

ANA CAROLINA DECKMANN

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL NA
FASE TARDIA DA PROTEÇÃO CARDÍACA INDUZIDA
POR COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS EM
CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS**

CAMPINAS

Unicamp

2008

ANA CAROLINA DECKMANN

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL NA
FASE TARDIA DA PROTEÇÃO CARDÍACA INDUZIDA
POR COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS EM
CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS**

Tese de doutorado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração Medicina Experimental

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D357e Deckmann, Ana Carolina
Estudo da expressão gênica global na fase tardia da proteção cardíaca induzida por compostos quinazolínicos em coração de camundongos. / Ana Carolina Deckmann. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Kleber Gomes Franchini
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Isquemia miocárdica. 2. Expressão gênica. 3. Tratamentos farmacológicos. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Global gene expression in late phase of myocardial protection induced by quinazolinic compounds in heart of mice

Keywords: . Myocardial Ischemia
. Gene expression
. Pharmacological treatment

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Medicina experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Prof. Dr. Edécio Cunha Neto

Prof. Dr.ª Mari Cleide Sogayar

Data da defesa: 27- 02-2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini

Kleber Franchini

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Professor (a) Doutor (a) Fernando Ferreira Costa

Professor (a) Doutor (a) Edécio Cunha Neto

Professor (a) Doutor (a) Mari Cleide Sogayar

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/02/2008

*Dedico este trabalho
aos meus pais,
Sigmar e Carla,
que tornaram possível que
eu chegasse até aqui.
Ao Ulisses,
meu pequeno garoto,
que a cada 'por quê?'
me oferece uma chance de
ir além.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela confiança depositada em mim e em meu trabalho, acompanhando e incentivando meu progresso na pesquisa desde o início do mestrado.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, por ter disponibilizado o suporte técnico necessário para as análises dos dados gerados neste trabalho e por ter me permitido ser parte integrante da história de seu grupo de pesquisa.

Ao amigo bioinformata Marcelo “Tchelo” Carazzolle, pelo auxílio imprescindível na organização e análise dos dados e, principalmente, pela amizade recheada de longas discussões sobre estratégias de análise de microarrays, a partir das quais aprendemos muito do que sabemos sobre o assunto.

Aos colegas Silvana Rocco, Rodrigo Marin, Thaís Holz e Luís Rolim pelo auxílio na preparação dos compostos quinazolínicos e tratamento dos animais, mas também pelas conversas importantes e necessárias para que todo o meu trabalho fizesse sentido.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino, do Departamento de Biologia Celular - IB/Unicamp, por ter gentilmente cedido linhagens de células, material para cultivo *in vitro* e o suporte e experiência de sua aluna, Silvia Pimentel, nos permitindo aprofundar o estudo dos efeitos do composto quinazolínico.

À colega Ana Paula Dalla, pelo auxílio nos experimentos de angiogênese *in vitro*, mas também por sua amizade e apoio incondicional ao meu trabalho, sempre.

À colega Michelle Servais, por ter me acompanhado nas viagens à Unifesp - SP, onde realizei parte essencial do trabalho de produção dos microarranjos de oligonucleotídeos, mas principalmente pela amizade e ombro firme em várias das minhas crises.

Ao colega Joan Barau, por dispor de seu tempo e empenho nos ensaios de validação da expressão gênica por *real time*-PCR, mas também por ter se mostrado um amigo pra todas as horas.

Aos colegas Antônio Calixto e Jaqueline Lima, pela ajuda nos experimentos de *western blotting*, pela paciência com minha inexperiência (Jack) e pelas risadas (Tonhão).

À Andréia Assis Souza, pelo suporte nas compras e cotações de material, mas principalmente pela amizade e carinho.

À Eliane Laranja Dias, pela ajuda nos entraves burocráticos, administrativos, logísticos - enfim, tudo quanto é pepino que apareceu nestes últimos 7 anos. Agradeço sempre seu carinho, amizade e força!

À Márcia Story, pela ajuda nas prestações de contas e pedidos de compras e, não menos importante, por tornar nosso aniversário mais doce e divertido!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genômica e Expressão, muitos dos quais já não pertencem mais ao grupo, mas que foram imprescindíveis para que hoje minha qualidade como pesquisadora seja reconhecida pelos que permaneceram e por aqueles que chegaram depois.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, por sempre demonstrarem grande consideração e respeito por mim e por meu trabalho. A vocês dedico este estudo: que estes resultados possam servir como ponto de partida ao trabalho daqueles que já pertencem ao grupo e de outros que ainda estão por vir.

Aos amigos queridos, aos que estão perto e aos que estão longe, àqueles que vejo sempre e aqueles que não vejo há tempos, mas dos quais não faço distinção pois que os trago junto comigo, em cada detalhe da pessoa que sou quando ninguém está olhando.

À FAPESP e CNPq, pelo suporte financeiro concedido.

*"Que a inspiração chegue
não depende de mim.*

*A única coisa que posso fazer é
garantir que ela me encontre
trabalhando."*

Pablo Picasso

*"Escolha um trabalho que ame e
não terás que trabalhar um
único dia em sua vida."*

Confucio

	Pág.
RESUMO	xxxiii
ABSTRACT	xxxvii
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- Doenças isquêmicas do coração	43
1.2- Precondicionamento isquêmico do miocárdio	44
1.3- Modelo geral da cardioproteção induzida pelo condicionamento isquêmico	46
1.4- Cardioproteção aguda	47
1.4.1- Elementos desencadeadores.....	47
1.4.2- Elementos mediadores.....	48
1.4.3- Efeitos finais.....	49
1.5- Cardioproteção tardia	50
1.6- Poscondicionamento isquêmico	51
1.7- Expressão de genes e proteínas na cardioproteção	52
1.8- Cardioproteção induzida por agentes farmacológicos	54
2- OBJETIVOS	57
2.1- Objetivo geral	59
2.2- Objetivos específicos	59
3- METODOLOGIA	61
3.1- Compostos quinazolínicos	63
3.2- Grupos experimentais	63

3.2.1- Grupos para estudo da preservação funcional do miocárdio tratado por DMA e submetido a isquemia/reperfusão.....	63
3.2.2- Grupos para estudo da expressão gênica desencadeada em miocárdio pelo tratamento pelo DMA.....	64
3.3- Extração do RNA total.....	64
3.4- Produção dos microarranjos de oligonucleotídeos.....	65
3.5- Controles técnicos dos microarranjos de oligonucleotídeos.....	66
3.6- Processamento dos dados.....	67
3.7- Análise funcional dos genes conhecidos.....	68
3.8- Análise das ESTS (Expressed Sequence TAGS) diferencialmente expressas.....	68
3.9- Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em 24 e 48 horas.....	69
3.10- Análise das vias metabólicas e de sinalização representadas pelos genes diferencialmente expressos.....	69
3.11- Ensaio de diferenciação e proliferação de células endoteliais in vitro.....	70
3.12- Ensaios de Western Blotting.....	71
3.13- Anticorpos.....	71
3.14- PCR em tempo real (RT-PCR).....	71
4- RESULTADOS.....	73
4.1- Fase tardia da cardioproteção induzida pelo composto quinazolínico....	75
4.2- Qualidade do RNA total.....	76
4.3- Produção dos microarranjos.....	78
4.4- Normalização.....	80

4.5- Análise dos dados.....	82
4.6- Análise da composição dos transcritomas de 24 e 48 horas.....	83
4.7- Análise dos genes conhecidos.....	85
4.8- Análise da transição da expressão gênica entre 24 e 48 horas.....	92
4.9- Análise das ESTS diferencialmente expressas.....	97
4.10- Estudos das vias metabólicas e de sinalização representadas pelos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento por DMA.....	105
4.11- Ensaio confirmatório dos efeitos do tratamento pela quinazolina DMA.....	107
4.11.1- Confirmação da expressão gênica.....	107
4.11.2- Expressão de proteínas.....	112
4.11.3- Modelo in vitro para estudo da angiogênese.....	114
5- DISCUSSÃO.....	117
5.1- Estudo descritivo dos transcritomas desencadeados em miocárdio de camundongos 24 e 48 horas após o tratamento pela quinazolina DMA.....	119
5.2- Análise dos transcritomas em função das vias metabólicas alteradas em resposta ao tratamento pelo DMA.....	129
5.2.1- Metabolismo de glicose.....	129
5.2.2- Metabolismo de lipídeos.....	131
5.2.3- Via do PPAR- γ e adipocitocinas.....	133
5.2.4- Metabolismo de purinas e metionina.....	135
5.2.5- Metabolismo de nicotinato e nucleotídeos.....	137
5.2.6- Metabolismo dos citocromos P450.....	139

5.2.7- Metabolismo do ácido araquidônico.....	140
5.2.8- Metabolismo de hormônios esteróides.....	142
5.2.9- Metabolismo de ácido retinóico.....	143
5.2.10- Síntese do óxido nítrico.....	143
5.2.11- Angiogênese.....	145
5.2.12- Hipóxia.....	147
5.2.13- Transporte.....	149
5.2.14- Axonogênese.....	150
5.2.15- Comunicação GABAérgica.....	153
5.2.16- Apoptose e resposta imune.....	155
5.3- Possíveis mecanismos associados à cardioproteção tardia induzida pelo tratamento com a quinazolina DMA.....	156
5.3.1- Elementos desencadeadores.....	156
5.3.2- Elementos mediadores.....	159
5.3.3- Efeitos finais.....	161
6- CONCLUSÃO.....	167
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173
8- APÊNDICES.....	203
8.1- Apêndice 1.....	205
A- Genes conhecidos diferencialmente expressos 24 horas após a administração do composto quinazolínico.....	205
B- Genes conhecidos diferencialmente expressos 48 horas após a administração do composto quinazolínico.....	218

8.2- Apêndice 2	227
A- Lista das ESTS (Expressed Sequence TAGS) diferencialmente expressas 24 horas após a administração do composto quinazolínico...	227
B- Lista das ESTS (Expressed Sequence TAGS) diferencialmente expressas 48 horas após a administração do composto quinazolínico...	243
8.3- Apêndice 3	257
Metaboloma putativo de células de miocárdio após 24 e 48 horas decorridas do tratamento pela quinazolina DMA, de acordo com os resultados de expressão gênica diferencial.....	257

	Pág.
Tabela 1 Quantificação dos RNAS totais extraídos dos miocárdios dos grupos experimentais.....	77
Tabela 2 Identidade e valores de expressão dos genes comuns a ambos os transcriptomas. FOLD CHANGE: amplitude da variação da expressão gênica. P-VALUE: significância estatística.....	91
Tabela 3 Genes selecionados para estudo confirmatório da expressão após o tratamento pela quinazolina, através de PCR semiquantitativo e RT-PCR. Estão apresentados os valores de expressão e respectivos valores de significância estatística (P.VALUE) em 24 e 48 horas. FW; primer forward ou sense. RW; primer reverse ou antisense.....	108
Tabela 4 Expressão de alguns genes envolvidos com a sinalização e metabolismo de adenosina nos microarranjos codelink. Estão apresentados os valores de expressão (FOLD CHANGE) e respectivos valores de significância estatística (P.VALUE) em 24 e 48 horas.....	157

