ANDREI ROZANSKI

**EFEITOS DO HORMÔNIO TIROIDIANO NA EXPRESSÃO
DIFERENCIAL DE GENES NO CORAÇÃO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2012**

ANDREI ROZANSKI

**EFEITOS DO HORMÔNIO TIROIDIANO NA EXPRESSÃO DIFERENCIAL
DE GENES NO CORAÇÃO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

Versão original

**São Paulo
2012**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rozanski, Andrei.

Efeitos do hormônio tireoideano na expressão diferencial de genes
no coração de ratos / Andrei Rozanski. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Anselmo Sigari Moriscot.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.
Linha de pesquisa: Hipertrofia cardíaca induzida pelo T3

Versão do título para o inglês: Thyroid hormone effects on differential
expression of rat heart genes.

1. Hormônios Tireoideanos 2. Coração 3. Expressão Gênica
4. Hipertireoidismo 5. Algoritmos para processamento 6. Hipertrofia
ventricular esquerda I. Moriscot, Anselmo Sigari II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Biologia Celular e
Tecidual III. Título.

ICB/SBIB097/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andrei Rozanski.

Título da Dissertação: Efeitos do hormônio tireoidiano na expressão diferencial de genes no coração de ratos.

Orientador(a): Anselmo Sigari Moriscot.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEEA.015/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 168/05/CEEA, datado de 23.02.05 e por solicitação do Prof. Dr. *Anselmo Sigari Moriscot*, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos **Gracielle Vieira Ramos** e **Andrei Rozanski** ao Projeto de Pesquisa "*Aspectos estruturais e moleculares da plasticidade muscular*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 05 de abril de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

A Deus pela confiança,
À minha doce esposa pelo amor,
Aos meus pais por regar o sonho,
Ao meu irmão pela inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot pela orientação e ensinamentos preciosos.

À doce Thais Natal Rozanski pela dedicação, apoio, incentivo e encorajamento.

Aos meus amados pais Aristeu e Amélia pelos seus exemplos, pelas suas presenças e por investirem suas vidas.

Ao meu irmão Aristeu pela presença, paciência e incansável auxílio na caminhada.

A Delsio e Elvira pelas palavras e apoio preciosos.

A Marcelo e Lícia por me ajudarem a ousar e prosseguir.

A Gracielle, Igor e JP, pelo auxílio na execução deste trabalho e pelo privilégio de conviver, trabalhar e rir.

Às professoras Chao Yun Irene Yan, Eugênia Costanzi Strauss e Marilene Hohmuth Lopes pelos valiosos ensinamentos.

Ao Alex, Marcelo Leal e Antônio, pelo apoio no início deste trabalho.

A todos os docentes, alunos e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Ao Laboratório de Genética do Incor-HCFMUSP pelas contribuições.

“The greatest love that anyone could ever know
That overcame the cross and grave to find my soul
And till I see You face to face and
grace amazing takes me home
I’ll trust in You.”

Joel Houston e Jadwin Gillies

RESUMO

Rozanski A. Efeitos do hormônio tireoideano na expressão diferencial de genes no coração de ratos.[dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

O hormônio tireoideano (T3) desempenha papel fundamental na manutenção das funções celulares em especial o metabolismo e consumo de oxigênio. No coração, doses elevadas de T3 induzem ao inotropismo e cronotropismo positivos. Todavia, por um tempo prolongado, o hipertireoidismo promove hipertrofia cardíaca. Os mecanismos envolvidos nestes processos necessitam de maior esclarecimento. Neste estudo analisamos dados obtidos a partir de um ensaio de *microarray* realizado com tecido cardíaco de ratos submetidos a hipertireoidismo experimental. Observamos que entre os algoritmos utilizados para o pré-processamento dos dados brutos, o MAS5 foi mais eficiente na predição de genes com responsividade conhecida ao T3. Identificamos os filamentos grossos, banda M e discos intercalares como *hotspots* de atuação do T3. Dirigimos nossa atenção para um componente de discos intercalares, a T-Caderina. O T3 foi capaz de provocar aumento transitório nos níveis de mRNA avaliado por RT-qPCR (2,7 vezes em 24 horas *versus* controle, $p < 0,05$) e proteicos (2,4 vezes em 24 horas *versus* controle, $p < 0,05$) avaliado por *Western blot*. Com auxílio de imunofluorescência, obtivemos imagens sugestivas de marcação para T-Caderina próxima à membrana plasmática de cardiomiócitos principalmente em controle e sete dias. Com 24 horas de tratamento com T3, observamos aumento global e difuso de marcação para T-Caderina. Em todos os tempos da análise, ficou evidente a marcação nuclear para T-Caderina. Com base nos achados deste estudo, é possível que a caderina possa estar envolvida no processo de hipertrofia cardíaca. Todavia, para verificar essa possibilidade, são necessários mais estudos.

Palavras-chave: Hormônio Tireoideano. Coração. Expressão Gênica. Hipertireoidismo. Algoritmos para processamento.

ABSTRACT

Rozanski A. Thyroid hormone effects on differential expression of rat heart genes. [dissertation (Masters thesis in Cell and Tissue)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Thyroid Hormone (T3) plays a key role in differentiation, metabolism and growth. Healthy cellular functioning depends on normal levels of T3 in almost all tissues and organs. Hyperthyroidism, at short-term leads to enhanced inotropism and chronotropism. However, cardiac hypertrophy is observed in response to long-term hyperthyroidism. The molecular basis of cardiac hypertrophy induced by hyperthyroidism remains to be determined. Using microarray approach, we analyzed the gene expression profile of heart tissue from rats submitted to hyperthyroidism by daily intraperitoneal injection of T3. We find MAS5 among five algorithms to be the best for our low-level analysis. MAS5 provided best results regarding prediction of well-known T3 modulated genes. Sarcomeric hotspots such as thick-filaments, M-band and intercalated disks under T3 treatment were identified. During intercalated disks hotspot analysis, T-Cadherin called out our attention. We observed that T3 induced transient mRNA (2.7 fold induction - 24 hours versus control, $p < 0.05$) and protein (2.4 fold induction - 24 hours versus control, $p < 0.05$) levels of T-Cadherin. Immunofluorescence analysis allowed us to visualize T-Cadherin next to plasmatic membrane mainly on control and seven days groups. On 24 hours group, we observed diffuse cytoplasmic T-Cadherin staining. Another interesting aspect of immunofluorescence analysis were T-Cadherin nuclear staining in all groups. Moreover, T-Cadherin possibly play role in T3-induced cardiac hypertrophy. However further studies are needed to verify this possibility.

Keywords: Thyroid Hormone. Heart. Sarcomere. T-Cadherin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Script</i> para filtragem de dados brutos	26
Figura 2 - Fluxograma para seleção de <i>probe sets</i>	27
Figura 3 - <i>Script</i> para extração <i>probe sets</i> de interesse	28
Figura 4 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo GCRMA	37
Figura 5 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo RMA	38
Figura 6 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo PLIER	39
Figura 7 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo dChip	40
Figura 8 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo MAS5	41
Figura 9 - Sarcômero - <i>Hotspots</i> relacionados a ação do T3	45
Figura 10 - Expressão da T-Caderina - Níveis de mRNA e proteicos	46
Figura 11 - Imunofluorescência para T-Caderina	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Validação do hipertireoidismo experimental	33
Tabela 2 - Controle de qualidade - Marcadores <i>average background</i> , <i>scale factor</i> e <i>present calls</i>	34
Tabela 3 - Controle de qualidade - Marcadores beta-actina e GAPDH	35
Tabela 4 - Controle de qualidade - Marcadores BioB, BioC, BioD e CreX	35
Tabela 5 - Comparação de algoritmos - GCRMA, RMA, PLIER, dChip, MAS5	42
Tabela 6 - Comparação de algoritmos - Genes com responsividade ao T3 descrita . . .	43
Tabela 7 - <i>Probe sets</i> relativos a genes associados a proteínas sarcoméricas	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T3: 3,5,3'-triiidotirionina

GCRMA: *GeneChip RMA*

RMA: *Robust Multi-array Average*

PLIER: *Probe Logarithmic Intensity Error*

dChip: *DNA-Chip Analyzer*

MAS5: *MicroArray Suite 5.0*

RT-qPCR: *Reação em cadeia da polimerase em tempo real*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Considerações iniciais	16
1.2 Revisão de literatura	16
1.2.1 <i>Hormônio tireoideano</i>	16
1.2.2 <i>Atuação do T3 nos tecidos e sistemas</i>	17
1.2.3 <i>O T3 e o sistema cardiovascular</i>	18
1.2.4 <i>Potencial terapêutico do T3</i>	18
1.2.5 <i>Microarray</i>	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Animais e procedimentos	24
3.2 Análise dos dados obtidos no <i>microarray</i>	25
3.2.1 <i>Controle de qualidade</i>	25
3.2.2 <i>Comparação de algoritmos de pré-processamento de dados</i>	25
3.2.3 <i>Filtragem dos dados brutos</i>	25
3.2.4 <i>Seleção de probe sets de interesse</i>	25
3.2.5 <i>Extração de probe sets de interesse</i>	27
3.2.6 <i>Cálculo do fold change</i>	29
3.3 Anticorpos	29
3.4 Imunofluorescência e aquisição de imagem	29
3.5 Extração de RNA e RT-qPCR	29
3.6 Análise de expressão proteica	30
3.7 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Validação do hipertireoidismo experimental	33
4.2 Controle de qualidade do ensaio de <i>microarray</i>	33

4.3 Comparação de algoritmos de pré-processamento de dados - <i>microarray</i>	36
4.4 Seleção de <i>probesets</i> de interesse	42
4.5 Impacto do T3 no sarcômero cardíaco - Identificação de <i>hotspots</i>	43
4.6 T-Caderina	44
5 DISCUSSÃO	48
5.1 Controle de qualidade do ensaio de <i>microarray</i>	49
5.2 Algoritmos para pré-processamento dos dados brutos	51
5.3 Impacto do T3 no tecido cardíaco	54
5.4 T-Caderina	55
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	62

1.1 Considerações iniciais

Processos biológicos fundamentais como desenvolvimento, diferenciação e metabolismo sofrem influência do Hormônio Tireoideano (T3). Desta forma, todos os tecidos necessitam do T3 para manutenção das funções celulares, modulação do metabolismo e consumo de oxigênio^{1,2}, entre outros processos.

No sistema cardiovascular, o T3 atua por meio de alteração da expressão de genes alvo, modulação da excitabilidade do sistema de condução cardíaco e alterações hemodinâmicas que influenciam pós-carga cardíaca³. Doses suprafisiológicas de T3 produzem efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos⁴, portanto, um potente cardiotônico com potencial para aplicação terapêutica. Todavia, quando ocorre manutenção do estado hipertiroideo de forma crônica, acontece a hipertrofia cardíaca com comprometimento funcional podendo levar à insuficiência cardíaca⁵.

