-like )  
H2-D1: histocompatibility 2, D region locus 1 ( H-2D; H2-D)  
H2-EB1: histocompatibility 2, class II antigen E beta ( Eb; Ia4)  
H2-K1: histocompatibility 2, K1, K region ( K-f; H-2K)  
H2-L: histocompatibility 2, D region locus L ( H-2L )  
H2-Q1: histocompatibility 2, Q region locus 1 ( Q1; Q1b )  
H2-Q10: histocompatibility 2, Q region locus 10 ( Q10; Qa10 )  
H2-Q5: histocompatibility 2, Q region locus 5 ( Qa5; Qa-5 )  
H2-Q6: histocompatibility 2, Q region locus 6 ( Qa6; Qa-6 )  
H2-Q7: histocompatibility 2, Q region locus 7 ( Q9; Ped )  
H2-Q8: histocompatibility 2, Q region locus 8 ( Qa8; Qa-2 )  
H2-Q9: histocompatibility 2, Q region locus 9 ( Ped; Qa9 )  
H2-T-P: histocompatibility 2, T region locus, pseudogene ( H2-T11; C920025E04Rik)  
HDHD3: Haloacid Dehalogenase Like Hydrolase Domain Containing 3 ( C9orf158 )

HGFAC: HGF Activator

HIST1H1: Histone Cluster 1 H1 Family Member C ( H1F2)

HIST1H1D: Histone Cluster 1 H1 Family Member D ( H1F3)

HIST1H4A: Histone Cluster 1 H4 Family Member A ( H4FA )

HIST1H4B: Histone Cluster 1 H4 Family Member B ( H4FI )

HIST1H4I: Histone Cluster 1 H4 Family Member I (H4FM )

HIST1H4J: Histone Cluster 1 H4 Family Member J ( H4FE )

HIST1H4K: Histone Cluster 1 H4 Family Member K ( H4FD )

HMGCS2: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2

HMOX1: Heme Oxygenase 1

HNRNPD: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D ( AUF1; HNRPD )

HOTAIRM1: HOXA Transcript Antisense RNA, Myeloid-Specific 1

HSPA1A: Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A

HSPA1B: Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1B

IFI202B: interferon activated gene 202B ( p202; Ifi202 )

IFI27: Interferon Alpha Inducible Protein 27

IGFBP2: Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2 (IBP2)

IGTP: interferon gamma induced GTPase ( Irgm3; AW558444 )

IIGP1: interferon inducible GTPase 1 ( Iigp; Irga6 )

IQGAP3: IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 3

IRGM2: immunity-related GTPase family M member 2 ( GTPI; Irgp2 )

KCNQ5: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 5

KCNS2: Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily S Member 2

KCNS3: Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily S Member 3

KCTD1: Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 1 ( C18orf5 )

KL: Klotho

LGALS3: Galectin 3 ( LGALS2 )