	Pág.
Figura 1	Registros de pressão do ventrículo esquerdo (PVE) obtidos em experimento de isquemia/reperfusão em corações isolados de camundongos controle (veículo) ou tratados pela quinazolina nos tempos de 24, 48 e 72 horas..... 75
Figura 2	Eletroforese em gel desnaturante de agarose para avaliação da qualidade das amostras de RNA total..... 77
Figura 3	Sinais emitidos por uma das lâminas produzidas e, no detalhe assinalado, a imagem em maior aumento..... 79
Figura 4	Gráficos representativos das intensidades médias dos pontos presentes em cada uma das lâminas, analisadas separadamente nos tempos de 24 e 48 horas após a administração da quinazolina..... 81
Figura 5	Gráficos volcano representando a distribuição dos genes em função dos valores associado à sua significância estatística (VALOR P) no eixo das ordenadas e variação de sua expressão no eixo das abscissas, em 24 horas (A) e 48 horas (B) após o tratamento pela quinazolina..... 82
Figura 6	Análise da quantidade de genes conhecidos ou ESTS diferencialmente expressos em 24 horas (a) e 48 horas (b) em relação ao total de genes representados nos <i>microarranjos codelink</i> 84
Figura 7	Análise dos principais processos biológicos representados nos transcritomas de 24 e 48 horas..... 86
Figura 8	Análise da distribuição dos genes diferenciais nas subcategorias incluídas na classe funcional “outros processos metabólicos”..... 87

Figura 9	Análise dos transcritomas de 24 horas (A) e 48 horas (B) em função da proporção entre genes induzidos e reprimidos presentes em cada uma das categorias funcionais definidas na Figura 8.....	88
Figura 10	Diagramas de VENN representando a ocorrência de genes diferencialmente expressos comuns a ambos os transcritomas.....	90
Figura 11	Análise de agrupamento dos genes em função de sua expressão em 24 e 48 horas após a administração do composto quinazolínico.....	93
Figura 12	Análise do perfil funcional dos quatro grupos definidos de acordo com o tipo de regulação da expressão gênica entre 24 e 48 horas: (A) regulação inicial; (B) regulação tardia; (C) regulação sustentada; (D) regulação transitória.....	96
Figura 13	Classificação e distribuição das etiquetas de seqüências expressas (ESTS) em classes representativas dos principais sistemas fisiológicos de mamíferos.....	98
Figura 14	Distribuição das ESTS segundo sua regulação transcricional (indução ou repressão), em cada uma das classes representativas dos principais sistemas fisiológicos de mamíferos.....	99
Figura 15	Análise de agrupamento das ESTS em função de sua expressão em 24 e 48 horas após a administração do composto quinazolínico.....	101
Figura 16	Análise do perfil funcional dos quatro grupos definidos de acordo com o tipo de regulação da expressão das ESTS em 24 e 48 horas: (A) regulação inicial; (B) regulação tardia; (C) regulação sustentada; (D) regulação transitória.....	103
Figura 17	Exemplos de vias metabólicas e de sinalização obtidas após submissão dos genes diferencialmente expressos ao banco de dados KEGG. A- via de sinalização das adipocitocinas. B- metabolismo de hormônios andrógenos e estrógenos.....	106

Figura 18	Expressão de alguns genes nos <i>microarranjos codelink</i> e nos ensaios de RT-PCR, em ambos os tempos estudados (24 e 48 horas).....	109
Figura 19	Ensaio de PCR semiquantitativo realizados para alguns dos genes selecionados para confirmação da expressão.....	111
Figura 20	Ensaio de WESTERN BLOTTING para estudo da expressão de proteínas de interesse em miocárdios provenientes de camundongos tratados pelo DMA 24 (D24) ou 48 horas (D48) antes da coleta do tecido.....	113
Figura 21	Confirmação dos efeitos angiogênicos do tratamento pela quinazolina DMA. A- ensaio de diferenciação de células endoteliais tratadas com 10 ou 100nm de DMA em relação ao tratamento com o veículo, DMSO.....	115

RESUMO

O termo síndrome coronária aguda compreende a angina instável e o infarto do miocárdio, entidades clínicas freqüentes e potencialmente letais. Ambas as situações caracterizam-se por um desbalanço entre a oferta e a demanda de oxigênio no miocárdio, freqüentemente desencadeadas pela diminuição da perfusão resultante de estreitamento ou oclusão de artérias coronárias em consequência de aterosclerose. As elevadas taxas de morbidade e mortalidade destas condições são atribuídas, principalmente, à perda de massa miocárdica e instabilidades elétricas decorrentes não apenas da isquemia, mas também da reperfusão espontânea ou induzida de áreas do miocárdio isquêmico. Desta forma, é intensa a busca por estratégias e agentes farmacológicos que possam reduzir os danos miocárdicos provocados tanto pela isquemia como pela reperfusão. Evidências experimentais e algumas evidências clínicas indicam que a adenosina (Ado) administrada sistemicamente é capaz de proteger o miocárdio dos efeitos da isquemia/reperfusão. A proteção conferida pela Ado ocorre tanto aguda (1-6 horas) como tardiamente (1-3 dias) após a administração em dose única. Enquanto a proteção aguda depende da ativação de vias de sinalização que mobilizam efetores constitutivamente expressos nas células, a proteção tardia parece depender da alteração da expressão de genes envolvidos em múltiplas funções celulares. No entanto, algumas características da ação sistêmica da Ado, tais como a meia-vida curta e seus efeitos cardiovasculares (i.e. bradicardia e hipotensão), são barreiras importantes para seu uso clínico nas síndromes coronárias agudas. Uma das maneiras de evitar estes efeitos indesejáveis é utilizar agentes farmacológicos que aumentam a biodisponibilidade de Ado, como antagonistas de seus transportadores ou inibidores da adenosina quinase, uma enzima-chave no metabolismo de purinas que fosforila a adenosina em AMP através de hidrólise do ATP. Neste contexto, demonstramos anteriormente que compostos derivados de anilinoquinazolininas são inibidores de adenosina quinase e induzem a proteção miocárdica tanto aguda como tardia em modelo de coração isolado. Tendo em vista que a proteção tardia depende da expressão diferencial de genes, o presente estudo foi planejado para investigar as respostas transcricionais envolvidas na cardioproteção induzida tardiamente após a administração do composto quinazolínico líder inibidor de adenosina quinase, DMA. Para tanto, foram utilizados lâminas de oligonucleotídeos contendo as sequências referentes a todos os genes de camundongo (~35 mil genes). As sondas de RNA foram sintetizadas a partir de corações de camundongos tratados com dose única de DMA

(30 mg/Kg, i.v.) ou DMSO (veículo), com antecedência de 24 e 48 horas antes da extração do órgão, períodos em que a cardioproteção foi observada em coração isolado. Foram considerados diferencialmente expressos (variação >[2.0], *p-value* <0,1) um total de 1061 genes em 24 horas e 844 genes em 48 horas em relação às amostras tratadas apenas pelo veículo. Destes, a maior parte se constitui de genes cuja função ainda não é conhecida (63% em 24 horas; 76% em 48 horas), as chamadas ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Em 24 horas, a maior parte dos genes (75% dos genes conhecidos e 62% das ESTs) aumentou sua expressão, enquanto em 48 horas a indução gênica foi observada em 56% dos genes conhecidos e 58% das ESTs. As análises funcionais dos genes conhecidos indicaram grande representação de classes associadas à adesão celular, sinalização, transporte e metabolismo em 24 horas e adesão celular, desenvolvimento de organismo multicelular e metabolismo em 48 horas. O estudo das identidades gênicas revelou poucas coincidências entre os dois transcritomas e a análise de agrupamento para estudo da transição entre o perfil de expressão gênica em 24 e 48 horas demonstrou que cerca a maioria dos genes apresenta uma regulação transitória de sua expressão (tendência a aumento seguido por redução da expressão e vice-versa). A análise das vias metabólicas em que estão inseridos os genes diferenciais permitiu a montagem de um metaboloma putativo de células de miocárdio tratado pela quinazolina DMA. Entre as principais vias metabólicas afetadas estão o metabolismo de glicose e lipídeos, do PPAR- γ e adipocitocinas, vias associadas à angiogênese, entre outros. Entre estes resultados, foram confirmados experimentalmente o efeito pró-angiogênico do DMA e a expressão de genes e proteínas associadas às alterações no metabolismo energético cardíaco. De maneira geral, nossos resultados indicam que diversas respostas celulares, entre as quais a regulação da fisiologia energética, a homeostase de íons e alterações da tonicidade celular, devem colaborar simultaneamente para a proteção miocárdica induzida pela administração da quinazolina DMA. Estudos focando as modificações mecánísticas dos vários grupos de genes deverão esclarecer a participação dos mesmos na proteção induzida por quinazolininas, bem como contribuir para a compreensão do fenômeno da proteção cardíaca.

Palavras-chave: cardioproteção, compostos quinazolínicos, expressão gênica, microarranjos de oligonucleotídeos, *Mus musculus*.

ABSTRACT

The term acute coronary syndrome includes unstable angina and myocardial infarction, which are frequent and potentially lethal clinical entities. Both situations are characterized by an imbalance between myocardial oxygen supply and demand, often triggered by the reduced perfusion caused by narrowing or occlusion of coronary arteries due to atherosclerosis. The high morbidity and mortality rates determined by these conditions are attributed mainly to loss of myocardial and electrical instabilities, arising not only from ischemia, but also from spontaneous or induced reperfusion of the ischemic regions. Thus, there is much interest in the development of strategies and pharmacological agents able to minimize the injuries caused not only by myocardial ischemia but also by reperfusion. Experimental and clinical data indicate that systemically administered adenosine (Ado) is able to protect the myocardium from ischemia/reperfusion injuries. The protection induced by Ado occurs in two phases, an acute (1-6 hours) and a late (1-3 days) phase after a single dose administration. While acute protection depends on activation of signaling pathways that mobilize end-effectors constitutively expressed in the cells, the late protection depends on the alterations of the expression of genes involved in multiple cellular functions. However, some characteristics of the systemic action of Ado, such as its short half-life and cardiovascular side effects (i.e. bradycardia and hypotension), are major barriers to its clinical use in acute coronary syndromes. One way to circumvent these undesirable effects is to use pharmacological agents that increase Ado bioavailability, as antagonists of its transporters or adenosine kinase (ADK) inhibitors. ADK is a key enzyme in the metabolism of purines that phosphorylates adenosine to AMP by ATP hydrolysis. In this context, we have previously demonstrated that derivatives of anilinoquinazolines are potent inhibitors of adenosine kinase and induce both acute and late phases of cardioprotection, as showed in isolated heart model. The present study was designed to investigate the transcriptional responses involved in late cardioprotection induced by administration of the anilinoquinazoline DMA. We used oligonucleotide microarrays containing representative sequences of all genes from mouse genome (~35 thousand genes). The RNA probes were synthesized from hearts of mice treated with DMA (30 mg/kg, single dose) ou vehicle (DMSO), 24 and 48 hours prior to tissue excision. We considered differentially expressed (fold change>[2.0], p<0.1) a total of 1061 genes in 24-hour and 844 genes in 48-hour groups, in comparison to vehicle treated samples.