Os mecanismos moleculares envolvidos na atuação do T3 no tecido muscular cardíaco ainda não são completamente compreendidos. O estudo destes mecanismos é de grande importância pois além de auxiliar no processo de compreensão dos mecanismos de ação do T3, em geral, podem de alguma forma contribuir para exploração dos efeitos terapêuticos deste hormônio.

Neste trabalho, estudamos dados provenientes de um ensaio de análise de expressão gênica em larga escala, o *microarray* para determinação do perfil de expressão gênica em cardiomiócitos de ratos submetidos ao hipertiroidismo experimentalmente induzido.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 *Hormônio tireoideano*

O T3 atua de maneira importante no desenvolvimento, diferenciação e metabolismo e se faz necessário em todos os tecidos para a manutenção das funções celulares, sobretudo no consumo de oxigênio e taxa metabólica^{1,2}.

O T3 apresenta diferentes mecanismos de ação porém o de maior importância biológica e mais bem estudado, ocorre pela ligação direta do T3 a receptores nucleares, influenciando a expressão de genes responsivos ao hormônio. Estes receptores nucleares, TRs, são membros de uma família de fatores de transcrição associados ao núcleo assim como os receptores de

hormônios esteróides, de ácido retinóico e de vitamina D⁶. Tratam-se de receptores de alta afinidade e que são codificados por dois genes: O gene TR α que codifica as variantes TR α 1 e TR α 2 e localiza-se no cromossomo 17; o gene TR β que se encontra no cromossomo 3 e codifica as variantes TR β 1, TR β 2, TR β 3^{1,6}.

O T3 penetra a célula em parte devido a um mecanismo de transporte ainda relativamente pouco descrito⁷. O passo seguinte é a entrada do T3 para o núcleo e consequente ligação nos TRs, que já estão previamente associados aos elementos responsivos ao T3 (TREs). O complexo T3/TRE é capaz de modular o ritmo de transcrição dos genes alvo³.

1.2.2 *Atuação do T3 nos tecidos e sistemas*

O tecido nervoso é um exemplo de sítio de atuação do T3, em especial o cérebro. O T3 atua nos processos de migração neuronal, diferenciação, mielinização e formação de sinapses, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento cerebral⁸.

Além de influenciar o desenvolvimento do tecido nervoso, aspectos do metabolismo de gordura como síntese, mobilização e em especial a degradação sofrem influência direta do T3. Sob influência do hormônio, os lipídeos são mobilizados do tecido adiposo para o plasma e oxidados de forma acelerada nas células. Embora o T3 aumente os ácidos graxos livres no plasma, em indivíduos com hipertireoidismo, observa-se redução de triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol tanto livres quanto no tecido adiposo. Um dos mecanismos pelo qual ocorre esta redução é o aumento da excreção de colesterol na bile e consequentemente nas fezes^{9,4}.

O tecido ósseo, de forma semelhante, sofre influência direta do T3. O hormônio influencia o crescimento e desenvolvimento ósseo em crianças e o equilíbrio entre reabsorção e deposição de cálcio em adultos¹⁰.

Outro tecido que sofre influência do T3 de forma importante é o muscular. O T3 desempenha um papel fundamental na diferenciação de características de contração e bioquímicas. Por exemplo, no tecido muscular esquelético, a diferenciação da isoforma de cadeia pesada de miosina (MHC) fetal em isoforma adulta¹¹ ocorre sob influência do T3.

O sistema cardiovascular e em especial o coração também sofrem influência do T3, o que será visto em maiores detalhes a seguir.

1.2.3 *O T3 e o sistema cardiovascular*

O T3 exerce importante efeito sobre o sistema cardiovascular por três diferentes vias: 1) ligação direta com receptores de T3 nucleares influenciando a expressão de genes, 2) alterações de sensibilidade às catecolaminas e 3) alterações hemodinâmicas periféricas que provocam alteração de pós-carga, influenciando na contração do músculo cardíaco³.

Doses suprafsiológicas de T3 provocam: alterações na contração cardíaca por meio de potencialização da frequência e força de contração, e de aumento na velocidade de relaxamento; alteração na função eletrofisiológica via estimulação de todo sistema de excitação-condução; mudanças na estrutura cardíaca devido ao desenvolvimento de hipertrofia caso haja manutenção do estado hipertiroideo; mudanças no tônus vascular; e alteração de consumo de oxigênio^{4,3,5,12,13,14}.

1.2.4 *Potencial terapêutico do T3*

Dentre os efeitos associados ao T3, vários deles têm potencial terapêutico. Pode-se observar vários exemplos do impacto do T3 em doses suprafsiológicas e que são motivo de pesquisa. Em relação ao metabolismo de lípidos, o T3 promove redução dos níveis plasmáticos de colesterol e de triglicerídeos⁹. O hormônio está associado à redução de peso corporal de forma significativa e rápida¹⁵. No sistema cardiovascular, atua como agente inotrópico positivo em pacientes no pós-operatório de cirurgia cardíaca¹.

Efeitos benéficos são observados com doses suprafsiológicas de T3, todavia ocorrem também efeitos não desejáveis como: osteopenia¹⁰; sarcopenia¹⁶ e aumento na proporção de isoformas de cadeia pesada de miosina IIa/IIx no músculo esquelético^{17,18}; arritmogênese e hipertrofia cardíaca concêntrica^{19,5}.

Embora alguns efeitos do T3 no tecido muscular cardíaco sejam conhecidos, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são completamente compreendidos. Desta forma, analisar os efeitos do T3 na expressão dos genes relacionados às proteínas sarcoméricas cardíacas, pode auxiliar na construção do conhecimento necessário para a compreensão dos referidos mecanismos.

Para estudar tais efeitos, levando-se em consideração a importância do efeito genômico do T3, optou-se por utilizar a análise da expressão gênica como ponto de partida. Dentre

as técnicas utilizadas para análise de expressão gênica, optou-se pelo ensaio de *microarray* tendo-se em vista a possibilidade de obtenção de um perfil de expressão gênica bastante abrangente.

1.2.5 *Microarray*

O ensaio de *microarray* é uma técnica poderosa que permite analisar níveis de expressão de uma grande quantidade de genes simultaneamente.

Seu desenvolvimento se deu a partir do conceito aplicado no *Southern blot*. Os primeiros relatos da aplicação do *microarray* datam do início dos anos 80²⁰. Todavia, foi necessária a aplicação de tempo e recursos para o desenvolvimento da técnica. No ano de 1997, houve a publicação da utilização do primeiro *chip* com poder de análise do genoma eucarioto completo - *Saccharomyces cerevisiae*²¹.

De maneira geral, atualmente, o ensaio pode ser resumido nestes passos: marcação das amostras com fluoróforos; hibridização no *chip*; lavagem do *chip*; aquisição da imagem; processamento de imagem obtida com auxílio de programas de computador que convertem sinais luminosos em valores numéricos.

Dentre as plataformas disponíveis, o GeneChip da Affymetrix se destaca por sua popularidade e qualidade. Trata-se de um *chip* composto de um grande número de *probe sets*, que individualmente representam um transcrito expresso. Cada *probe set* é composto de 10 pares de *probes*. Os pares de *probes* são compostos por um oligonucleotídeo que é complementar às subsequências de transcrito de mRNA para determinado gene, *perfect match* - PM, e outro oligonucleotídeo que tem uma de suas bases modificadas para o complemento de Watson-Crick, aquela que fica exatamente no meio da sequência. Tem como denominação *mismatch* - MM, e como objetivo fornecer informações sobre ligações inespecíficas^{22,23}. Para que seja inferido o nível de expressão de determinado gene, faz-se necessário transformar a intensidade de luz emitida por determinada *probe set*. Para viabilizar esse processo, são aplicados programas de computador que com a utilização de algoritmos matemáticos executam essa complicada tarefa.

Trata-se portanto de um método robusto, mas que também está sujeito a variações das mais diferentes origens. Estas variações podem advir do preparo das amostras a serem hibridizadas, hibridização, processo de aquisição de imagem e finalmente pré-processamento dos

dados brutos por meio de programas de computador. Cabe também ressaltar que se trata de uma ferramenta metodológica de descoberta, que dependendo dos genes diferencialmente expressos identificados pode gerar subprojetos com nível maior ou menor de convergência.

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do hormônio tireoidiano na expressão diferencial de genes no coração de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Aplicação de programas para normalização e modelagem dos dados brutos obtidos em um ensaio de *microarray* previamente realizado em nosso laboratório;

Aplicação de programas para filtragem dos genes diferencialmente expressos no banco de dados obtidos a partir da normalização e modelagem dos dados brutos;

A partir dos dados obtidos da filtragem dos genes diferencialmente expressos, realizar estudos de aprofundamento para genes de alta responsividade ou de alta relevância.

Para este estudo, foram utilizados os dados brutos obtidos de experimento de *microarray* realizado no Laboratório de Plasticidade Muscular do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Portanto, o tratamento dos animais, validação de hipertireoidismo experimental e ensaio de *microarray*, embora descritos de forma breve, foram realizados previamente ao início deste estudo. Alguns dos detalhes deste experimento estão abaixo descritos.

3.1 Animais e procedimentos

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP, de acordo com os Princípios de Ética em Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (n=24), com peso entre 200 a 250 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e acondicionados no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas I da USP.

Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: doze horas de ciclo claro/escuro e temperatura de 24 °C), com livre acesso a água e ração peletizada. Os animais, estudados de forma simultânea e com a mesma idade, foram randomizados nos grupos: controle e hipertireoidismo induzido experimentalmente por doze, 24 horas e sete dias. O tratamento com T3 foi feito por meio de injeções intra-peritoniais diárias de 0.100 mg/kg de massa corpórea de 3,5,3'-triiodotironina (T3) por doze, 24 horas e sete dias. Em seguida, os animais foram sacrificados por meio de decapitação. Tecido cardíaco foi removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para posterior análise.

Foram realizados cortes histológicos no tecido cardíaco com espessura de sete μm a -25 °C em criostato (IEC Minotome, Needham Heights, MA) e dispostos em lâminas.

Foram utilizados três ratos (n=3) para cada tempo, portanto um total de doze *chips*.

Os passos seguintes para a confecção do ensaio de *microarray* foram tomados de acordo com as orientações da Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). O *chip* utilizado foi RA230A.