LGI2: Leucine Rich Repeat LGI Family Member 2

LIN7B: Lin-7 Homolog B, Crumbs Cell Polarity Complex Component

LMTK3: Lemur Tyrosine Kinase 3

LOX: Lysyl Oxidase

LRP2: LDL Receptor Related Protein 2

LRRC4        Leucine Rich Repeat Containing 4

LSM11: LSM11, U7 Small Nuclear RNA Associated  
LTB: Lymphotoxin Beta ( TNFC )  
LTBP2: Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2  
LTF: Lactotransferrin  
LUM: Lumican ( LDC)  
MAP1A: Microtubule Associated Protein 1A ( MAP1L )  
MEOX1: Mesenchyme Homeobox 1  
MEST: Mesoderm Specific Transcript  
MET: MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase  
METTL11B: Methyltransferase Like 11B ( C1orf184 )  
MFSD4A: Major Facilitator Superfamily Domain Containing 4A ( MFSD4 )  
MIR125B-1: microRNA 125b-1 ( MIRN125B1; mir-125b-1 )  
MIR133A-1: MIRN133A1; mir-133a-1 ( MIRN133A1; mir-133a-1 )  
MIR133A-2: microRNA 133a-2 ( MIRN133A2; mir-133a-2 )  
MIR149: microRNA 149 ( MIRN149; mir-149 )  
MIR1839: microRNA 1839 ( mir-1839; mmu-mir-1839 )  
MIR1961: microRNA 1961 ( mmu-mir-1961 )  
MIR22: microRNA 22 ( MIRN22; miR-22; hsa-mir-22 )  
MIR30B: MicroRNA 30b ( MIRN30B )  
MIR30C-1: MicroRNA 30c-1 ( MIRN30C1 )  
MIR3107: microRNA 3107 ( mir-486b; mmu-mir-3107 )  
MIR320: microRNA 320 ( Mirn320; mir-320 )  
MIR345: MicroRNA 345 ( MIRN345 )  
MIR378A: MicroRNA 378a ( MIRN378 MIR378 )  
MIR5100: MicroRNA 5100  
MIR5107: microRNA 5107 ( mir-5107; mu-mir-5107 )  
MIR5126: microRNA 5126 ( mir-5126; mu-mir-5126 )  
MIR5132: microRNA 5132 ( rno-mir-5132 )  
MIR568: MicroRNA 568 ( MIRN568 )  
MIR6236: microRNA 6236 ( Gm27547; mmu-mir-6236 )  
MIR6538: microRNA 6538 ( Gm27439; mmu-mir-6538 )  
MIR684-1: MicroRNA 6841  
MIR7005: microRNA 7005 ( Gm27835; mmu-mir-7005 )

MIR7051: microRNA 7051 (Gm27685; mmu-mir-7051)  
MIR7654: microRNA 7654 ( Gm27748; mmu-mir-7654 )  
MIR99A: MicroRNA 99a ( MIRN99A )  
MMP12: Matrix Metalloproteinase 12  
MRM1: Mitochondrial RRNA Methyltransferase 1  
MROH6: Maestro Heat Like Repeat Family Member 6 ( C8orf73 )  
MROH7: Maestro Heat Like Repeat Family Member 7 ( C1orf175; HEATR8 )  
MT2: Metallothionein 2A ( MT2 )  
MTCP1: Mature T-Cell Proliferation 1  
MTM1: Myotubularin 1  
MUC5B: Mucin 5B, Oligomeric Mucus/Gel-Forming ( MUC5 )  
MYC: MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor  
MYL9: Myosin Light Chain 9  
NEFH: Neurofilament Heavy  
NLRC5: NLR Family CARD Domain Containing 5  
NMRK2: Nicotinamide Riboside Kinase 2  
NNAT: Neuronatin  
NPPB: Natriuretic Peptide B  
NXPH4: Neurexophilin 4  
OAS1B: oligoadenylate synthetase 1B ( L1; Flv )  
OLFR1033: olfactory receptor 1033  
OVOL2: ovo like zinc finger 2 ( CHED; CHED1 )  
P4HA3: Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 3  
PACSIN1: Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 1  
PAH: phenylalanine hydroxylase ( PH; PKU )  
PAX7: Paired Box 7  
PCBD1: Pterin-4 Alpha-Carbinolamine Dehydratase 1 ( DCOH PCBD )  
PCK1: Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1  
PDK4: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4  
PIANP: PILR Alpha Associated Neural Protein ( C12orf53)  
PIEZO2: Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 2  
PIGR: Polymeric Immunoglobulin Receptor  
PIM1: Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase 9 PIM)