Most of these transcripts were unknown genes (ESTs-Expressed Sequence Tags; 63% at 24 hours, 76% in 48 hours). In 24h transcriptome, most of the genes (75% of the known genes and 62% of ESTs) were upregulated, while in 48h transcriptome 56% of the known genes and 58% of ESTs were upregulated. The functional analysis of known genes showed large representation of classes associated with cell adhesion, signaling, transport and metabolism in 24 hours, and cell adhesion, development of multicellular organism and metabolism in 48 hours. The analysis of gene identities revealed few coincidences between the two transcriptomes, and clustering analysis performed to study the gene profile transition from 24 to 48h revealed that most genes presents transitory regulation of its expression (i.e., tendency of upregulation at 24h followed by downregulation at 48h and vice-versa). Analysis of differentially expressed genes in terms of metabolic and signaling pathways in which they are inserted allowed us to assess a putative metabolome of myocardial cells treated by the quinazoline DMA. Results indicated that the most affected pathways are glucose and lipids metabolism, PPAR- γ and adipocytokines, angiogenic responses, among others. Among these results, we confirmed experimentally the angiogenic effect of DMA and also the expression of genes and proteins associated with modifications in cardiac energy metabolism. Our results indicate that various cellular responses, including the energetic metabolism, ion homeostasis and changes in cell osmolarity, must cooperate to induce the cardioprotection phenotype after DMA administration. Studies focusing the mechanistic modifications of these groups of genes will contribute to elucidate their involvement in the protection induced by treatment with quinazolines, and will provide clues to comprehend myocardial protection phenomenon.

Keywords: cardioprotection, quinazolinic compounds, gene expression, oligonucleotide microarrays, *Mus musculus*.

1- INTRODUÇÃO

As doenças do sistema cardiovascular (DCV) são atualmente as principais causas de morbidade e mortalidade no Ocidente e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, este quadro atingirá proporções globais em meados de 2020 [Murray *et al*, 1997]. Nos Estados Unidos, as doenças cardiovasculares contribuem com 36% do total anual de óbitos (1 em cada 2,8 mortes) [Rosamond *et al*, 2007]. No Brasil, as mortes decorrentes de doenças cardiovasculares contribuem com 26% do total anual de óbitos [OPAS, 2006].

De modo geral, as doenças cardiovasculares incluem as doenças coronárias, cerebrovasculares e dos vasos periféricos – as chamadas doenças isquêmicas – além da hipertensão arterial e as doenças congênitas. As doenças coronárias ou doenças isquêmicas do coração compreendem o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a angina pectoris, entre outras, sendo responsáveis pela maioria absoluta dos óbitos por DCV nos EUA [Rosamond *et al*, 2007]. No Brasil, as doenças isquêmicas do coração ocupam o segundo lugar no ranking de óbitos, respondendo por 9,7% das mortes no país - a primeira posição é ocupada pelas doenças isquêmicas cerebrovasculares (10,1%) [OPAS, 2006].

1.1- Doenças isquêmicas do coração

Desde 1994, o termo Síndrome Coronária Aguda (SCA) vem sendo usado como designação genérica para se referir aos casos de IAM e/ou crises anginosas em pacientes que relatam dor torácica isquêmica no momento do atendimento hospitalar [Nicolau *et al*, 2007]. As SCA são classificadas da seguinte forma:

- (i) angina instável: síndrome que se inicia devido à ruptura de uma placa ateromatosa instável em uma artéria coronária, que ativa a adesão de plaquetas e pode levar à formação de coágulos de fibrina e trombose coronariana. Este processo pode evoluir para a oclusão definitiva, o que irá determinar o infarto do miocárdio [Nicolau *et al*, 2007].
- (ii) infarto agudo do miocárdio: ocorre na seqüência de uma angina instável em pessoas portadoras de doença coronariana ou pode ocorrer abruptamente em pessoas não-portadoras conhecidas de doença coronariana. O infarto significa a obstrução total

de uma artéria coronária causada pela ruptura de uma placa ateromatosa instável. Os danos para o organismo são sérios, pois quando esta obstrução ocorre, uma determinada região do músculo cardíaco fica privada de suprimento de oxigênio e micronutrientes, comprometendo a contração muscular e, por conseguinte, levando ao deterioramento da função cardíaca [Nicolau *et al*, 2007].

A depender da duração e abrangência do episódio isquêmico, o IAM pode progredir rapidamente para o óbito do indivíduo. Além do estresse ocasionado pelo período de isquemia, outro fator que estabelece uma situação crítica para as células cardíacas é a reperfusão. A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações funcionais e estruturais que ocorrem durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. Em adição à reversão da isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em vários efeitos deletérios: necrose de células irreversivelmente lesadas, edema celular e restauração não-uniforme do fluxo para todas as porções do tecido [Evora *et al*, 1996].

Assim, de modo geral, os elevados índices de morbidade e mortalidade advindos das doenças isquêmicas do coração podem ser atribuídos à perda de massa miocárdica e à instabilidade elétrica decorrentes tanto da isquemia quanto da reperfusão subsequente nas áreas do miocárdio isquêmico. Assim, a preservação da viabilidade do miocárdio isquêmico é reconhecida como uma das principais metas da cardiologia atual.

1.2- Precondicionamento isquêmico do miocárdio

Em 1986, Murry e colegas observaram, pela primeira vez, que a indução de períodos curtos de isquemia (I) com reperfusão (R) intermitente (4 ciclos de 5 minutos I + 5 minutos R) limitou drasticamente a extensão do infarto provocado por oclusão coronária total em cães (redução de aproximadamente 75% na área necrosada) [Murry *et al*, 1986]. Este fenômeno, que foi denominado condicionamento isquêmico, despertou um profundo interesse pela possibilidade de ser utilizado como estratégia de prevenção secundária aos danos causados no coração submetido à isquemia prolongada.

A cardioproteção intrínseca induzida pelo condicionamento isquêmico foi posteriormente observada em várias espécies, como camundongos [Sumeray & Yellon, 1998], ratos [Li & Kloner, 1992] e primatas [Shen *et al*, 1996], e em todas o condicionamento promoveu alterações na fisiologia do coração, de forma a torná-lo mais resistente ao infarto. Muitos destes estudos demonstraram que o condicionamento atua de maneira a atrasar a morte celular mais do que prevenir, uma vez que age como se o evento isquêmico durasse cerca de 20-30 minutos a menos do que sua real duração [Yellon & Downey, 2003]. A investigação intensiva deste fenômeno também já permitiu observar que o mesmo tipo de protocolo de condicionamento isquêmico induz proteção em outros tecidos além do coração, como cérebro [Dawson & Dawson, 2000], músculo esquelético [Adanali *et al*, 2002], pulmão [Gasparri *et al*, 1999], intestino [Aksoyek *et al*, 2000], rins [Bonventre, 2002], retina [Sakamoto *et al*, 2004] e testículos [Sahinkanat, 2007].

Posteriormente, descobriu-se que o condicionamento apresenta duas fases distintas de cardioproteção: uma fase imediata ou aguda (chamada de condicionamento clássico), que se manifesta minutos após a indução do estímulo subletal e perdura por 2 a 3 horas, e uma fase tardia (ou SWOP - *Second Wave Of Protection*), que se manifesta aproximadamente 24 horas após o estímulo e se prolonga por cerca de 72 horas [Kuzuya *et al*, 1993; Marber *et al*, 1993].

A diferença marcante entre ambas as fases é o poder cardioprotetor: enquanto na fase clássica essa proteção é maior, na fase tardia a proteção é menos eficaz, mas mais duradoura. Além disso, estudos demonstraram que, além de aumentar a tolerância aos danos provocados pela isquemia prolongada, a fase tardia confere proteção também às arritmias decorrentes da isquemia [Vegh *et al*, 1992] e disfunção contrátil [Bolli *et al*, 1997; Sun *et al*, 1995]. Isto, mais o fato de ser mais duradoura, apontam a fase tardia como mais relevante clinicamente e, portanto, alvo principal dos estudos que buscam compreender os mecanismos envolvidos na cardioproteção [Baxter & FP, 2001].

A defasagem entre as duas fases da cardioproteção induzida pelo condicionamento permitiu ainda que se admitisse que, enquanto a fase aguda possivelmente se deve à mobilização de proteínas sinalizadoras pré-existentes, modificações pós-transcricionais ou alterações na compartimentalização intracelular, a fase

tardia deve ser sustentada na síntese *de novo* de proteínas [Baxter *et al.*, 1997]. Esta característica também torna a fase tardia um alvo terapêutico de interesse, uma vez que apresenta maior potencial para a interferência direta na expressão de proteínas-chave a cardioproteção.

Por sua importância e relevância na terapêutica das doenças isquêmicas, o fenômeno da cardioproteção induzida pelo condicionamento isquêmico recebeu grande atenção científica, e inúmeros estudos foram conduzidos buscando compreender os mecanismos moleculares associados a este fenótipo, seja na fase aguda como na fase tardia da proteção.

1.3- Modelo geral da cardioproteção induzida pelo condicionamento isquêmico

Dados de diversas fontes (ver revisão em [Yellon & Downey, 2003]) indicam que as duas fases do condicionamento compartilham um modelo bioquímico geral, em que os eventos de isquemia/reperfusão curtos provocariam a síntese e/ou liberação de substâncias localmente. Estas moléculas, atuando via receptores de membrana, iniciariam mecanismos de sinalização intracelular que culminariam na mobilização de efetores finais, os quais, através de sua ação durante a isquemia prolongada, determinam a proteção miocárdica observada no período de reperfusão contínua.

Além disso, admite-se que, em algum ponto entre os sinais de disparo emitidos pelos elementos desencadeadores, passando pelos elementos mediadores e culminando na mobilização dos efetores finais, deve existir um elemento de memória que mantém o coração no estado condicionado. Esta lógica parece ser essencial para explicar a existência de uma resposta tardia [Yellon & Downey, 2003].