3.2 Análise dos dados obtidos no *microarray*

3.2.1 *Controle de qualidade*

O processamento dos dados obtidos do *microarray* foi feito com auxílio dos pacotes “*affy*” e para controle de qualidade “*simpleaffy*”. Estes pacotes são implementados pela iniciativa Bioconductor²⁴ em um programa para cálculos matemáticos e de estatística denominado R²⁵.

3.2.2 *Comparação de algoritmos de pré-processamento de dados*

Existem relatos^{26,27} de que, de acordo com o algoritmo utilizado para processamento dos dados brutos obtidos no ensaio de *micrarray*, diferentes resultados podem ser obtidos. Desta forma, tendo-se em vista a possibilidade de que o algoritmo escolhido possa produzir variações, optamos por realizar uma comparação entre cinco dos algoritmos que são mais frequentemente utilizados: GCRMA²⁸, RMA²⁹, PLIER³⁰, dChip³¹ e MAS5²³.

Determinamos como critério utilizado para escolha do algoritmo, a capacidade de cada algoritmo em predizer a regulação de expressão de genes sob efeito do T3 já documentada na literatura^{19,5}.

3.2.3 *Filtragem dos dados brutos*

Os valores representativos da expressão dos genes utilizados foram aqueles com valor absoluto de 50 ou mais em pelo menos 25% das amostras. Esta abordagem nos permitiu selecionar valores de expressão mais confiáveis, evitando ruídos em relação ao *background*. Para esse processo, utilizamos um *script* feito em linguagem de programação Perl (Figura 1).

3.2.4 *Seleção de probe sets de interesse*

Diante de uma grande quantidade de dados que são obtidos a partir do ensaio de *microarray*, se fez necessário selecionar estes dados para que seja dado foco em genes de interesse.

Para execução desta tarefa, um levantamento das principais proteínas sarcoméricas foi feito com auxílio de artigo de revisão³². A etapa seguinte consistiu da identificação dos genes que codificam para as proteínas previamente selecionadas. Para isto, o banco de dados GenBank³³ hospedado pela *National Center for Biotechnology Information* foi utilizado. O passo seguinte foi consultar a base de dados da Affymetrix - NetAffx. Nesta base de dados, a partir de um dado gene, obtém-se o(s) *probe set(s)* que representam o referido gene. Desta forma, feitas as aquisições dos *probe sets* de interesse, procedeu-se com a filtragem dos dados. Todo

Figura 1 - *Script* para filtragem de dados brutos

```
#Código utilizado para filtragem de genes com valor absoluto superior a 50 em pelo menos 1 dos tempos;

/usr/bin/perl -w
use strict;
use warnings;\
open('pouco_expressos_50','>>pouco_expressos_50.csv'); #Cria arquivo de saída com lista de genes que não satisfazem o filtro;

open('expressos_50','>>expressos_acima_50.csv'); #Cria arquivo de saída com lista dos genes que satisfazem o filtro;

my $ct=0;
open ('FH',"heart.csv"); # Abre o arquivo com dados brutos obtidos a partir do pre processamento;
{while (<FH>){}
    chomp;
    $ct++;
    $_=~s/"/"/g; # Estabelece critério para a separação das colunas presentes na planilha de dados brutos;
    (my $probe, my $ctrl, my $twelve, my $twenty, my $seven)=split(/\,/,$_);
    $_=~s/"/"/g;
    if(($ctrl < 50) and ($twelve < 50) and ($twenty < 50) and ($seven < 50)) # Estabelece critérios de filtragem;

        print pouco_expressos_50 "$_\n";
    }

    else{
        print expressos_50 "$_\n";
    }
}
close (pouco_expressos_50);
close (expressos_50);
close (FH);
```

Fonte: Rozanski (2012)

este processo está representado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma para seleção de *probe sets*

Fonte: Rozanski (2012)

3.2.5 Extração de *probe sets* de interesse

Com os dados filtrados, o passo seguinte foi extrair *probe sets* de interesse. Para tanto, utilizamos *probe sets* selecionados anteriormente e um *script* em *bash* (Figura 3).

Figura 3 - *Script para extração probe sets de interesse*

```
#!/bin/bash
```

```
for probe in 1369928_at 1370856_at 1374352_at 1374353_x_at 1398835_at 1398836_s_at 1371327_a_at 1386869_at
1369541_at 1372407_at 1372500_at 1387370_at 1388718_at 1393418_at 1369869_at 1388460_at 1392900_at 1399043_at
1399091_at 1368724_a_at 1368838_at 1370287_a_at 1370288_a_at 1370513_at 1371240_at 1371241_x_at 1371653_at 1372219_at
1367592_at 1367964_at 1370412_at 1371247_at 1371339_at 1371354_at 1372195_at 1386873_at 1386931_at 1390061_at
1386996_at 1371075_at 1368415_at 1370900_at 1368093_at 1387049_at 1398248_s_at 1367928_at 1386993_at 1371053_at
1370971_at 1388139_at 1367572_at 1371315_at 1388298_at 1370033_at 1388200_at 1388293_at 1368966_at 1373697_at
1374248_at 1376968_at 1388597_at 1389236_at 1368342_at 1372782_a_at 1377498_at 1398306_at 1373130_at 1374895_at
1387804_at 1367462_at 1371088_at 1373111_at 1376287_at 1387991_at 1390566_a_at 1367626_at 1388349_at 1381575_at
1398294_at 1367962_at 1369942_at 1389189_at 1372595_at 1390049_at 1372107_at 1369313_at 1371951_at 1372569_at
1368703_at 1370347_at 1372037_at 1370291_at 1371554_at 1371382_at 1373286_at 1375089_at 1388401_at 1388496_at
1368761_at 1369152_at 1370368_at 1372982_at 1373924_at 1374064_at 1374235_at 1388686_at 1389066_at 1390573_a_at
1374088_at 1374951_at 1390139_a_at 1368928_at 1367600_at 1367574_at 1386948_at 1372658_at 1376604_at 1370017_at
1367579_a_at 1369901_at 1370290_at 1370809_at 1371390_at 1371542_at 1371618_s_at 1371885_at 1372660_at 1373408_at
1373718_at 1374887_at 1376100_at 1377420_at 1387892_at 1388028_at 1388131_at 1388557_at 1388869_at 1388959_at
1389108_at 1389770_at 1390046_at 1390311_at 1390766_at 1398365_at 1367675_at 1367716_at 1367921_at 1368416_at
1368612_at 1368819_at 1369038_at 1370526_at 1370802_at 1370937_a_at 1371067_at 1371106_at 1371185_at 1371186_at
1371214_at 1375730_at 1376481_at 1377182_at 1377995_at 1380600_at 1385354_at 1385665_at 1385854_at 1387135_at
1387144_at 1387256_at 1387346_at 1387777_at 1388046_at 1388240_a_at 1388961_at 1389151_at 1389166_at 1389282_at
1390604_s_at 1398358_a_at 1398395_at 1367812_at 1370264_at 1370838_s_at 1371046_at 1371231_at 1371419_at 1376564_at
1386212_at 1388264_at 1388991_at 1390706_at 1398263_at 1371429_at 1371430_at 1389105_at 1375743_at 1389002_at
1372905_at 1375538_at 1369810_at 1371224_a_at 1371225_at 1371429_at 1371430_at 1372240_at 1374683_at 1374796_at
1387560_a_at 1388261_at 1389105_at 1367888_at 1368472_at 1368642_at 1368956_at 1368970_at 1369224_at 1369425_at
1369733_at 1370490_at 1370657_at 1371018_at 1371068_at 1371921_at 1373067_at 1373089_at 1373102_at 1373470_at
1374266_at 1374910_at 1375284_at 1375719_s_at 1375968_at 1382943_at 1386947_at 1387259_at 1387972_at 1388045_a_at
1388415_at 1388551_at 1388936_at 1389255_at 1389653_at 1389759_at 1390366_at 1390822_at 1398354_at 1371633_at
1373279_at 1375854_at 1383205_at 1387061_at 1388506_at 1386941_at 1368115_at 1369184_at 1369609_at 1370894_at
1372492_at 1373182_at 1374104_at 1375933_at 1376711_at 1377935_at 1387470_at 1388547_at 1390407_at 1390411_at
1367488_at 1367658_at 1367664_at 1367665_at 1368111_at 1368445_at 1369486_at 1369776_a_at 1369777_a_at 1370638_at
1371132_a_at 1371497_at 1371636_at 1371805_at 1371927_at 1372069_at 1372280_at 1372499_at 1372742_at 1373059_at
1373289_at 1373351_at 1373443_a_at 1373483_at 1373619_at 1373685_at 1374526_at 1374595_at 1374657_at 1374694_at
1374989_at 1375196_at 1375212_at 1375277_at 1375747_at 1375975_at 1376003_at 1376030_at 1376245_x_at 1376246_at
1376341_at 1376357_at 1376451_at 1376499_at 1376638_at 1376791_at 1376999_at 1377046_at 1379702_at 1384283_at
1386458_x_at 1387192_at 1387828_at 1389026_at 1389124_at 1389264_at 1389398_at 1389493_at 1389515_at 1390073_at
1390179_at 1390253_at 1390262_a_at 1390441_at 1392019_at 1398410_at 1398432_at 1399008_at;do
```

```
#Define probeset a serem extraídas.
```

```
for archive in in/heart.csv; do # Direciona a busca para o arquivo originário da filtragem
echo -n "$(basename $archive):" >>out/out_heart.csv; grep $probe $archive >>out/out.csv;
#Imprime o resultado da extração dos dados.
```

```
done
```

```
done
```

3.2.6 Cálculo do *fold change*

A variação entre tempos, expressa pelo *fold change* em doze, 24 horas e sete dias em relação ao controle foi calculado para todos os genes. Decidimos por selecionar para posterior análise, genes que apresetaram variação superior a 50% em qualquer tempo da análise (doze, 24 horas e ou sete dias) em relação ao controle.

3.3 Anticorpos

Anticorpos primários utilizados foram: 1) Polyclonal rabbit anti-T-Cadherin (NB100-92444 - Novus Biologicals - Littleton, CO, USA); 2) Polyclonal rabbit anti- α -actinin (NB100-92434 - Novus Biologicals - Littleton, CO, USA).

Os anticorpos secundários utilizados foram 3) AP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (SA00002-2 - ProteinTech Group, Illinois, USA); Cy2 AffiniPure Goat Anti-Rabbit (111-225-047 - Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK).

3.4 Imunofluorescência e aquisição de imagem

Cortes histológicos ventriculares cardíacos de rato foram fixados com paraformaldeído 4% PB (phosphate buffer, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente, bloqueados com glicina 0.1M (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) em PB por 5 min e lavados em Triton X 0.2% - 100/PB (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) por 10 minutos. Em sequência, os cortes foram incubados em anticorpo primário *overnight*, em temperatura ambiente. Após lavagem com PB, aplicado anticorpo secundário por duas horas. As lâminas foram lavadas em PB e montadas com *Vectashield - DAPI* (Vector, Califórnia, USA).