PLAC9A: Placenta Specific 9a ( Plac9 )  
PLAC9B: placenta specific 9b ( Gm10393 )  
POSTN: Periostin  
POU3F1: POU Class 3 Homeobox 1( OTF6 )  
PPP1R1B: Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 1B  
PRC1: Protein Regulator Of Cytokinesis 1  
PTGFR: Prostaglandin F Receptor  
PTPRN2: Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type N2  
REG3G: Regenerating Family Member 3 Gamma  
RNF149: Ring Finger Protein 149  
RNF26: Ring Finger Protein 26  
RPRL3: ribonuclease P RNA-like 3 ( RPRH4; Rmrp4 )  
RTN4R: Reticulon 4 Receptor  
RTP2: Receptor Transporter Protein 2  
RUNX3: Runt Related Transcription Factor 3 ( CBFA3 )  
SCARNA17: Small Cajal Body-Specific RNA 17  
SCD3: stearyl-coenzyme A desaturase 3 ( 4930513N16Rik)  
SCGB1A1: Secretoglobin Family 1A Member 1 ( UGB)  
SCGB3A1: Secretoglobin Family 3A Member 1  
SCGB3A2: Secretoglobin Family 3A Member 2  
SCML2: Sex Comb On Midleg Like 2  
SEC14L3: SEC14 Like Lipid Binding 3  
SEMA6C: Semaphorin 6C  
SERP2: Stress Associated Endoplasmic Reticulum Protein Family Member 2 ( C13orf21 )  
SERPINA1A: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A ( PI1; Aat2; )  
SERPINA1B: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member B ( PI1; Aat2; )  
SERPINA1C: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1C ( Pi3; Pi6; Wap3)  
SERPINA3F: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F ( 2A1; BC049975 )

SERPINA3H: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3H ( 6C28; Spi2 )

SERPINA3I: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3I ( 2B2; Gm6930; EG628900 )

SERPINB1A: serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a ( EI; EIA; LEI )

SERPINE1: Serpin Family E Member 1

SFTPA1: Surfactant Protein A1 ( SFTP1 )

SLC25A28: Solute Carrier Family 25 Member 28

SLC25A29: Solute Carrier Family 25 Member 29 ( C14orf69 )

SLC5A1: Solute Carrier Family 5 Member 1 ( SGLT1)

SMIM3: Small Integral Membrane Protein 3 (C5orf62)

SNORA52: Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 52

SNORD15A: Small Nucleolar RNA, C/D Box 15A ( RNU15A)

SNORD1A: Small Nucleolar RNA, C/D Box 1A

SNORD66: Small Nucleolar RNA, C/D Box 66

SNORD88A: Small Nucleolar RNA, C/D Box 88A

SOX1: SRY-Box 1

SOX21: SRY-Box 21

SPINT1: Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 1

SPON2: Spondin 2 ( DIL1; DIL-1; MINDIN )

SPP1: secreted phosphoprotein 1 ( OPN; BNSP )

SPRN: Shadow Of Prion Protein

SPRR1A: small proline rich protein 1A ( SPRK)

STAG3: Stromal Antigen 3

STAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

SUSD3: Sushi Domain Containing 3

TAF4: TATA-Box Binding Protein Associated Factor 4 ( TAF4A; TAF2C1;TAF2C )

TAGLN3: Transgelin 3

TAP1: Transporter 1, ATP Binding Cassette Subfamily B Member (ABCB2 )

TBR1: T-Box, Brain 1

TDRD9: Tudor Domain Containing 9 ( C14orf75)

TEAD3: TEA Domain Transcription Factor 3 ( TEAD5)

THBS4: Thrombospondin 4  
TNC: Tenascin C ( HXB; DFNA56 )  
TRIM67: Tripartite Motif Containing 67  
TRMT61B: TRNA Methyltransferase 61B  
TROAP: Trophinin Associated Protein  
TTC9B: Tetratricopeptide Repeat Domain 9B  
TUBB3: Tubulin Beta 3 Class III ( FEOM3 )  
UCP1: Uncoupling Protein 1 ( UCP )  
UCP3: uncoupling protein 3 ( SLC25A9 )  
VSX2: Visual System Homeobox 2 ( HOX10 CHX10 )  
WISP1: WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 1  
WTAP: WT1 Associated Protein  
XLR4A: X-linked lymphocyte-regulated 4A  
ZDBF2: Zinc Finger DBF-Type Containing 2  
ZFP131: zinc finger protein 131 ( Znf131; AW558871; 2610109I01Rik )  
ZFP654: zinc finger protein 654 ( 433036; Gm5488; Znf654 )  
ZFP975: zinc finger protein 975 ( Gm5595; mszf88; EG434179 )