Em termos celulares, a injúria causada pela isquemia/reperfusão parece estar associada à geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e à severa sobrecarga de cálcio na mitocôndria, principalmente durante o período de reperfusão. Ambos culminariam na abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPm) durante a reperfusão, fator que resulta na depleção do ATP, oxidação

irreversível de lipídeos, proteínas e DNA nos cardiomiócitos e desencadearia as respostas de morte celular [Halestrap *et al*, 2004]. Partindo-se deste modelo de agressão celular, diversos estudos sugerem que a preservação da viabilidade mitocondrial através da inibição da formação do PTPm deve ser posicionada como elemento central no mecanismo molecular da proteção miocárdica [Halestrap *et al*, 2004; Lemasters *et al*, 1997; Di Lisa & Bernardi, 2006].

1.4- Cardioproteção aguda

Desde 1990, mais de 3000 estudos foram publicados enfocando os vários aspectos dos mecanismos moleculares do preconditionamento isquêmico do miocárdio e de outros tecidos, e a maioria destes estudos concentra-se na fase aguda da proteção [Ferdinandy *et al*, 2007]. Tais estudos já permitiram elucidar alguns componentes essenciais da cardioproteção, que foram didaticamente classificados de acordo com sua posição na sinalização desencadeada pelo preconditionamento.

1.4.1- Elementos desencadeadores

Entre os elementos desencadeadores do preconditionamento citam-se, além da isquemia, choque térmico, eventos elétricos agudos, exercício e estímulos farmacológicos (adenosina, bradicinina, opióides, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, endotoxinas) [Yellon & Downey, 2003]. Sabe-se atualmente que qualquer receptor associado à proteína G_i pode desencadear o estado preconditionado e, de fato, múltiplos receptores atuam em paralelo para gerar um sinal redundante do estímulo de preconditionamento [Yellon & Downey, 2003; Goto *et al*, 1995]. Interessante, o bloqueio de um destes receptores parece atuar aumentando o limiar de estímulo isquêmico necessário para desencadear a proteção, ao invés de simplesmente impedir o preconditionamento [Goto *et al*, 1995].

Evidências obtidas em diversos modelos experimentais indicam um papel fundamental da adenosina e do óxido nítrico na indução da cardioproteção [Baxter *et al*, 1997; Baxter *et al*, 1994]. A adenosina é um autacóide com amplo espectro de ação na fisiologia dos órgãos e tecidos e, entre seus efeitos, sobressaem-se a proteção neuronal

[Rudolphi *et al*, 1992] e miocárdica [Dougherty *et al*, xxxx]. Em particular à cardioproteção, diversos estudos demonstraram, tanto *in vitro* como *in vivo*, que a administração de adenosina exógena ou de agonistas dos receptores de adenosina A₁ e A₃ é capaz de reduzir o tamanho do infarto, melhorar o restabelecimento das funções ventriculares durante a reperfusão e prolongar o intervalo antes do músculo atingir a contratura isquêmica [Donato & Gelpi, 2003]. Além disso, no coração a adenosina desempenha importante papel na regulação do crescimento e diferenciação, angiogênese, fluxo sanguíneo coronário, condução e frequência cardíacas, substrato metabólico e sensibilidade ao estímulo adrenérgico [Headrick *et al*, 2003].

Em relação ao óxido nítrico (NO), estudos recentes apontam que tanto o NO endógeno como o exógeno representam uma importante defesa contra a injúria causada pela isquemia/reperfusão em miocárdio (ver revisão em [Jones & Bolli, 2006; Bolli, 2001]). Interessante, estudos indicam que o papel do NO na fase aguda (precondicionamento clássico) parece diferir da ação na fase tardia (SWOP): enquanto a síntese de NO endógeno parece não ser necessária para desencadear a fase aguda do condicionamento isquêmico (apesar da suplementação com NO exógeno desencadear esta proteção), existe um absoluto requerimento de NO para a ocorrência da fase tardia.

1.4.2- Elementos mediadores

Parece bastante provável que múltiplas vias de sinalização atuem de forma convergente sobre a mitocôndria, seja preservando a síntese de ATP ou prevenindo a formação do mPTP após a reperfusão, ou ambos. Estas vias têm sido alvos de inúmeros estudos (ver revisão em [Hausenloy & Yellon, 2006]). As principais quinases identificadas e que exercem papel essencial no condicionamento clássico são a proteína quinase C (PKC) [Buday *et al*, 2007], fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) e seu substrato Akt [Mocanu & Yellon, 2007], p38 MAPK [Steenbergen 2002], p42/p44 MAPK/ERK [Strohm *et al*, 2000], os receptores de tirosinas quinase da família Src [Oldenburg *et al*, 2003] e a via JAK/STAT [Barry *et al*, 2007].

1.4.3- Efetores finais

Os efetores finais do condicionamento clássico ainda não foram satisfatoriamente elucidados, mas alguns já foram propostos: os canais de potássio mitocondriais (mitoK_{ATP}) [Holmuhamedov *et al*, 1999], os trocadores de sódio/hidrogênio [Xiao & Allen, 2000], discos intercalares [Garcia-Dorado *et al*, 2002], fatores inibidores de apoptose [Gottlieb *et al*, 1994], entre outros.

Atualmente, há um consenso sobre a importância dos canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) no condicionamento cardíaco. Inicialmente, estudos demonstraram que a administração de substâncias que promoviam a abertura dos canais K_{ATP} não só mimetizavam os efeitos cardioprotetores, como os bloqueadores desses canais aboliam a proteção induzida pelo condicionamento isquêmico [Gross & Auchampach, 1992; Schulz *et al*, 1994; Van Winkle *et al*, 1994]. Posteriormente, utilizando bloqueadores específicos para os dois tipos de canais K_{ATP} presentes nos cardiomiócitos (canais da membrana sarcoplasmática, scK_{ATP} e canais mitocondriais, mitoK_{ATP}), demonstrou-se que a proteção é conferida apenas pelos canais mitoK_{ATP} [Garlid *et al*, 1997; Liu *et al*, 1998].

Entre outras explicações de como os canais mitoK_{ATP} atuam protegendo o coração, Pain e colegas [Pain *et al*, 2000] sugeriram que sua abertura estimularia a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria, e estes radicais livres ativariam uma cascata de quinases que modulariam os efetores finais do condicionamento. Esta hipótese explicaria ainda a necessidade da reperfusão para haver o estímulo de proteção, uma vez que apenas na presença do oxigênio as EROs seriam produzidas, completando a sinalização do condicionamento [Yellon & Downey, 2003].

Outro modelo proposto para explicar o papel da abertura dos canais mitoK_{ATP} na cardioproteção é de autoria de Garlid e colegas [Santos *et al*, 2002; Laclau *et al*, 2001], que argumentam que o influxo de potássio promovido por sua abertura é acompanhado pela entrada de água na matriz mitocondrial, induzindo um inchaço osmótico (*osmotic swelling*) da mitocôndria. Este efeito causaria um sutil aumento na justaposição dos componentes da membrana interna e externa da mitocôndria, preservando a permeabilidade ao ADP e ATP e o acoplamento funcional entre a translocase de adenina e a creatina quinase mitocondrial.

Assim, através deste mecanismo, preservaria-se o *pool* de nucleotídeos de adenina durante a isquemia e a eficiente transferência de energia durante a reperfusão.

1.5- Cardioproteção tardia

Os mecanismos da fase tardia são bastante similares aos da fase clássica [Yellon & Downey, 2003]. Entretanto, estudos demonstraram que, além de aumentar a tolerância aos danos provocados pelo infarto, a fase tardia confere proteção também às arritmias decorrentes da isquemia [Vegh *et al*, 1992] e disfunções contráteis [Sun *et al*, 1995].

O envolvimento dos receptores de adenosina na fase tardia da cardioproteção foi demonstrado por estudos utilizando agonistas dos receptores de adenosina A₁ e A₃, e estes tratamentos foram capazes de induzir cardioproteção tardia semelhante à proteção induzida por condicionamento isquêmico [Takano *et al*, 2001; Auchampach *et al*, 1997]. Entretanto, apesar de efetiva contra o infarto, esta proteção tardia mostrou-se ineficaz contra as disfunções contráteis [Auchampach *et al*, 1997].

Interessante, Tsuchida e colegas buscaram manter o coração no estado de condicionamento agudo através da infusão contínua de 2-cloro-N⁶-ciclopentil-adenosina (CCPA), agonista dos receptores A₁ de adenosina. Entretanto, os autores não conseguiram demonstrar nenhuma cardioproteção, devido ao que eles julgaram ser efeito da dessensibilização dos receptores [Tsuchida *et al*, 1994]. Dana e colegas superaram este problema através da administração de CCPA em intervalos de 48 horas durante 10 dias, e durante todo este período ocorreu proteção efetiva sem qualquer evidência de dessensibilização dos receptores A₁ [Dana *et al*, 1998].

Estes resultados demonstram que a sinalização via receptores de adenosina não se restringe apenas à fase aguda da cardioproteção, mas também parece ser necessária durante a fase tardia. Da mesma forma, a literatura traz demonstrações de que antagonistas farmacológicos dos receptores de adenosina impedem o condicionamento miocárdico [Kitakase *et al*, 1994; Liu *et al*, 1991].

A importância do óxido nítrico (NO) na fase tardia foi demonstrada através da administração de bloqueador de NO (NG-nitro-L-arginina, L-NA) 24 horas após a indução de condicionamento isquêmico. Houve bloqueio da proteção cardíaca contra infarto [Takano *et al*, 1998] e contra disfunções contráteis [Bolli *et al*, 1997]. Além disso, conforme os estudos revisados por Bolli em [Jones & Bolli, 2006; Bolli, 2001], na fase tardia o óxido nítrico participa em dois momentos: o NO proveniente de atividade da eNOS (*endothelial NO synthase*) desempenha um papel desencadeador, enquanto o NO proveniente da atividade de iNOS (*inducible NO synthase*) atua como mediador da cardioproteção. Este papel duplo reafirma a importância do NO para a sinalização da fase tardia da cardioproteção.

As cascatas de transdução ativadas pelos elementos desencadeadores parecem ser essencialmente as mesmas das presentes no condicionamento clássico, notadamente as vias da PKC e das MAPKs [Yellon & Downey, 2003]. No entanto, a fase tardia parece exigir a translocação da isoforma epsilon da PKC (PKC- ϵ) e, caso esta atividade seja bloqueada, a proteção contra disfunções contráteis é totalmente bloqueada [Qiu *et al*, 1998].

Possíveis efetores finais do condicionamento cardíaco ativados por estas cascatas transdutoras incluem as proteínas de choque térmico HSP72 [Dillman *et al*, 1986] e HSP27 [Dana *et al*, 2000], mas seu papel no estabelecimento da fase tardia ainda requer maiores investigações [Yellon & Downey, 2003]. Outros possíveis efetores induzidos por este quadro são as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase [Hoshida *et al*, 1993]. Além disso, a abertura dos canais mitoK_{ATP} também parece ser um elemento efetor da proteção miocárdica tardia [Takashi *et al*, 1999].