As lâminas foram posteriormente analisadas com auxílio de microscópio (Nikon Eclipse E600, Fukuoka, Japan) acoplado a uma camera de vídeo digital e *software* de aquisição de imagens (Metamorph, Universal Imaging Corporation, Downingtown, USA). Todas as imagens foram obtidas com mesmo ganho e analisadas com auxílio do *GNU Image Manipulation Program - GIMP* (Boston, USA).

3.5 Extração de RNA e RT-qPCR

A extração do RNA das amostras de ventrículo esquerdo foi realizada com auxílio de Trizol (Invitrogen, California, USA). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g do RNA total utilizando-se o kit SuperScript II Kit (Invitrogen, California, USA) e *primers* oligoDT de

acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados para T-Cadherina foram (*Forward*- AAGGGTCACCCACAGGGACCAC, *Reverse* - AGGAGACGGCTTGTTCAGGCGT), Actina-beta (*Forward*- AGTTCGCCATGGATGACGAT , *Reverse* - AAGCCGGCCTTG-CACAT). Os *primers* foram desenhados com auxílio do *software* PerlPrimer³⁴. Todos *primers* foram sintetizados pela IDT (Iowa, USA). A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada no Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) com a utilização de *SYBR Green* (Applied Biosystems, Melbourne, Australia). As condições de ciclagem foram 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos.

CT ou limiar de ciclagem em que pode ser notado alteração na fluorescência, indica a quantidade de DNA complementar (DNAC) presente nas amostras, e conseqüentemente, os níveis de RNA mensageiro (RNAm) presentes na reação. A expressão gênica foi calculada de acordo com descrição previamente descrita³⁵.

3.6 Análise de expressão proteica

Amostras de ventrículo esquerdo foram homogenizados com tampão RIPA 2.5x. Para cada 1 grama de tecido, foram utilizados 10 ml de tampão (100mM KCl, 10mM HEPES, 3mM MgCl₂, 5mM EDTA, 10% Glicerol, 1mMDTT, 10% SDS e 0,1 ml de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Após a homogenização, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante coletado e a concentração proteica foi determinada por meio da análise de Bradford (Bio-Rad, California, EUA) utilizando-se o soro bovino como referência. Quantidades iguais de proteína (25µg) foram utilizadas para eletroforese em gel SDS 12%. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau Red (Biorad, California, EUA) para observação das bandas na membrana. As membranas foram incubadas com anticorpo policlonal, *rabbit*, para T-Cadherina (1:1000) a 4 °C *overnight*. O anticorpo secundário foi então aplicado por uma hora. Após isso, as membranas foram lavadas com tampão de detecção (1M TRIS, 1M NaCl, 100Mm MgCl₂, pH9,5). Para a revelação foi utilizada solução de tampão de detecção e NBT/BCIP (Roche, Mannheim, Germany).

3.7 Análise estatística

Para análise de variância, foi utilizado o teste ANOVA One-way seguido do teste Tukey de múltiplas comparações. Para todas análises, $p < 0.05$ foi considerado significativo. Todos resultados são apresentados em forma de média desvio padrão. Para análise estatística, foi utilizado o *software* GraphPad InStat Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.1 Validação do hipertireoidismo experimental

Após o tratamento dos ratos com T3 de acordo com descrito em Material e Métodos, foram realizados ensaios para validação do hipertireoidismo experimental. Dosagem dos níveis séricos de T4 bem como determinação da massa cardíaca corrigida pelo comprimento naso-caudal estão caracterizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Validação do hipertireoidismo experimental

Grupos	T4(nmol/l)	MC(mg)	MC/NC(mg/cm)
Controle	44,2±13,6	840,5±40,1	40,5±1,6
T3-12h	33,2±10,3	829,1±61,1	40,2±3,2
T3-24h	27,9±9,3*	806,1±66,6	39,3±2,4
T3-7d	4,1±0,5*	956,3±74,1*	45,2±4*

Avaliação dos níveis séricos de T4 e relação entre massa cardíaca e comprimento nasocaudal.

Grupos controle, tratados por 12 horas (T3-12h), 24 horas (T3-24h), sete dias (T3-7d) com hormônio tireoideano (T3). T4 - dosagem de níveis séricos de T4 em nmol/l, MC - massa cardíaca em mg, e MC/NC - massa cardíaca em relação ao comprimento nasocaudal em mg/cm. *p<0.05 vs Controle.

Fonte: Rozanski (2012)

Como esperado, o tratamento com injeções intra-peritoneais de T3 provocou a redução de níveis séricos de T4 em relação ao controle. O grupo T3-7d apresentou maiores valores de relação entre a massa cardíaca e comprimento naso-caudal em relação ao controle denotando hipertrofia cardíaca. Desta forma, pode-se constatar que o hipertireoidismo experimental foi induzido com sucesso. Procedeu-se então com a realização do ensaio de *microarray*.

4.2 Controle de qualidade do ensaio de *microarray*

Após a realização do ensaio *microarray*, se faz necessário a realização de uma série de análises referentes a qualidade de execução do ensaio.

De posse dos dados brutos obtidos a partir da aquisição de imagem do *chip*, conduzimos as referidas análises de qualidade. O pacote *simpleaffy*³⁶ disponibilizado pelo Projeto Bioconductor²⁴ foi utilizado e, desta forma foram obtidas informações referentes ao controle de qualidade dos diferentes passos envolvidos no ensaio.

Na Tabela 2 são apresentados dados de *average background*, *scale factor*, *present calls*, *3' to 5' ratios* para o grupo T3. Esses parâmetros estão associados a avaliação da qualidade do sinal e da imagem obtida.

Tabela 2 - Controle de qualidade - Marcadores *average background*, *scale factor* e *present calls*

<i>chip</i>	<i>average background</i>	<i>scale factor</i>	<i>present calls</i>
ctrl-1	48,1	0,5	59,9
ctrl-2	48,9	0,7	55,0
ctrl-3	46,3	0,5	56,1
12h-1	47,4	0,7	58,3
12h-2	48,0	0,8	54,4
12h-3	49,4	0,5	55,4
24h-1	48,8	0,6	59,9
24h-2	51,3	0,7	55,6
24h-3	40,6	0,7	53,5
7d-1	45,4	0,8	53,2
7d-2	52,5	0,5	56,1
7d-3	45,4	0,6	54,2

Parâmetros utilizados para comparação da qualidade técnica de execução do ensaio de *microarray* nos diferentes *chips*. ctrl - *chip* do grupo controle, 12h - *chip* do grupo tratamento doze horas, 24h - *chip* do grupo tratamento 24 horas, 7d - *chip* do grupo tratamento sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Os valores apresentados na Tabela 2 são diferentes de zero, com pequena variação entre os *chips* quando observado cada parâmetro de forma individual.

Um importante aspecto a ser avaliado no ensaio de *microarray* é a qualidade das amostras utilizadas. Para essa avaliação, utiliza-se os os parâmetros *beta-actin 3'/beta-actin 5'* e *GAPDH 3'/GAPDH 5'*. Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos para para esses parâmetros. Pode-se constatar que os valores dos parâmetros *beta-actin 3'/beta-actin 5'*, *GAPDH 3'/GAPDH 5'* são diferentes de zero e que apresentam comportamento semelhante entre os *chips*.

Por fim, estão representados na Tabela 4 os valores referentes aos parâmetros *BioB*, *Bioc*, *BioD* e *CreX* para o grupo T3. Estes parâmetros são utilizados para avaliação da qualidade de hibridização das amostras no *chip* durante a realização do ensaio de *microarray*.

Observa-se valores similares entre *chips* e crescente entre os parâmetros na ordem *BioB*, *Bioc*, *BioD* e *CreX* denotando conformidade no processo de hibridização.

Tabela 3 - Controle de qualidade - Marcadores beta-actina e GAPDH

<i>chip</i>	beta-actin 3'/beta-actin 5'	GAPDH 3'/GAPDH 5'
ctrl-1	1,13	1,03
ctrl-2	1,08	1,05
ctrl-3	1,11	1,03
12h-1	1,12	1,03
12h-2	1,10	1,04
12h-3	1,05	1,02
24h-1	1,10	1,03
24h-2	1,09	1,04
24h-3	1,06	1,05
7d-1	1,10	1,03
7d-2	1,11	1,04
7d-3	1,09	1,03

Parâmetros utilizados para comparação da qualidade técnica de execução do ensaio de *microarray* nos diferentes *chips* - Qualidade do RNA. ctrl - *chip* do grupo controle, 12h - *chip* do grupo tratamento doze horas, 24h - *chip* do grupo tratamento 24 horas, 7d - *chip* do grupo tratamento sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Tabela 4 - Controle de qualidade - Marcadores BioB, BioC, BioD e CreX

<i>chip</i>	BioB	BioC	BioD	CreX
ctrl-1	7,8	9,3	11,5	12,8
ctrl-2	8,4	9,8	11,9	13,0
ctrl-3	8,1	9,5	11,6	12,7
12h-1	7,7	9,6	11,8	12,9
12h-2	8,5	10,1	12,1	13,3
12h-3	7,9	9,4	11,5	12,8
24h-1	7,9	9,5	11,6	12,8
24h-2	8,3	10,0	11,9	13,1
24h-3	8,6	10,1	12,1	13,2
7d-1	8,4	9,9	12,0	13,2
7d-2	8,1	9,6	11,7	12,9
7d-3	8,0	9,5	11,7	12,9

Parâmetros utilizados para comparação da qualidade técnica de execução do ensaio de *microarray* nos diferentes *chips* - Qualidade de hibridização. ctrl - *chip* do grupo controle, 12h - *chip* do grupo tratamento doze horas, 24h - *chip* do grupo tratamento 24 horas, 7d - *chip* do grupo tratamento sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

4.3 Comparação de algoritmos de pré-processamento de dados - *microarray*

Dado o fato de que existem vários algoritmos para o pré-processamento dos dados brutos obtidos no ensaio de *microarray*, conduzimos uma comparação entre os mais utilizados.

Para cada um dos algoritmos utilizados na comparação, foram feitos diagramas de Venn para facilitar a observação das diferenças entre eles. Foram consideradas variações de 20% tanto para regulação positiva quanto negativa. Deve ainda ser ressaltado que, para essa análise, foram excluídos todas *probeset* cujo nível de expressão em valor absoluto foi inferior a "50" em pelo menos um dos tempos da análise. Vale ressaltar que esta comparação foi realizada apenas no Grupo T3.

Estes gráficos permitem observar as regulações tanto positivas como negativas em cada tempo de tratamento.