1.6- Poscondicionamento isquêmico

Recentemente, Zhao e colegas descreveram o fenômeno denominado poscondicionamento, em que ciclos curtos de reperfusão coronária alternada com re-oclusão aplicados imediatamente após o início da reperfusão em corações isquêmicos

promoveram uma sensível redução da injúria pós-isquêmica [Zhao *et al*, 2003]. O poscondicionamento parece ser efetivo apenas se conduzido durante os primeiros minutos da reperfusão e, neste caso, possui um poder protetor semelhante àquele induzido pelo preconditionamento (i.e., redução da extensão do infarto, preservação da função endotelial, inibição das respostas apoptóticas). Os mecanismos envolvidos no fenômeno do poscondicionamento ainda requerem estudos intensivos, e são atualmente menos compreendidos do que aqueles envolvidos no preconditionamento [Ferdinandy *et al*, 2007].

1.7- Expressão de genes e proteínas na cardioproteção

Dado que os mecanismos de cardioproteção se devem à ativação simultânea de diversos elementos mediadores que atuam de forma seqüencial, é provável que a resposta final seja consequência da ação simultânea de várias proteínas efetoras ligadas a mecanismos celulares diversos, como adesão e migração celular e efetores antioxidantes. Nestes casos, a avaliação simultânea do perfil transcricional de tipos celulares ou do próprio miocárdio pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na proteção miocárdica tardia, induzida pelo estímulo natural ou mesmos por estímulos farmacológicos [Schena *et al*, 1995].

Apesar da idéia de que vários genes devem ser regulados na proteção tardia ser intuitiva, são ainda escassos e pouco conclusivos os estudos que avaliaram a expressão gênica global envolvida nas respostas aguda e tardia da proteção miocárdica em modelos experimentais.

Um estudo investigou a fase aguda da proteção miocárdica através de microarranjos de DNA contendo 3200 genes de rato, a partir dos quais foram detectados 31 genes diferencialmente expressos entre a situação isquemia/reperfusão em corações preconditionados em relação ao controle [Onody *et al*, 2003]. Entre estes genes, sobressaíram-se aqueles relacionados à degradação protéica, resposta ao estresse, apoptose e enzimas metabólicas.

Já outro estudo que investigou a fase tardia adotou a técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*) anteriormente à produção dos microarranjos de DNA, de forma a pré-selecionar genes candidatos [Zubakov *et al*, 2003]. Segundo seus

resultados, foram induzidos genes codificadores de tristetraprolina (TTP), metaloproteinase 9 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

Em um terceiro trabalho, da Silva e colaboradores utilizaram microarranjos de oligonucleotídeos para investigar diferenças entre o perfil transcricional envolvido na cardioproteção induzida pelo condicionamento isquêmico e pelo condicionamento farmacológico [da Silva *et al.*, 2004]. Ambas as situações foram avaliadas em corações isolados e comparadas segundo a presença ou ausência da isquemia prolongada (40 minutos). A intenção foi avaliar as respostas desencadeadoras (ausência da isquemia prolongada) e as respostas mediadoras/efetoras (presença da isquemia prolongada) da cardioproteção. Os autores encontraram que, em relação às respostas desencadeadoras, os dois tipos de condicionamento aparentemente apresentam mecanismos distintos. No entanto, em relação às respostas mediadoras/efetoras, as bases moleculares foram relativamente uniformes entre ambos. As diferenças entre os grupos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico, bem como entre as respostas desencadeadoras e mediadoras/efetoras, foram predominantemente relacionadas às vias de biossíntese e de apoptose.

Um trabalho recente adotou a estratégia da proteômica para investigar as proteínas diferencialmente expressas após tratamento farmacológico capaz de induzir um quadro de proteção cardíaca [Arrel *et al.*, 2006]. Neste estudo, os autores trataram cardiomiócitos com adenosina ou diazoxida, compostos conhecidos por seus efeitos cardioprotetores, e avaliaram a expressão de proteínas na fase aguda da proteção. Foi observado que a maioria delas estava envolvida no metabolismo energético mitocondrial, incluindo componentes do ciclo tricarboxílico (TCA) e da cadeia fosforilativa da mitocôndria. Os autores chamaram a atenção para o fato de que relativamente poucas proteínas apresentaram-se diferencialmente expressas (15 no tratamento por diazoxida, 13 por adenosina e 9 proteínas afetadas em ambos) e, destas, 4 apresentaram modificações pós-traducionais. Particularmente, os autores citam a identificação de 5 novos sítios de fosforilação na subunidade beta da ATP sintase (*ATP synthase β subunit*), conforme observado nas amostras tratadas por adenosina.

1.8- Cardioproteção induzida por agentes farmacológicos

Como os mecanismos de condicionamento agudo e tardio são ativados por agonistas endógenos que exercem seus efeitos através da ativação de vias de sinalização intracelular, é plausível admitir que proteção miocárdica semelhante àquela do condicionamento isquêmico possa ser induzida por agentes farmacológicos com efeitos específicos nas diversas etapas, ou seja, iniciação, mediação e efetuação da resposta de cardioproteção.

É óbvia a importância de se encontrar agentes farmacológicos que possam ser utilizados de forma segura e eficaz para a indução de proteção nas várias condições clínicas acompanhadas de isquemia miocárdica. Além disso, os agentes farmacológicos podem ser utilizados como ferramentas para o entendimento dos mecanismos e etapas envolvidas na sinalização e efetuação da proteção miocárdica.

Estudos têm demonstrado os efeitos cardioprotetores de alguns agentes farmacológicos, como os anestésicos halogenados (isoflurano, halotano, desflurano) - via ativação de receptores associados à proteína G e abertura dos canais mitoK_{ATP} [Cope *et al*, 1997; Preckel *et al*, 1998] e preservação da homeostase de cálcio [Na *et al*, 2007]; morfina - via ativação de receptores opióides [Schultz *et al*, 1996]; administração concomitante de CCPA e lidocaína - via ativação dos receptores A₁ de adenosina e modulação dos canais de sódio, respectivamente [Canyon & Dobson, 2005]; nitroglicerina - através da geração de óxido nítrico, desencadeando a fase tardia da cardioproteção [Lascano *et al*, 2007]; diazoxida e pinacidil - através da abertura dos canais mitoK_{ATP} [Ozcan *et al*, 2002]; iodotubercidina - via alteração do metabolismo de adenosina [Willems & Headrick, 2005; Peart & Gross, 2005]; a fitoalexina reverastrol - via ativação dos receptores A₁ e A₃ de adenosina [Das *et al*, 2005], entre outros.

Apesar das demonstrações experimentais de que agentes farmacológicos diversos podem induzir proteção miocárdica, os resultados de aplicação às situações clínicas em vários estudos foram, até o momento, decepcionantes. Por exemplo, no caso dos agentes que promovem a abertura dos canais de potássio, atualmente sua aplicação ainda se mostra impraticável, devido ao fato de que para a ocorrência dos efeitos

anti-isquêmicos são necessárias doses muito mais altas do que aquelas necessárias para o relaxamento da musculatura lisa dos vasos, causando efeitos hemodinâmicos secundários à vasodilatação muito antes dos efeitos cardioprotetores [Perrault & Menasché, 1999]. A nitroglicerina apresenta um efeito limitado em animais conscientes submetidos à isquemia prolongada, uma vez que protege contra arritmias, mas não contra a contratura (*stunning*) do miocárdio [Lascano *et al*, 2007]. No caso da cardioproteção induzida por agentes que afetam o metabolismo de adenosina, existe a necessidade de que as vias alternativas de síntese e/ou recuperação de purinas estejam funcionais [Willems & Headrick, 2005]. A utilização de compostos anestésicos para induzir a cardioproteção, apesar de já estar sendo utilizada em alguns procedimentos cirúrgicos cardiovasculares, ainda requer estudos sobre os mecanismos de ação e efeitos na mortalidade pós-operatória [De Hert *et al*, 2005].

Neste contexto, estudos recentes em nosso laboratório indicaram que compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de adenosina quinase induzem proteção miocárdica tanto aguda [Marin, 2005] como tardia [Rolim, 2005]. Nossos dados indicam que a proteção miocárdica conferida pelos referidos compostos se deve ao aumento da biodisponibilidade de adenosina. Assim, a expectativa é de que estes compostos tenham utilidade clínica, já que atuam através da mobilização de mecanismos endógenos de cardioproteção. Por outro lado, estes compostos também oferecem a oportunidade de estudar os mecanismos de proteção miocárdica com aqueles induzidos por isquemia transitória.

Assim, o presente estudo foi conduzido utilizando uma abordagem ampla para investigar as respostas do miocárdio ao tratamento por estes compostos quinazolínicos, utilizando os microarranjos de DNA para estudar a expressão gênica ampla desencadeada na fase tardia da cardioproteção.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar a expressão gênica ampla na fase tardia da cardioproteção desencadeada pelo composto quinazolínico DMA (cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-[3'-N,N-dimetilfenil] aminoquinazolina) em coração de camundongos.

2.2- Objetivos Específicos

- (1) comparar a expressão gênica induzida 24 e 48 horas após a administração, em dose única, do DMA;
- (2) caracterizar a regulação temporal dos perfis de expressão desencadeados em miocárdio 24 e 48 horas após o tratamento;
- (3) analisar a inter-relação funcional dos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento pelo DMA;
- (4) determinar as vias metabólicas e de sinalização afetadas na fase tardia após o tratamento pelo DMA;
- (5) confirmar, em exemplos representativos, as alterações de expressão gênica observadas;
- (6) avaliar como os resultados de expressão gênica podem explicar a cardioproteção induzida por DMA.

3- METODOLOGIA

3.1- Compostos Quinazolínicos

Derivados quinazolínicos foram sintetizados em nosso laboratório pela Dra. Silvana A. Rocco (Pós-doutorado – Fapesp 02/10002-6) em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Rittner do Laboratório de Fisico-Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas [Rocco *et al*, 2004]. Em nossos experimentos foi utilizado o composto quinazolínico identificado por DMA (cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-[3'-N,N-dimetilfenil] aminoquinazolina).

3.2- Grupos experimentais

3.2.1- Grupos para estudo da preservação funcional do miocárdio tratado por DMA e submetido a isquemia/reperfusão

Camundongos (*Mus musculus*) isogênicos Balb/c machos adultos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas – SP, foram tratados com o composto quinazolínico DMA, administrado na forma de gavagem, em dose única de 30mg/kg (grupo DMA, “D”). Aos animais controle apenas o veículo (DMSO) foi administrado (grupo controle, “C”). Após transcorridas 24 horas, 6 animais de cada grupo tiveram o coração extirpado e imediatamente conectado ao sistema de perfusão (grupos D24 e C24). Após um período de 15 minutos de estabilização, iniciou-se período de registro controle da pressão do ventrículo esquerdo, seguidos de um período de 40 minutos de isquemia provocada por interrupção do fluxo coronário. Após este período, o coração foi reperfundido e então a pressão ventricular foi registrada por mais 35 minutos. Da mesma forma, foram avaliados os corações de animais sacrificados após 48 horas (grupos D48 e C48, n=14 cada) e 72 horas (grupos D72 e C72, n=6 cada). Os registros foram obtidos individualmente para cada animal, e os valores apresentados como médias para cada grupo.