Para o algoritmo GCRMA - Regulação positiva, observa-se que 585 genes são regulados positivamente pelo T3 com doze horas de tratamento. De forma semelhante, 624 e 499 são regulados positivamente em 24 horas e sete dias respectivamente. Os genes regulados positivamente tanto em doze horas quanto em 24 horas totalizam 404. De forma similar, 255 e 152 genes são regulados positivamente em 24 horas/sete dias e sete dias/doze horas respectivamente. Por fim, um total de 396 genes regulados positivamente em todos tempos de tratamento.

Leitura similar pode ser feita nas figuras que seguem.

Figura 4 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo GCRMA

Foram consideradas regulações positivas e negativas aqueles genes que apresentaram *fold change* $\geq 20\%$. Para o número total de genes responsivos positiva e negativamente foi considerado *fold change* $\geq 1\%$, portanto 9673 e 9391 respectivamente. 12h - Up - Regulação positiva em doze horas, 24h - Up - Regulação positiva em 24 horas, 7d - Up - Regulação positiva em sete dias, 12h - Down - Regulação negativa em doze horas, 24h - Down - Regulação negativa em 24 horas, 7d - Down - Regulação negativa em sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Figura 5 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo RMA

Foram consideradas regulações positivas e negativas aqueles genes que apresentaram *fold change* $\geq 20\%$. Para o número total de genes responsivos positiva e negativamente foi considerado *fold change* $\geq 1\%$, portanto 15732 e 15534 respectivamente. 12h - Up - Regulação positiva em doze horas, 24h - Up - Regulação positiva em 24 horas, 7d - Up - Regulação positiva em sete dias, 12h - Down - Regulação negativa em doze horas, 24h - Down - Regulação negativa em 24 horas, 7d - Down - Regulação negativa em sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Figura 6 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo PLIER

Foram consideradas regulações positivas e negativas aqueles genes que apresentaram *fold change* $\geq 20\%$. Para o número total de genes responsivos positiva e negativamente foi considerado *fold change* $\geq 1\%$, portanto 16165 e 14940 respectivamente. 12h - Up - Regulação positiva em doze horas, 24h - Up - Regulação positiva em 24 horas, 7d - Up - Regulação positiva em sete dias, 12h - Down - Regulação negativa em doze horas, 24h - Down - Regulação negativa em 24 horas, 7d - Down - Regulação negativa em sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Figura 7 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo dChip

Foram consideradas regulações positivas e negativas aqueles genes que apresentaram *fold change* $\geq 20\%$. Para o número total de genes responsivos positiva e negativamente foi considerado *fold change* $\geq 1\%$, portanto 15203 e 15514 respectivamente. 12h - Up - Regulação positiva em doze horas, 24h - Up - Regulação positiva em 24 horas, 7d - Up - Regulação positiva em sete dias, 12h - Down - Regulação negativa em doze horas, 24h - Down - Regulação negativa em 24 horas, 7d - Down - Regulação negativa em sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Figura 8 - Diagrama de Venn - Valores de expressão de genes calculados com algoritmo MAS5

Foram consideradas regulações positivas e negativas aqueles genes que apresentaram *fold change* $\geq 20\%$. Para o número total de genes responsivos positiva e negativamente foi considerado *fold change* $\geq 1\%$, portanto 14304 e 16058 respectivamente. 12h - Up - Regulação positiva em doze horas, 24h - Up - Regulação positiva em 24 horas, 7d - Up - Regulação positiva em sete dias, 12h - Down - Regulação negativa em doze horas, 24h - Down - Regulação negativa em 24 horas, 7d - Down - Regulação negativa em sete dias.

Fonte: Rozanski (2012)

Para facilitar a visualização e comparação dos algoritmos, a tabela 5 resume informações do número de genes regulados positiva e negativamente. Constata-se facilmente a diferença entre os algoritmos. Levando-se em consideração o número total de genes no *chip* de 31 mil, de acordo com algoritmo ocorre variação entre 9673 a 16165 genes identificados com positivamente regulados sob efeito do T3.

Tabela 5 - Comparação de algoritmos - GCRMA, RMA, PLIER, dChip, MAS5

Categorias	Regulação Positiva	Regulação Negativa
GCRMA	9673	9391
RMA	15732	15534
PLIER	16165	14940
dChip	15203	15514
MAS5	14304	16058

Valores expressos números absolutos de genes. Para o número total de genes responsivos positiva e negativamente foi considerado fold change $\geq 1\%$.

Fonte: Rozanski (2012)

Tendo-se em vista a grande variação entre algoritmos, optamos por realizar uma comparação baseada em genes cuja resposta de modulação sob o efeito de T3 já está descrita na literatura^{19,5}. Selecionamos seis genes, três com estímulo positivo e três com estímulo repressor à expressão gênica em situação de hipertireoidismo prolongado. Determinamos que o algoritmo teve sucesso caso fosse observada variação igual ou superior a 20% no *fold change* em sete dias. Os resultados desta comparação estão representados na Tabela 6.

Pode-se observar que, com a utilização do algoritmo MAS5 houve maior quantidade de genes identificados como responsivos no ensaio de *microarray*.

Com base nestas observações, optamos por utilizar o algoritmo MAS5 para nossas análises.

4.4 Seleção de *probesets* de interesse

Após realização dos procedimentos anteriormente descritos para seleção de *probeset* de interesse, obtivemos uma lista com 343 *probeset* que foram subdivididos em categorias, de acordo com sua localização e ou característica. Estes resultados estão dispostos na Tabela 7.

Diante do grande número de informações obtidas no ensaio de *microarray*, se faz necessário a seleção dos *probeset* a serem analisados. De posse da lista acima obtida, procedemos com a

Tabela 6 - Comparação de algoritmos - Genes com responsividade ao T3 descrita

<i>Probeset</i>	Gene (regulação)	MAS5	dChip	RMA	GCRMA	PLIER
1368322_at	SOD3 (-)					
1386993_at	MYH7 (-)	-	-	-	-	-
1370570_at	NRP1 (-)					
1369825_at	MMP2 (+)	+				
1368176_at	RARA (+)	+	+			
1375164_at	ATP2A2 (+)	+				

SOD3 - *Superoxide Dismutase 3* - NCBI Gene ID: 25352, MYH7 - *Myosin, Heavy Chain 7, beta* - NCBI Gene ID: 29557, NRP1 - *Neuropilin 1* - NCBI Gene ID: 246331, MMP2 - *Matrix Metallo Peptidase 2* - NCBI Gene ID: 81686, RARA - *Retinoic Acid Receptor, alpha* - NCBI Gene ID: 24705 e ATP2A2 - *ATPase, Ca⁺⁺ Transporting, slow twitch 2* - NCBI Gene ID: 29693. Para “+” regulação positiva e para “-” regulação negativa.
 Fonte: Rozanski (2012)

análise deste grupo, no intuito de estudar o impacto do T3 em genes relacionados a proteínas sarcoméricas.

Tabela 7 - *probesets* relativos a genes associados a proteínas sarcoméricas

Categorias	<i>probeset</i>
Filamentos Grossos	18
Filamentos Finos	38
Linha M	21
Disco Z	33
Filamentos Intermediários	6
Microtúbulos	26
Associadas a Membrana	67
Discos Intercalares	49
Desmosomo	17
Anquirinas	68
Total	343

Fonte: Rozanski (2012)

4.5 Impacto do T3 no sarcômero cardíaco - Identificação de *hotspots*

Após a aplicação dos recursos para processamento dos dados obtidos no ensaio de *microarray*, realizamos a identificação de *hotspots* associados a ação do T3. Na figura 9 estão resumidos principais achados em termos de influência do T3 em genes relacionados a proteínas sarcoméricas cardíacas.

No grupo de filamentos grossos, destaca-se a regulação negativa para gene que codifica para cadeia pesada de miosina beta (Myh7, Gene ID: 29557) ao longo do tempo.

A miomesina 2 ou proteína M (Myom2, Gene ID: 306616), apresenta uma importante repressão de sua expressão gênica ao longo do tempo no grupo tratado com T3. Importante ressaltar que nosso laboratório explora esse achado por meio de outro estudo.

Um achado que gerou interesse foi a regulação da expressão do gene que codifica para T-Caderina (Cdh13, Gene ID: 192248). Este gene apresentou regulação positiva ao longo do tempo. Desta forma, optamos por estudar este gene de forma mais detalhada.

4.6 T-Caderina

Um interessante achado foi a identificação do gene que codifica para a T-Caderina como responsivo ao T3. De acordo com os dados do *microarray*, ocorre uma regulação positiva importante do gene da T-Caderina em corações de ratos tratados com T3 por 12, 24 horas e sete dias.

Todavia, quando avaliado por RT-qPCR (Figura 10 - A), os níveis de mRNA para T-Caderina apresentaram aumento transitório, com pico em 24 horas (2.7 vezes, $p < 0,05$). Com sete dias de tratamento, os níveis de mRNA retornaram a valores comparáveis ao controle.

Com auxílio de um experimento de *Western blot* (Figura 10 - B), a expressão proteica da T-Caderina foi avaliada. Pode-se observar comportamento semelhante ao observado nos resultados do RT-qPCR.

Com o objetivo de avaliar a localização da T-Caderina, foi realizado um ensaio de imunofluorescência. Na Figura 11 imunomarcção para T-Caderina e dapi nos grupos controle, 24 horas e sete dias. Pode ser observado em controle, imunomarcção para T-Caderina sugestiva de localização em membrana celular. Com 24 horas de tratamento, ocorre discreto aumento da imunomarcção para T-Caderina de forma difusa e com sete dias de tratamento com T3 discreta redução nesta marcação. É possível ainda observar em todos os tempos, com auxílio das setas brancas, marcação para T-Caderina e dapi colocalizadas, sugerindo localização nuclear da T-Caderina.

Figura 9 - Sarcômero - *Hotspots* relacionados a ação do T3

Descr = descrição utilizada na anotação do *chip* de *microarray*, FC12h = *fold change* doze horas em relação ao controle, FC24h = *fold change* 24 horas em relação ao controle, FC7d = *fold change* sete dias em relação ao controle, Myom2 = Miomesina 2 (Myom2, Gene ID: 306616), Myh7 = Cadeia pesada de miosina beta (Myh7, Gene ID: 29557), Cdh13 = T-Caderina (Cdh13, Gene ID: 192248), T3 = Grupo tratado com T3.

Fonte: figura adaptada³⁷

Figura 10 - Expressão da T-Caderina - Níveis de mRNA e proteicos

Em A, análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR. Aumento na expressão em 2.7 vezes no grupo 24 horas em relação ao controle. Em B, análise da expressão proteica de T-Caderina por *Western blot*. Aumento em 2.4 vezes em 24 horas em relação ao controle.

$p < 0.05$ em relação ao controle.

Fonte: Rozanski (2012)

Figura 11 - Imunofluorescência para T-Caderina

Imunomarcção para T-Caderina em ventrículos esquerdos de ratos controle e tratados com T3 por 24 horas e 7 dias. DAPI = imunomarcção nuclear, T-Caderina = imunomarcção para T-Caderina. Microscopia de fluorescência, aumento de 400x, barra 20 μm .
As setas brancas indicam marcação para núcleos.
Fonte: Rozanski (2012)

Neste estudo, analisamos dados de ensaio de *microarray* realizado com amostras de coração de ratos submetidos a hipotireoidismo experimental. O *microarray* é uma ferramenta poderosa de descoberta que oferece novas direções e sugestões para novos estudos. A análise desses dados proporcionou a observação de interessantes aspectos envolvidos na hipertrofia cardíaca. Após realização de procedimentos para certificação da qualidade de realização do ensaio de *microarray* e escolha do algoritmo a ser utilizado para pré-processamento dos dados brutos, dirigimos nossa atenção, inicialmente, para o estudo da expressão de genes relacionados a proteínas sarcoméricas. Baseado nos dados obtidos, verificamos que o T3 exerce importante papel regulatório em termos de expressão de genes relacionados a proteínas sarcoméricas. Durante esta análise dirigimos nossa atenção para a T-Caderina, cuja expressão em mRNA e proteica são induzidas positivamente com tratamento com T3 e cuja função ainda não está estabelecida em cardiomiócitos.

5.1 Controle de qualidade do ensaio de *microarray*

A análise dos dados obtidos a partir de um ensaio de *microarray* envolve diversos passos. Sabe-se que problemas técnicos na execução do ensaio em apenas um dos *chips* envolvidos no estudo podem comprometer o resultado final³⁸.

Desta forma, optamos por analisar aspectos ligados ao controle de qualidade do ensaio de *microarray* com intuito de afastar fontes de variações e assegurar a qualidade dos dados estudados. Abaixo seguem breves considerações sobre estes marcadores de qualidade para que seja possível uma discussão mais aprofundada.

A Affymetrix, empresa que produz o *chip* utilizado neste estudo, incorpora diversos tipos de marcadores de controle de qualidade que cobrem os vários passos envolvidos no ensaio.

Para avaliar esses marcadores, utilizamos um pacote de dados denominado *simpleaffy*³⁶ disponibilizado pelo Projeto Bioconductor²⁴. Este pacote de dados viabiliza, de forma prática e rápida, a obtenção de informações referentes a qualidade de realização do ensaio. Dentre os parâmetros obtidos estão: *average background*, *scale factor*, *present calls*, *3' to 5' ratios*.

Um aspecto relevante para correta interpretação dos dados é a estimativa adequada do *background*. Trata-se de um processo de determinação do nível de ruído óptico de determinada região do *chip*. Caso haja variação importante dos valores de *background*, isto poderá comprometer a leitura de intensidade de sinal. Desta forma, o marcador *average background*

aponta para o cálculo de *background*. Idealmente, os valores apresentados devem estar entre 20 e 100³⁸ e semelhantes entre *chips*. Na Tabela 2 fica evidente os baixos valores e a pequena variação entre os *chips*, denotando ótimas condições no ensaio realizado.

O nível médio de intensidade luminosa de todo o *chip* é expresso pelo marcador *scale factor*. É desejável que o valor de *scale factor* dos *chips* não seja maior do que o triplo um do outro³⁸. O algoritmo utilizado para pré-processamento dos dados, o MAS5, normaliza os *chips* escalonando-os a um valor comum baseado nos valores de *scale factor*. Caso o *scale factor* apresente valores muito díspares, este processo de escalonamento poderá resultar em comprometimento dos resultados^{36,38}. Na Tabela2, pode-se constatar que todos *chips* apresentam valores muito similares, dentro do que se recomenda como desejável e portanto comparáveis entre si.

Outro importante aspecto a ser observado são os valores de *present calls*. Estes valores representam a identificação de *probe sets* que foram efetivamente detectados. Espera-se portanto que entre *chips* replicados estes valores sejam semelhantes³⁶. A Tabela2 nos mostra que os valores de *present calls* dos *chips* para cada tempo são muito semelhantes, representando grande consistência entre as triplicatas.

Os *chips* apresentam ainda *probe sets* para os as regiões 3' e 5' dos genes GAPDH e beta-actina. Espera-se de um cRNA em boas condições de preservação, que o sinal entre as regiões 3'e 5' sejam semelhantes. Outra aplicação desta medida é a certificação de que o processo de transcrição reversa ocorreu de maneira completa. O protocolo de marcação se baseia na transcrição reversa para amplificar o RNA e incorporar a marcação. Na medida em que toda transcrição tem início na extremidade 3' do gene, irregularidades no processo de marcação devem alterar os valores 5' interferindo na relação 3'/5'³⁶. Os dados referentes ao ensaio, apresentados na Tabela 3, descartam a possibilidade de degradação de RNA bem como de alterações no processo de marcação com fluoróforo em todos os *chips*.

Durante a realização do ensaio de *microarray*, são incorporadas amostras específicas para os *probe sets*: BioB, BioC, BioD, CreX e que funcionam como controle para o processo de hibridização. Recomenda-se a obtenção de valores crescentes na ordem BioB, BioC, BioD, CreX, respectivamente³⁶. Na Tabela 4 os dados referentes as *probe sets* estão apresentados para todos *chips*. Todos os *chips* apresentam valores crescentes para *probe sets* da forma

recomendada pelo fabricante.

Baseado na análise de todos os marcadores de qualidade discutidos acima, fica evidente a adequada qualidade do ensaio de *microarray* realizado e que portanto nos permitiu avançar com as outras análises de bioinformática.

5.2 Algoritmos para pré-processamento dos dados brutos

Calcular a expressão de genes a partir de *chip* de *microarray* da Affymetrix é uma tarefa difícil. Em geral, os *chips* da referida empresa contam com onze pares de *probes* para cada gene avaliado. Teoricamente, cada par de *probe* dentre os onze deveriam apresentar o mesmo nível de intensidade luminosa. Na prática, observa-se que o *probe set* ou ainda, os onze pares de *probe* apresentam níveis de intensidade com diferenças importantes²⁷.

Uma característica específica implementada pela Affymetrix foi a utilização de *mismatch probes* - MM. Cada um dos onze pares de *probe* em um *probe set* apresentam um *perfect match probe* - PM e um MM, cada um contando com 25 bases. *Probes* PM são desenhados para perfeita ligação e para representação do gene de interesse. Já *probe* MM apresentam a base na posição 13 trocada. Desta forma, espera-se que MM sirvam como uma forma de avaliação para ligação inespecífica. Para que seja possível converter essas informações em dados para interpretação, faz-se necessário a utilização de uma série de cálculos matemáticos organizados em algoritmos.

Vários algoritmos para o pré-processamento de dados brutos obtidos em *microarray* estão disponíveis. Todavia, não existe um consenso acerca de qual algoritmo é o mais adequado para ser utilizado. Existem alguns relatos de que diferentes resultados podem ser obtidos quando aplicados diferentes algoritmos para o mesmo experimento³⁹. Com objetivo de evitar interferências nos resultados, decidimos por conduzir um estudo comparativo entre cinco dos algoritmos mais utilizados (GCRMA, RMA, PLIER, dChip, MAS5). A seguir descrevemos de maneira muito resumida cada um dos algoritmos:

- a) MAS5 (Micro Array Suite 5.0) - É um algoritmo disponibilizado pela Affymetrix. Segue como método de normalização o o escalonamento global. Este método preconiza a normalização de cada *chip* de forma individual. Apresenta moderada influência nos níveis de expressão e praticamente sem efeitos sobre outliers. No processo *summarization* utiliza o teste Tukey biponderado. De forma geral, é realizado o antilog de uma média

robusta das diferenças entre logaritmo de PM e logaritmo de MM⁴⁰;

- b) dChip (DNA Chip Analyzer) - Algoritmo desenvolvido por Li e Wong como alternativa à utilização do MAS. Tem como característica fundamental a padronização da intensidade de um experimento por meio da determinação da intensidade média de todos *chips* que compõe o experimento. Outro aspecto peculiar é a utilização de estimativa de índices baseada em modelo. Este procedimento atribui pesos variáveis para pares de *probe* PM-MM de um *probe set* baseado na variância entre *chips*⁴⁰;
- c) RMA (Robust Multi-Array Average)- Utiliza normalização quantil que leva em consideração todos *chips* de forma não individual e exclui os outliers. Para o *summarization*, utiliza a *median polish* para as intensidades de PM apenas⁴⁰;
- d) GCRMA (GeneChip Robust Multi-Array Average)- Funciona de forma similar ao RMA porém no processo de *summarization* considera o efeito das fortes ligações entre G/C⁴⁰;
- e) PLIER (Probe Logarithmic Intensity Error) - Algoritmo desenvolvido pela Affymetrix, tendo como características principais capacidade para múltiplos *arrays*, possibilitar processamento com PM e MM ou apenas PM e múltiplas opções para *background*³⁰.

Realizamos o pré-processamento dos dados brutos com cada um dos algoritmos acima descritos. Um panorama geral dos resultados obtidos foi apresentado nas Figuras 4,5,6,7,8 e sintetizados na Tabela 5. Fica evidente a grande diferença no número de genes com regulação tanto positiva quanto negativa previstos pelos diferentes algoritmos. Desta forma, optamos por analisar a capacidade dos diferentes algoritmos em prever a regulação de genes com responsividade ao T3 já descritos na literatura. Utilizamos seis genes, três com resposta positiva e três negativa ao T3 previamente descritos^{5,41}. Entre os genes selecionados estão:

- a) SOD3 - Superoxide Dismutase 3 - NCBI Gene ID: 25352 associado a atenuação do estresse celular em diferentes condições de agressão tecidual⁴²;
- b) MYH7 - Myosin, Heavy Chain 7, beta - NCBI Gene ID: 29557, proteína associada a contração muscular;

- c) NRP1 - Neuropilin 1 - NCBI Gene ID: 246331, receptor de fator de crescimento celular vascular endotelial;
- d) dMMP2 - Matrix Metallo Peptidase 2 - NCBI Gene ID: 81686, associada a degradação de matriz extracelular em condições fisiológicas e patológicas. Em situação de lesão isquemia/reperfusão MMP2 contribui para degradação da titina em cardiomiócitos⁴³;
- e) RARA - Retinoic Acid Receptor, alpha - NCBI Gene ID: 24705, receptor de ácido retinóico;
- f) ATP2A2 - ATPase, Ca²⁺ Transporting, slow twitch 2 - NCBI Gene ID: 29693, bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, envolvida no transporte de cálcio e portanto na contração muscular⁵.