3.2.2- Grupos para estudo da expressão gênica desencadeada em miocárdio pelo tratamento pelo DMA

Camundongos isogênicos Balb/c machos adultos foram tratados com o composto quinazolínico DMA, administrado na forma de gavagem, em dose única de 30 mg/kg (grupo DMA, “D”). Aos animais controle apenas o veículo (DMSO) foi administrado (grupo controle, “C”). Após transcorridas 24 horas, 6 animais de cada grupo tiveram o coração extirpado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para preservar a integridade das moléculas transcritas no tecido no momento da coleta (grupos D24 e C24). Os animais restantes tiveram seus corações extirpados e armazenados após transcorridas 48 horas (grupos D48 e C48, n=6 cada). Para cada grupo, os corações foram armazenados conjuntamente de forma a gerar um *pool* de RNA destas amostras. Para ampliar a significância estatística e biológica de nossa investigação, realizamos estes experimentos em triplicata, totalizando então 12 grupos (D24₁₋₃, C24₁₋₃, D48₁₋₃ e C48₁₋₃), cada um constituído de 6 corações.

3.3- Extração do RNA total

O RNA total foi extraído do *pool* de corações obtidos em cada grupo experimental, através do protocolo baseado em *TRIZOL* (*Invitrogen*), que utiliza por princípio o método de fenol/guanidino isotiocianato. Resumidamente, o tecido foi macerado na presença de nitrogênio líquido, transferido para tubos *ependorfs* e imediatamente adicionado de *TRIZOL* para garantir degradação mínima das moléculas de RNA. O volume do reagente utilizado seguiu a proporção de 1 ml para cada 50-100mg de tecido. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos para sedimentar o material insolúvel, como restos celulares, proteínas e lipídeos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo *ependorf* e incubado a 30°C por 5 minutos para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas. Em seguida, foram adicionados 200µl de clorofórmio, incubando-se novamente a 30°C por 3 minutos e centrifugando-se por 15 minutos a 12000g. Após esta etapa, a solução divide-se em duas fases, uma orgânica e uma aquosa, esta última contendo as moléculas de RNA. Transferiu-se esta

fase aquosa para novo tubo *ependorf* e adicionou-se 500µl de álcool isopropílico para precipitar o RNA. Após incubar o material a 30°C durante 5 minutos, centrifugou-se a 12000 x g por 10 minutos e, ao fim desse passo, pôde ser observado nos tubos um *pellet* referente ao RNA total precipitado. Descartou-se o sobrenadante e o RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas, desta vez a 7500 x g durante 5 minutos apenas para sedimentar o RNA, descartando-se em seguida o sobrenadante. Após deixar secar brevemente, o material foi ressuspenso em água DEPC (dietilpirocarbonato), incubando-se a 50°C por cerca de 10 minutos para garantir a completa dissolução do RNA. Este material foi armazenado para as reações posteriores a -80°C.

3.4- Produção dos microarranjos de oligonucleotídeos

Avaliamos a expressão gênica ampla do miocárdio através do uso dos microarranjos comerciais *Codelink® Whole Genome Mouse Bioarrays (GE Healthcare)*, que contém 35 mil seqüências transcritas presentes no genoma do camundongo. Cada lâmina foi utilizada para a hibridação com uma amostra de RNA, de forma que 12 lâminas foram produzidas a partir dos grupos experimentais C24₁₋₃, D24₁₋₃, C48₁₋₃ e D48₁₋₃. Os protocolos detalhados para a produção dos experimentos utilizando a plataforma *Codelink®* estão disponíveis para consulta no endereço <http://www.codelinkbioarrays.com>. Resumidamente, os RNAs totais foram purificados seguindo o protocolo das colunas de purificação (*Rneasy Mini Kit, Qiagen*) e quantificados no espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer*. A partir de 2µg de RNA total foi sintetizada a fita de DNA complementar (cDNA) na presença de oligodT-T7, que insere o sítio de reconhecimento da enzima T7 RNA polimerase. Após a síntese da segunda fita de cDNA, as amostras foram incubadas por 20 horas na presença desta enzima e de UTP biotilado (*biotin 11-UTP, Perkin Elmer*) para a transcrição *in vitro* do RNA complementar (cRNA) contendo nucleotídeos uracila biotilados. Este cRNA foi novamente purificado (*Rneasy Mini Kit, Qiagen*) e quantificado no espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer*. Um total de 10µg de cRNA foi aliqotado e estocado a -80°C em 20µl de água *RNAse-free*. Os procedimentos posteriores foram conduzidos em um

laboratório equipado com a plataforma *Codelink*[®] (Laboratório de Ginecologia Molecular, UNIFESP). Os cRNAs foram fragmentados e aplicados nas lâminas. As lâminas foram incubadas a 37°C por 20 horas a 300rpm. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas por imersão em solução 0.1M Tris.Cl, pH 7.6 + 0.15M NaCl +0.05% Tween 20 a 46°C por 1 hora. A seguir, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em solução 1:500 *Cy5-streptavidin* em 0.1M Tris.Cl, pH7.6 + 0.15M NaCl + 0.5% solução de bloqueio (*NEN Blocking Reagent, Perkin Elmer*). Nesta etapa, o fluoróforo foi conjugado com a biotina presente nas sequências hibridizadas na lâmina. As lâminas foram novamente lavadas por 4 etapas de imersão em solução 0.1M Tris.Cl, pH 7.6 + 0.15M NaCl +0.05% Tween 20 e 1 etapa de imersão em solução 0.1x SSC + 0.05% Tween 20. Finalmente, as lâminas foram digitalizadas em *scanner* a laser (*Genepix Array Scanner*) e as respectivas imagens analisadas pelo programa *Codelink*[®] *Expression Analysis*, ambos de propriedade da *GE Healthcare*.

3.5- Controles técnicos dos microarranjos de oligonucleotídeos

A produção dos microarranjos *Codelink* incluiu diversas etapas de checagem da qualidade dos experimentos, de forma a garantir a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos resultados. Além da preparação do protocolo utilizando RNA total fornecido pelo fabricante (1µg/µl *HeLa total RNA*) para testar os reagentes de síntese da primeira e segunda fitas de cDNA, e uso do plasmídeo pTRI-XefI para testar os reagentes da transcrição *in vitro*, a produção dos microarranjos também incluiu a checagem dos sinais emitidos por sequências-controle presentes em cada uma das lâminas utilizadas. Os controles positivos foram obtidos através da adição de transcritos específicos de origem bacteriana (*araB; entF; fixB; gnd; hisB; leuB*) durante a síntese das sondas, na proporção de 1:10⁷ em relação ao RNA total de miocárdio de camundongo, um valor próximo daquele esperado para os transcritos raros. Uma vez que estes genes bacterianos possuem representatividade de sequência nas lâminas *Codelink* (50 réplicas de cada gene), então o sinal emitido por eles após a hibridação e marcação das sondas permitiu avaliar a sensibilidade do experimento. Já os controles negativos se referem ao sinal emitido por

sequências de genes bacterianos presentes nas lâminas *Codelink*, os quais não foram acrescentados à sonda (*araA*; *leuA*; *malF*; *rafA*; *rafB*; *rafD* – 30 a 70 réplicas cada). Neste caso, foi possível acessar a especificidade dos experimentos. Estes sinais foram avaliados após o processamento dos dados, de forma a estabelecer um critério para a checagem da qualidade de cada experimento.

3.6- Processamento dos dados

O programa de quantificação automática *Codelink*[®] *Expression Analysis* realizou a estimativa dos sinais fluorescentes emitidos por cada sequência gênica presente em cada uma das lâminas, bem como os sinais emitidos pela fluorescência de fundo (*background*) presente na área adjacente a cada um destes genes. A análise destes dados foi realizada pelo pacote *Codelink* do repositório público Bioconductor [Diez *et al*, 2007]. Os dados foram normalizados entre os microarranjos replicados e entre os microarranjos representando as condições a serem comparadas, de forma a minimizar variações advindas de artefatos técnicos. Para isto foi utilizado o método *Lowess* (*Locally Weighted Least Square Regression*), em que os valores são ajustados por um polinômio definido a partir da distribuição dos dados em um gráfico MxA:

$M = \log_2[\text{expressão gene}_i \text{ na amostra "D"}] - \log_2[\text{expressão gene}_i \text{ na amostra "C"}];$

$A = \frac{1}{2} \{ \log_2[\text{expressão gene}_i \text{ na amostra "D"}] + \log_2[\text{expressão gene}_i \text{ na amostra "C"}] \},$

sendo “D” a amostra tratada e “C” a amostra controle.

Nesta análise, assume-se que a maior parte das alterações presentes nos dados não reflete um real significado biológico [Yang *et al*, 2002]. A seguir, os valores normalizados foram submetidos à análise estatística (teste-t ajustado) de forma a pontuar tanto a amplitude da variação entre os experimentos quanto a homogeneidade das réplicas [Smyth, 2004]. Assumimos um valor de corte de no máximo 10% de heterogeneidade entre as réplicas ($p < 0.1$) e uma variação de expressão (*fold change*) de, no mínimo, duas vezes para que um gene fosse considerado diferencialmente expresso:

$F = \text{variação da expressão gene}_i = \text{expressão gene}_i \text{ na amostra D} \div \text{expressão gene}_i \text{ amostra C, se } F < 1.0, \text{ então } F' = -1/F.$

Esta transformação é feita para casos em que a expressão do gene_i na amostra controle “C” é maior que sua expressão na amostra tratada “D”, então a variação de sua expressão passa a ser representada por valores negativos (gene reprimido). Gráficos do tipo Volcano (significância estatística x variação de expressão) foram gerados para a visualização da distribuição dos dados de expressão gênica [Smyth, 2004]. À coleção de genes diferencialmente expressos nos dois períodos transcorridos após o tratamento pelo DMA foi dado o nome de transcrito de 24 horas e de 48 horas. As identidades e valores de expressão dos genes diferenciais em ambos os períodos estão apresentadas nos Apêndices 1 e 2.