Com base nessa comparação, foi possível observar a superioridade do algoritmo MAS5 quando comparado ao dChip, RMA, GCRMA e PLIER. Todavia, o MAS5 não foi capaz de prever a regulação dos seis genes.

Jiang et al. (2008)⁴⁴, conduziu um estudo comparativo de sete algoritmos em diferentes *datasets* Affymetrix de folhas de plantas. O objetivo deste estudo era avaliar a eficiência dos algoritmos no cálculo da expressão gênica. Os autores destacam o MAS5 como algoritmo de pior eficiência.

Mieczkowski et al. (2010)⁴⁵ avaliaram a performance de seis algoritmos (MAS5, PLIER, RMA, GC-RMA, MBEI, and MBEImm), em *datasets* Affymetrix, tendo como referência resultados de RT-qPCR. Os *datasets* estudados eram provenientes de diferentes estudos que envolviam camundongos e humanos. Os autores observaram que o GC-RMA teve maior eficiência na detecção da expressão diferencial e o PLIER na estimativa do *fold change*.

Em um trabalho similar ao anterior, Qin et al, (2006)²² analisaram a performance de três algoritmos (MAS5, dChip, GCRMA) em *datasets* Affymetrix de camundongos, tendo como parâmetro resultados de RT-qPCR. Concluiu-se que o cálculo de correção de *background* é realizado de forma mais adequada pelos algoritmos que utilizam PM apenas e que, não existe superioridade de nenhum algoritmo nos processos de normalização e *summarization*.

Seo e Hoffman em (2006)²⁶ apresentam dados referentes a uma comparação entre algoritmos (PLIER, GC-RMA, dCHIP, MAS5, Probe Profiler PCA e RMA) em *datasets* Affymetrix

de humanos. Os autores observaram nesta comparação que o algoritmo PLIER foi superior aos demais.

De acordo com os relatos acima citados, entendemos que a escolha de um algoritmo ideal deve ser feita caso a caso. Idealmente deve ser realizada uma comparação inicial entre eles na sua capacidade de predizer a regulação de genes conhecidamente responsivos²⁶.

5.3 Impacto do T3 no tecido cardíaco

Há a necessidade de melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos produzidos pelo T3 em cardiomiócitos. Desta forma, estudar o impacto do T3 em genes relacionados a proteínas sarcoméricas pode ser útil na geração de conhecimento.

Em nosso estudo, o hipertireoidismo experimental induziu alterações importantes no perfil de expressão de genes relacionados a proteínas sarcoméricas, sobretudo nos filamentos grossos, discos intercalares e banda M Figura 9. A detecção de genes ligados aos filamentos grossos, particularmente MHC beta como responsivos ao T3 não foi uma surpresa, na medida que esse efeito já está amplamente relatado na literatura. Por outro lado, a descoberta de genes ligados à banda M como *hotspot* foi um achado particularmente importante nesse estudo.

Detectamos uma forte redução da expressão de um dos principais genes estruturais ligados à banda M, a miomesina 2. Este achado pode indicar que o T3 afeta a estrutura sarcomérica via deterioração da banda M. Também vale ressaltar que nosso grupo já demonstrou, com auxílio de microscopia eletrônica, que o hipertireoidismo promove inicialmente alterações ultraestruturais importantes na banda M, evento esse que precede a falência do miocárdio⁴⁶.

Tendo-se em vista o importante papel desempenhado pela banda M na estabilização sarcomérica, a forte repressão da expressão da miomesina 2 poderia estar associada ao processo de desorganização sarcomérica. Como já citado, em nosso laboratório o estudo dos efeitos do T3 sobre a expressão da miomesina 2 é explorado em outro projeto em andamento.

Outro *hotspot* identificado nesse estudo foi a T-Caderina, que será abordada em maiores detalhes abaixo.

5.4 T-Caderina

Um dos *hotspots* (Figura 9) evidenciados neste estudo está associado a discos intercalares, em que se destaca o gene que codifica para uma caderina, a T-Caderina. Sabe-se que as caderinas constituem uma grande família de proteínas transmembranares. Estas proteínas são compostas por 3 domínios, a saber o extracelular, transmembrana e o intracelular desempenhando função associada a adesão celular. Desta forma, as caderinas em geral associam-se as cateninas e concentram-se em junções de adesão. Por participarem em junções de adesão, as caderinas apresentam um padrão de localização associada à membrana plasmática. A T-Caderina por sua vez, é uma caderina truncada, não canônica que apresenta domínio extracelular das caderinas tipo I porém não conta com domínios transmembrana e intracelular e tem sua ancoragem na membrana celular por meio de glicosilfosfatidilinositol (GPI)^{47,48}. Devido a ausência de domínio transmembrana e citoplasmático da T-Caderina, o seu envolvimento na adesão celular, clássico das caderinas, é questionado⁴⁹.

A T-Caderina parece desenvolver diferentes papéis em diferentes tecidos e em diferentes condições celulares. Embora a localização celular das caderinas esteja bem descrita, a localização da T-Caderina pode variar. Com auxílio de imunofluorescência observamos que a T-Caderina possui marcação sarcolemal em cardiomiócitos de ratos pertencentes ao grupo controle (Figura 11). Este achado é compatível com o padrão de marcação observado para esta caderina em cardiomiócitos e outros tecidos^{50,51}. Em células de músculo liso e endoteliais a T-Caderina apresenta marcação global puntiforme com mínima localização em junções intercelulares. Porém, quando estas células sofrem algum tipo de insulto, a T-Caderina sofre redistribuição para as extremidades nas células que estão migrando sugerindo o envolvimento da T-Caderina no processo de migração celular⁴⁸. Este relato de localização global e puntiforme da T-Caderina em células de músculo liso e endoteliais gera questionamentos não apenas relacionados ao envolvimento da T-Caderina em processo de adesão celular mas também sobre sua localização celular.

Acredita-se que a T-Caderina possa desempenhar algum papel no citoplasma ou mesmo no núcleo celular. De fato, no ensaio de imunofluorescência observamos que no grupo tratado com T3 por 24 horas houve discreto aumento de marcação para T-Caderina, agora porém no citoplasma. Esta marcação apresenta discreta redução com tratamento por sete dias (Figura

11). Acreditamos que esta mudança na marcação da T-Caderina possa estar relacionada aos efeitos do T3 no coração. Neste mesmo ensaio de imunofluorescência, notamos uma marcação nuclear para T-caderina no grupo controle. Essa marcação já foi descrita em outro tipo celular - endotelial, e parece estar associada à migração da forma ativada de T-Caderina⁵². De modo interessante, a estimulação com T3 parece estar relacionada a migração de T-Caderina sarcolemal para o citosol e aumento de núcleos marcados com essa proteína. Na medida que T-Caderina ativada sinaliza no núcleo, é possível que parte das ações do T3 sejam mediadas pela T-Caderina nuclear. Existem relatos de trabalhos que evidenciam localização nuclear de domínios citoplasmáticos clivados de caderinas clássicas com possível papel na modulação da transcrição de genes⁵². Encontramos apenas um relato na literatura sobre localização nuclear de T-Caderina, em células endoteliais⁵². Os autores acreditam que a T-Caderina possa atuar como participante importante no processo de citocinese e replicação centrossomal e é discutido também neste estudo, porém sem um consenso, sobre a possível translocação da T-Caderina para o núcleo. Um dos possíveis mecanismos para explicar a translocação da T-Caderina para o núcleo seria sua associação com outras proteínas de membrana que viabilizariam a translocação para o núcleo. Um exemplo deste tipo de associação é o mecanismo de endocitose mediado pela caveolina. Embora este mecanismo seja proposto para o processo de endocitose de proteínas com âncora GPI, os estudos realizados neste campo não apresentam consenso sobre a importância da endocitose mediada pela caveolina para T-Caderina⁵².

Um interessante aspecto observado na imunofluorescência foi que com sete dias de estimulação com T3, ocorreu uma diminuição da intensidade de marcação para T-Caderina e diminuição de núcleos positivos para T-Caderina. Desta forma nota-se que o efeito do T3 sobre a T-Caderina parece ser transitório. Este comportamento transitório é evidente não apenas no ensaio de imunofluorescência mas também nos dados relativos a expressão gênica e protéica da T-Caderina (Figura 10).

O gene que codifica para T-Caderina é bem conservado, e apresenta forte homologia entre espécies⁴⁸. Quando observada a homologia em sua região promotora, este gene não apresenta TATA box e conta com descrição diversos fatores de regulação de transcrição propostos. Dentre estes fatores, pode-se citar fatores de crescimento como o derivado de plaquetas, epidérmico, semelhante à insulina. Regiões com potencial para ligação de receptores de estrogênio,

de glicocorticóide e de progesterona foram descritas. De fato, já foi demonstrado que a regulação transcricional e pós-transcricional do gene que codifica para T-Caderina sofre influência de estradiol, progesterona, fator de crescimento epidérmico e dexametasona em células de osteosarcoma humano⁵³. Em nossa avaliação dos níveis de mRNA para T-Caderina por meio de RT-qPCR, observamos que o T3 promove estímulo positivo transitório para expressão do referido gene (Figura 10). Desconhecemos relatos ou o mecanismo pelo qual o T3 exerce esta regulação. Um possível mecanismo regulatório poderia ser a regulação transcricional do T3 via ligação com elementos responsivos localizados na região promotora do gene que codifica para T-Caderina. Durante a realização de nosso trabalho, desenvolvemos um programa em Python que efetua buscas destes elementos responsivos baseados em variações de palíndromo consenso. Optamos por não apresentar estes dados porém, encontramos 50 sequências com potencial para representação de palíndromos na região promotora da T-Caderina. Evidente que estes dados necessitam de validação, todavia apontam para um possível mecanismo de resposta da T-Caderina ao T3.

A T-Caderina é expressa no sistema nervoso, tecido conjuntivo, pulmões, fígado, rins, sistema cardiovascular e estudada em diferentes modelos celulares de câncer. No sistema cardiovascular existem relatos de elevada expressão proteica de T-Caderina em especial artérias aorta, carótida, ílica e renal e em cardiomiócitos^{49,51}. Observamos neste estudo, que em cardiomiócitos de ratos, o T3 promoveu aumento transitório dos níveis protéicos de T-Caderina a semelhança dos níveis de mRNA. Este aumento transitório teve seu pico em 24 horas com retorno aos níveis basais em sete dias (Figura 10). Interessante observar que, como foi citado anteriormente, ocorreu discreto aumento de marcação para T-Caderina no grupo de 24 horas de tratamento com T3 no ensaio de imunofluorescência. Desconhecemos trabalhos que evidenciem o aumento na expressão protéica de T-Caderina em cardiomiócitos submetidos ao hipertireoidismo experimental em ratos.