3.7- Análise funcional dos genes conhecidos

A anotação funcional dos genes conhecidos presentes em ambos os transcritomas se baseou nos critérios estabelecidos pelo Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>). As classes funcionais foram selecionadas a partir da classificação utilizada para descrever o transcrito de camundongo [Okazaki *et al*, 2002]. Os mesmos critérios foram utilizados para a anotação das seqüências presentes nas lâminas *Codelink*. Desta forma, foi avaliado se a ocorrência de determinada categoria nos transcritomas de 24 e/ou 48 horas poderia ser considerada estatisticamente distinta da distribuição esperada para as seqüências representadas nas lâminas. O cálculo de distribuição hipergeométrica foi utilizado para esta avaliação, de acordo com o proposto por [Martin *et al*, 2004]. A distribuição foi considerada significativamente distinta do esperado quando $p < 0.05$.

3.8- Análise das ESTs (Expressed Sequence Tags) diferencialmente expressas

Os genes funcionalmente desconhecidos, também denominados ESTs, foram classificados de acordo com o órgão, tecido ou estágio de desenvolvimento em que foram originalmente identificados. Para isso, realizamos uma busca sistemática da ocorrência de palavras-chave em sua nomenclatura. As distribuições das ESTs

diferencialmente expressas em 24 e 48 horas após o tratamento por DMA foram comparadas à distribuição de todas as ESTs presentes nas lâminas *Codelink* (distribuição esperada). Neste caso, também utilizamos o cálculo de distribuição hipergeométrica para acessar a relevância estatística ($p < 0.05$) das distribuições observadas em relação à esperada [Martin *et al*, 2004].

3.9- Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em 24 e 48 horas

Para estudar os perfis de expressão gênica induzidos em 24 e 48 horas após o tratamento por DMA, foi realizada uma análise de agrupamento (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST>). Para esta análise, retornamos aos dados brutos e re-normalizamos todos os experimentos em conjunto, de forma a permitir comparações cruzadas. Um teste-t ajustado foi realizado buscando (i) os genes que apresentaram mesma tendência de expressão em ambos os períodos; neste caso, $p < 0.05$ significou diferenças reprodutíveis de todas as lâminas do grupo tratado “D” em relação a todas as lâminas do grupo controle “C”; (ii) os genes que apresentaram tendências de expressão distintas entre as lâminas D24 e D48 em comparação a todas as lâminas do conjunto C; neste caso, os menores valores p incluíram genes diferenciais em 24hs, mas não em 48hs (e vice-versa) e genes diferenciais em ambos os períodos, mas com expressão invertida (i.e., aumento em 24hs e diminuição em 48hs e vice-versa). Esta estratégia foi adotada após a observação de que os transcritomas de 24 e 48 horas apresentaram poucos genes coincidentes, portanto a análise de agrupamento seria impraticável uma vez que pressupõe ao menos dois valores válidos de expressão para um mesmo gene em dois experimentos distintos. Além disto, para explorar a transição entre os dois transcritomas, nesta análise foi considerada tendência à expressão diferencial uma variação de expressão $\geq [1,5]$.

3.10- Análise das vias metabólicas e de sinalização representadas pelos genes diferencialmente expressos

Os genes que apresentaram expressão diferencial após o tratamento por DMA foram investigados quanto a sua participação em vias metabólicas e sinalizatórias conhecidas, utilizando o banco de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas

(KEGG - <http://www.genome.jp/kegg>) como referência. A seqüência nucleotídica dos genes diferenciais foi submetida ao serviço de anotação automática do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kaas/>), que gera automaticamente os mapas das vias metabólicas e de sinalização nas quais os genes estão inseridos. Genes que não estavam presentes no banco de dados do KEGG foram manualmente investigados quanto a sua função e inserção nos metabolismos, através de intensivas consultas ao NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Swiss-Prot (<http://ca.expasy.org/sprot/>) e dados obtidos na literatura. A partir destes mapas e da complementação com os dados obtidos na literatura e em outros bancos, foi montado um esquema gráfico para representar as respostas afetadas pelo tratamento por DMA nos principais tipos celulares de miocárdio (Apêndice 3).

3.11- Ensaio de diferenciação e proliferação de células endoteliais *in vitro*

O efeito angiogênico da quinazolina DMA foi investigado através de um ensaio de diferenciação de células endoteliais *in vitro*. Foi utilizada a linhagem de células endoteliais de próstata (PEC), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho (Depto. Biologia Celular/ IB – Unicamp). Placas de 96 poços foram tratadas com 25µl de Matrigel (*BD Biosciences*) 24 horas antes das células serem adicionadas, de forma a permitir sua completa polimerização. Células provenientes da cultura-matriz de PECs (4 passagens) foram adicionadas às placas de 96 poços em uma concentração final de 3×10^4 células/poço. Após incubar por 18 horas em meio de cultura simples (HAM-F12, 10% L-glutamina, 10% bicarbonato), o meio foi trocado por meio de cultura + DMA nas concentrações finais de 10nM ou 100nM. Às amostras controle, DMSO foi adicionado nas mesmas quantidades. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Após 24 horas, cada poço da placa foi visualizado em microscópio invertido (Leica DMIL, *Weitzlar Deutschland*) e as imagens obtidas capturadas por câmera CCD. Para realizar uma estimativa da proliferação das PECs, utilizamos as imagens digitalizadas para a contagem de células. Foram estabelecidos três quadrantes aleatórios de tamanho similar em cada amostra e as quantidades de células obtidas dentro de cada quadrante foram utilizadas para a estimativa da população de células nas amostras tratadas por DMA e nos controles.

3.12- Ensaios de Western blotting

Para o estudo da expressão de algumas proteínas de interesse ao presente estudo, realizamos procedimentos para a obtenção do extrato total de miocárdio de camundongos nos intervalos de 24 ou 48 horas após o tratamento pela quinazolina DMA ou pelo veículo. Resumidamente, após a coleta, cada miocárdio foi homogeneizado separadamente em tampão de extração (100mM Tris pH 7.5; 10mM EDTA; 100mM fluoreto de sódio; 10mM pirofosfato de sódio; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,1mg/ml aprotinina; Triton 10%). Após incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 11000rpm, 4°C, por 20 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C. Para a produção dos ensaios de *western blotting*, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (*Hybond*). Como controle de corrida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante e este foi corado por coomassie. Depois de bloqueadas (30 minutos em leite 5%), as membranas foram incubadas com o anticorpo primário por aproximadamente 18 horas a 4°C e em local preservado de luz. Após lavagem para retirada dos sinais inespecíficos, os sinais foram detectados através de quimioluminescência. As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria.

3.13- Anticorpos

Foram utilizados os anticorpos primários NOS1 (*NO synthase, neuronal isoform*), EphA5 (*ephrin A5*), AMPK (*AMP-dependent protein kinase*), GAPDH (*glyceraldehyde phosphate dehydrogenase*), adquiridos da empresa Santa Cruz (CA).

3.14- PCR em tempo real (RT-PCR)

Alguns genes foram selecionados para confirmação da expressão através de PCR quantitativo em tempo real: *angiopoietin-like 4 (Angptl4)*; *carnitine palmitoyltransferase 1b (Cpt1b)*; *estradiol 17-beta-dehydrogenase (17β-HSD)*; *fibroblast growth factor 4 (Fgf4)*; *hexokinase 1 (Hk1)*; *phosphodiesterase 5A cGMP-specific (Pde5a)*;

pre-B-cell colony-enhancing factor 1 (Pbef1); *protein kinase, AMP-activated beta 1 non-catalytic subunit (ampk)*; *retinol dehydrogenase 6 (Rdh6)*; *signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)*; *testis expressed gene 12 (Tex12)*. Como controle endógeno, selecionamos o gene *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (gapdh)*. Os primers foram desenhados com base nas seqüências nucleotídicas depositadas no banco de dados Unigene-NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>). 1µg de RNA total obtido dos corações tratados (DMA) e controle (DMSO) foi submetido à transcrição reversa utilizando o kit *Superscript II (Invitrogen)* e primers randômicos conforme as instruções do fabricante. As reações de RT-PCR foram realizadas em volume total de 16µL a partir de 25ng do cDNA resultante da transcrição reversa, 250nM de cada primer e 8µL de *SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)* conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas no sistema *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* sob os parâmetros usuais para a quantificação da expressão gênica em tempo real. Ao final de cada reação foi incluída uma curva de dissociação de modo a garantir a especificidade da amplificação obtida. A quantificação relativa da expressão dos genes analisados foi realizada pelo método de curva padrão [Cikos et al, 2007]. Cada reação foi realizada em triplicata e os valores obtidos foram normalizados pelos valores da expressão do controle endógeno GAPDH.

4- RESULTADOS

4.1- Fase tardia da cardioproteção induzida pelo composto quinazolínico

Os registros obtidos nos experimentos de isquemia/reperfusão em corações isolados de camundongos nos tempos de 24, 48 e 72 horas estão apresentados na Figura 1A. A partir destes registros, foram calculadas as curvas referentes à pressão diastólica do ventrículo esquerdo (P. Diast. VE) ao longo do procedimento de isquemia/reperfusão, conforme apresentado na Figura 1B. Da mesma forma, foram calculadas as curvas referentes à pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (P. Des. VE) ao longo do procedimento de isquemia/reperfusão, conforme apresentado na Figura 1C.

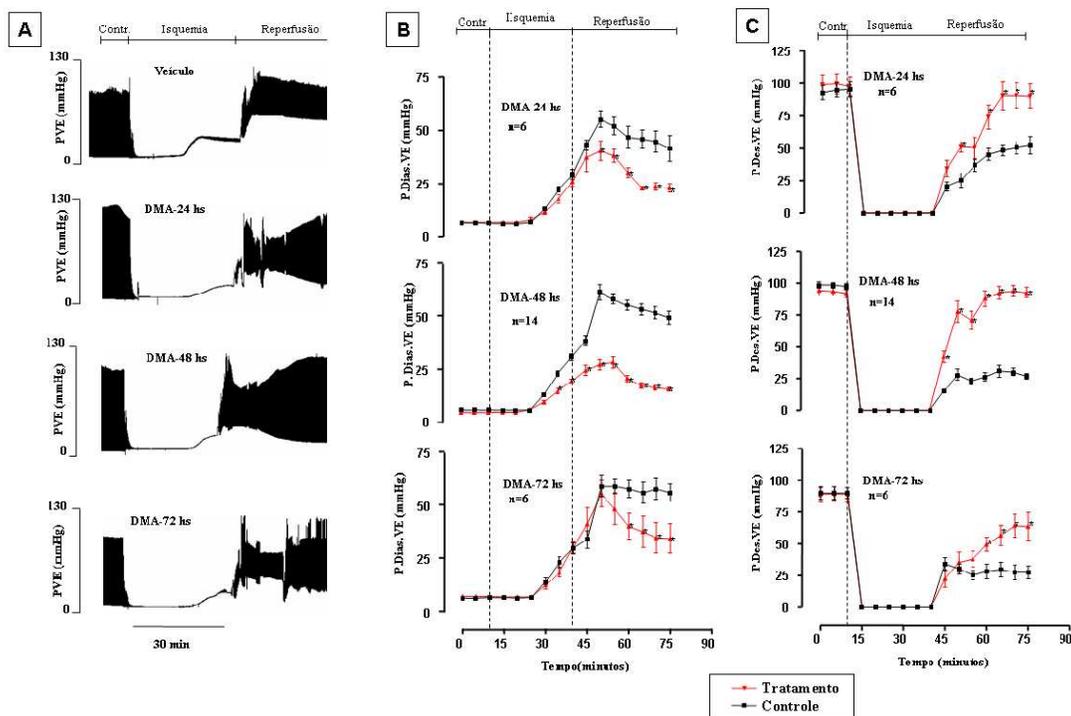


Figura 1A- Registros de pressão do ventrículo esquerdo (PVE) obtidos em experimento de isquemia/reperfusão em corações isolados de camundongos controle (Veículo) ou tratados pela quinazolina nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As curvas foram obtidas ao longo de três momentos: o registro controle (Contr.), a isquemia prolongada (30 minutos) e a reperusão. A amplitude das curvas representa a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, em mmHg. **B-** Gráficos representativos do efeito do composto quinazolínico sobre a pressão diastólica ventricular esquerda (P.Dias.VE) em corações isolados controle e tratados, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **C-** Gráficos representativos do efeito do composto quinazolínico sobre a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (P. Des. VE) em corações isolados controle e tratados, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Em B e C, os dados são representados como média \pm E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores controles.