Em termos funcionais, há relatos de que a T-Caderina esteja ligada ao estímulo para angiogênese, a regulação do crescimento e migração celular e que atua como receptora de sinalização em diferentes processos muito importantes como: regulação da motilidade celular, proliferação e determinação fenotípica⁴⁸.

A T-Caderina foi identificada como terceiro receptor de Adiponectina em cardiomióci-

tos⁵⁴ juntamente com o receptor de adiponectina 1 (Adipor1 – Adiponectin receptor 1 - NCBI Gene ID: 289036) e receptor de adiponectina 2 (Adipor2 – Adiponectin receptor 2 - NCBI Gene ID: 312670). A adiponectina é um hormônio derivado de adipócitos com propriedades metabólicas e cardiovasculares benéficas. Baixos níveis circulantes de adiponectina parecem estar relacionados ao desenvolvimento de importantes disfunções do sistema cardiovascular como por exemplo doença coronariana, hipertensão e hipertrofia cardíaca⁵⁰. Em um estudo sobre os mecanismos de proteção cardíaca exercidos pela adiponectina, ficou evidente que a T-Caderina é de fundamental importância para tal processo. Quando utilizados modelos de hipertrofia e de isquemia-reperfusão cardíacos, ficou evidente que a T-Caderina exerce proteção do miocárdio contra remodelação patológica por meio de ligação a adiponectina e ativação de funções cardioprotetoras⁵⁰. Em um estudo que envolveu a utilização de células endoteliais que superexpressam T-Caderina observou-se níveis elevados de fosforilação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e p70S6K associados a via da Akt e mTOR respectivamente, ambas vias ligadas a sobrevivência celular. Foram evidenciados ainda baixos níveis de p38MAPK que estão associados a morte celular. Quando submetidas a estresse, as referidas células apresentaram baixos níveis de ativação de caspase e portanto maior de sobrevivência celular. Estes efeitos foram abolidos quando utilizados inibidores de PI3K (wortmannin) e de mTOR (rapamicina). Desta forma, os autores concluem que a superexpressão de T-Caderina em células endoteliais promove proteção contra apoptose induzida por estresse, por meio de ativação de via metabólica de sobrevivência - PI3K/Akt/mTOR e repressão da via pró-apoptótica p38 MAPK⁵⁵.

Os mesmos autores do estudo anterior avaliaram a relação entre a quinase ligada a integrina (ILK) e a T-Caderina. Constataram que ILK é um mediador indispensável para a via de sinalização de T-Caderina/Akt/GSK3 beta e que a associação de ILK e T-Caderina está envolvida na regulação dos níveis de beta-catenina associada a níveis elevados de atividade de Lef/Tcf e ciclina D1 em células endoteliais⁵⁶.

Em nosso laboratório, resultados de experimentos ainda não publicados mostram que o hipertiroidismo experimental induzido pelo T3 altera os níveis de beta-catenina em associação com elevados níveis de Lef/Tcf e ciclina D1 em cardiomiócitos. Esse processo parece ser de fundamental importância para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Desta forma,

acreditamos ser necessário analisar uma possível participação da T-Caderina na regulação de níveis de beta-catenina em cardiomiócitos.

Pode-se concluir com este estudo:

- a) T3 exerce importante função regulatória de expressão de genes associados a proteínas sarcoméricas de coração de ratos;
- b) T3 regula a expressão do gene da T-Caderina. Especulamos que essa regulação possa estar associada a hipertrofia cardíaca induzida pela exposição prolongada do T3 sobre o músculo cardíaco.

- [1] Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1097–142.
- [2] Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:439–66.
- [3] Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev.* 2005;26(5):704–28.
- [4] Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.
- [5] Dillmann W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev.* 2010;15(2):125–32.
- [6] Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol.* 1998;5:299–306.
- [7] Brix K, Fuhrer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action known facts and future perspectives. *Thyroid Res.* 2011;4:9–10.
- [8] Horn S, Heuer H. Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;315(1-2):19–26.
- [9] Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24 Suppl 2:S109–12.
- [10] Murphy E, Williams GR. The thyroid and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61(3):285–98.
- [11] Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly AM, Rubinstein NA. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.* 1983;156(2):335–9.
- [12] Biondi B, Palmieri EA, Fazio S, Cosco C, Nocera M, Saccà L, et al. Endogenous sub-clinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(12):4701–5.
- [13] Cohen MV, Schulman IC, Spenillo A, Surks MI. Effects of thyroid hormone on left ventricular function in patients treated for thyrotoxicosis. *Am J Cardiol.* 1981;48(1):33–8.
- [14] Dillmann WH, Rohrer D, Popovich B, Barrieux A. Thyroid hormone induced changes in cardiac proteins and mRNAs. *Horm Metab Res Suppl.* 1987;17:26–9.
- [15] Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002;440:85–98.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>[2011 Jul 15].

- [16] Riis ALD, Jørgensen JOL, Gjedde S, Nørrelund H, Jurik AG, Nair KS, et al. Whole body and forearm substrate metabolism in hyperthyroidism: evidence of increased basal muscle protein breakdown. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(6):E1067–73.
- [17] Caiozzo VJ, Baker MJ, Baldwin KM. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol.* 1998;85(6):2237–48.
- [18] Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Saltao RM, Vilicev CM, Passarelli M, et al. Thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res.* 2005;321:233–41.
- [19] De K, Ghosh G, Datta M, Konar A, Bandyopadhyay J, Bandyopadhyay D, et al. Analysis of differentially expressed genes in hyperthyroid-induced hypertrophied heart by cDNA microarray. *J Endocrinol.* 2004;182:303–14.
- [20] Augenlicht LH, Kobrin D. Cloning and screening of sequences expressed in a mouse colon tumor. *Cancer Res.* 1982;42(3):1088–93.
- [21] Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(24):13057–62.
- [22] Qin LX, Beyer RP, Hudson FN, Linford NJ, Morris DE, Kerr KF. Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:23.
- [23] Affymetrix. Statisticals description document. 2002;Available from: <http://www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/saddwhitepaper.pdf>, [06; Jun 2011].
- [24] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R.80.1–.16.
- [25] Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2011. ISBN 3-900051-07-0.
- [26] Seo J, Hoffman E. Probe set algorithms: is there a rational best bet? *BMC Bioinformatics.* 2006;7:395.
- [27] Millenaar FF, Okyere J, May ST, Zanten Mv, Voesenek LACJ, Peeters AJM. How to decide?: Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:137.
- [28] Wu Z, Irizarry RA. Preprocessing of oligonucleotide array data. *Nat Biotechnol.* 2004;22(6):656–8.
- [29] Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(4):e15.1–.8.

- [30] Affymetrix. Guide to Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER) Estimation. 2007; Available from: <http://www.affymetrix.com/support/technotes/pliertechnote.pdf>, [9; Jun 2011].
- [31] Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol.* 2001;2(8):0032.1–11.
- [32] Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637–706.
- [33] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D34–8.
- [34] Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time . *Bioinformatics.* 2004;20(15):2471–2.
- [35] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
- [36] Wilson CL, Miller CJ. Simpleaffy a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics.* 2005;21:3683–85.
- [37] Tskhovrebova L, Trinick J. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1–7.
- [38] McCall MN, Murakami PN, Lukk M, Huber W, Irizarry RA. Assessing affymetrix GeneChip microarray quality. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:137–47.
- [39] Zakharkin SO, Kim K, Mehta T, Chen L, Barnes S, Scheirer KE, et al. Sources of variation in Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics.* 2005;6:214.
- [40] Verhaak RGW, Staal FJT, Valk PJM, Lowenberg B, Reinders MJT, de Ridder D. The effect of oligonucleotide microarray data pre-processing on the analysis of patient-cohort studies. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:105.
- [41] De K, Ghosh G, Datta M, Konar A, Bandyopadhyay J, Bandyopadhyay D, et al. Analysis of differentially expressed genes in hyperthyroid-induced hypertrophied heart by cDNA microarray. *J Endocrinol.* 2004;182(2):303–14.
- [42] Laatikainen LE, Incoronato M, Castellone MD, Laurila JP, Santoro M, Laukkanen MO. SOD3 decreases ischemic injury derived apoptosis through phosphorylation of Erk1/2, Akt, and FoxO3a. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e24456.
- [43] Ali MA, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2010;122(20):2039–47.
- [44] Jiang N, Leach LJ, Hu X, Potokina E, Jia T, Druka A, et al. Methods for evaluating gene expression from Affymetrix microarray datasets. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:284.

- [45] Mieczkowski J, Tyburczy ME, Dabrowski M, Pokarowski P. Probe set filtering increases correlation between Affymetrix GeneChip and qRT-PCR expression measurements. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:104.
- [46] Ferreira PJ, L'Abbate C, Abrahamsohn PA, Gouveia CA, Moriscot AS. Temporal and topographic ultrastructural alterations of rat heart myofibrils caused by thyroid hormone. *Microsc Res Tech*. 2003;62(5):451–9.
- [47] Vestal DJ, Ranscht B. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *J Cell Biol*. 1992;119(2):451–61.
- [48] Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Pfaff D, Erne P, Resink TJ. A guide and guard: the many faces of T-cadherin. *Cell Signal*. 2009;21(7):1035–44.
- [49] Ivanov D, Philippova M, Antropova J, Gubaeva F, Iljinskaya O, Tararak E, et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol*. 2001;115(3):231–42.
- [50] Denzel MS, Scimia M, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4342–52.
- [51] Doyle DD, Goings GE, Upshaw-Earley J, Page E, Ranscht B, Palfrey HC. T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma. *J Biol Chem*. 1998;273(12):6937–43.
- [52] Andreeva AV, Kutuzov MA, Tkachuk VA, Voyno-Yasenetskaya TA. T-cadherin is located in the nucleus and centrosomes in endothelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2009;297(5):C1168–77.
- [53] Bromhead C, Miller JH, McDonald FJ. Regulation of T-cadherin by hormones, glucocorticoid and EGF. *Gene*. 2006;374:58–67.
- [54] Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(28):10308–13.
- [55] Joshi MB, Philippova M, Ivanov D, Allenspach R, Erne P, Resink TJ. T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *FASEB J*. 2005;19(12):1737–9.
- [56] Joshi MB, Ivanov D, Philippova M, Erne P, Resink TJ. Integrin-linked kinase is an essential mediator for T-cadherin-dependent signaling via Akt and GSK3beta in endothelial cells. *FASEB J*. 2007;21(12):3083–95.