A Figura 1A apresenta o efeito cardioprotetor induzido pela quinazolina ao longo dos três momentos amostrados da fase tardia. Enquanto os corações tratados apenas pelo veículo apresentaram perda da função mecânica do coração, os corações tratados recuperaram a função ventricular logo em seguida à reperfusão.

Conforme podemos observar na Figura 1B, ao final do período de 35 min de reperfusão, os corações dos camundongos tratados apresentaram uma diminuição na pressão diastólica do ventrículo esquerdo em relação às pressões diastólicas registradas nos animais controle em todos os três períodos amostrados.

Da mesma forma, conforme os resultados apresentados na Figura 1C, após 35 min de reperfusão os corações dos camundongos tratados apresentaram níveis de pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo maiores do que os níveis apresentados no mesmo período pelos seus respectivos controles, em todos os tempos amostrados.

4.2- Qualidade do RNA total

Após os procedimentos para a extração de RNA total, sua qualidade foi avaliada através de gel desnaturante de agarose, conforme a Figura 2. As amostras também foram quantificadas por espectrofotometria para determinar sua concentração e grau de pureza.

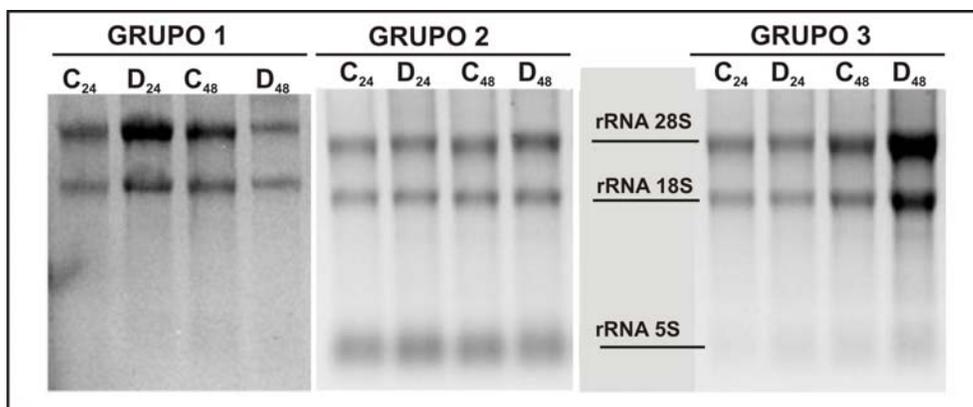


Figura 2- Eletroforese em gel desnaturante de agarose para avaliação da qualidade das amostras de RNA total. O RNA total foi extraído dos corações dos 3 grupos-réplicas de animais controle (C) e animais tratados (D) nos períodos de 24, 48 e 72 horas transcorridas após a administração do composto quinazolinico. As intensidades das bandas de RNA ribossomal (rRNA 28S, 18S e 5S) servem como parâmetro para avaliar a qualidade e a quantidade de RNA total obtido em cada amostra.

A Tabela 1 abaixo apresenta os valores obtidos para estas amostras segundo espectrometria (*Nanodrop*[®] *ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer*).

Tabela 1- Quantificação dos RNAs totais extraídos dos miocárdios dos grupos experimentais

Grupo experimental	Amostra	Concentração (ug/ul)	Pureza (A_{260}/A_{280})
GRUPO 1	C24	2,49	2,09
	D24	2,04	2,11
	C48	2,3	2,06
	D48	3,7	2,06
GRUPO 2	C24	2,76	2,15
	D24	2,58	2,16
	C48	2,2	2,07
	D48	3,5	2,08
GRUPO 3	C24	2,2	2,15
	D24	1,76	2,08
	C48	2,2	2,11
	D48	3,1	2,15

4.3- Produção dos microarranjos

A estratégia adotada para avaliar a expressão gênica ampla do miocárdio foi a utilização de microarranjos comerciais contendo todas as seqüências transcritas presentes no genoma do camundongo (*Codelink*[®] *Mouse Whole Genome Bioarrays*, *GE Healthcare*). Controles de qualidade dos reagentes, do RNA total utilizado, da eficiência da amplificação *in vitro* e da hibridação foram realizados em todos os experimentos utilizando estas lâminas.

Os controles positivos foram obtidos através da hibridação de transcritos específicos de origem bacteriana com representatividade de seqüência nas lâminas *Codelink*. Os controles negativos referem-se ao sinal emitido por seqüências presentes nas lâminas *Codelink* na ausência destes transcritos bacterianos durante a síntese das sondas e hibridação. Este procedimento permitiu a monitoração da taxa de amplificação dos RNA mensageiros raros presentes nas amostras de miocárdio de camundongo testadas, bem como a avaliação da sensibilidade do experimento.

Na Figura 3A são apresentados exemplos do sinal fluorescente emitido pelos microarranjos *Codelink*, as análises da qualidade dos controles positivos e negativos (3B) e a reprodutibilidade das intensidades das leituras referentes às réplicas experimentais avaliadas em pares (3C).

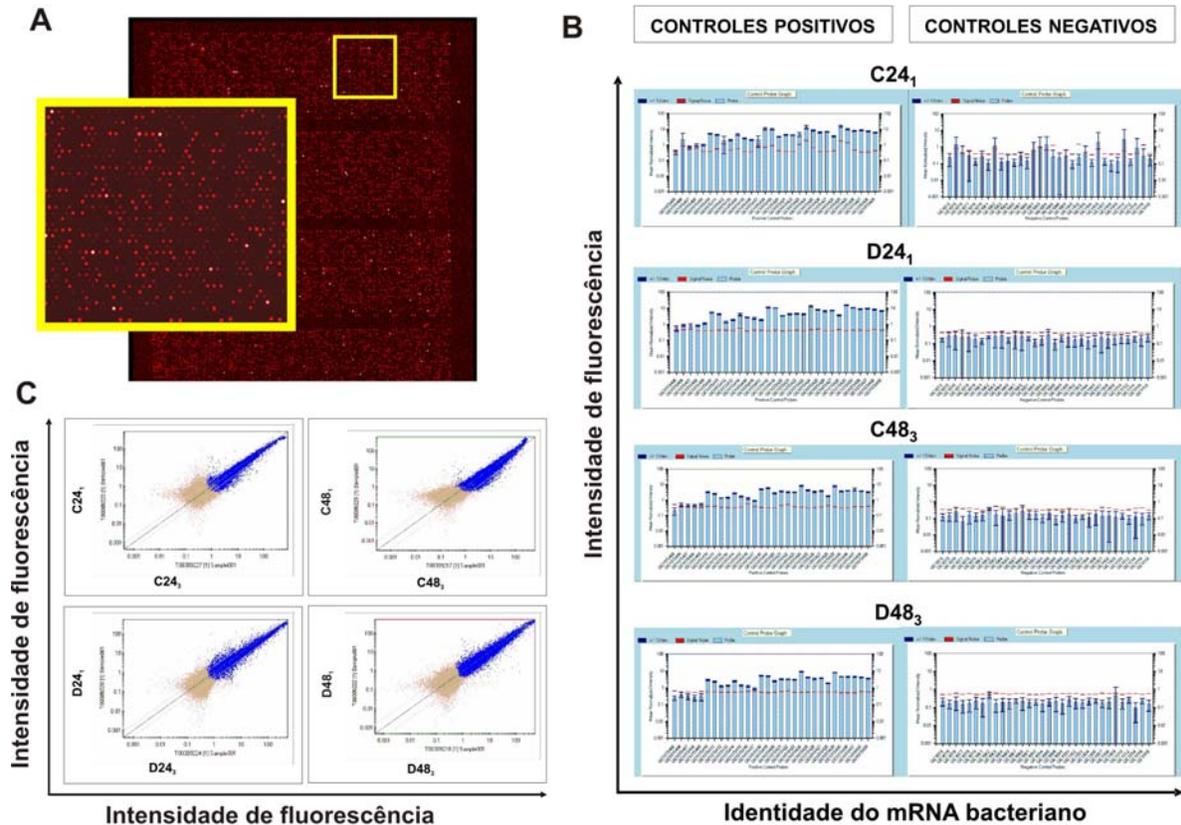


Figura 3A- Sinais emitidos por uma das lâminas produzidas e, no detalhe assinalado, a imagem em maior aumento. Como a metodologia *Codelink* envolve a produção de lâminas contendo uma única sonda, portanto os sinais de fluorescência são emitidos em comprimento de onda específico, gerando uma imagem constituída por uma escala de cor única. **B-** Gráficos demonstrativos da qualidade dos sinais emitidos pelos controles experimentais. As barras representam a intensidade de fluorescência emitida pelos transcritos bacterianos individualmente. Para os experimentos serem considerados satisfatórios, a intensidade dos controles positivos e negativos deve respeitar o limite estabelecido pela linha pontilhada vermelha, permanecendo acima e abaixo da linha, respectivamente. Os gráficos apresentados referem-se aos resultados de 4 lâminas, identificadas como C (controle) ou D (tratamento). **C-** Gráficos de distribuição dos valores das intensidades de fluorescência emitidas pelas seqüências gênicas presentes em duas lâminas-réplica. Este gráfico permite uma avaliação da reprodutibilidade dos experimentos, de acordo com a dispersão dos pontos ao redor da linha de tendência. Notar que os pontos que apresentam intensidades mais baixas (pontos com coloração clara) apresentam menor reprodutibilidade entre as réplicas, o que era esperado dado sua maior suscetibilidade à interferência por ruídos. Apesar de todas as amostras terem sido avaliadas, apenas alguns resultados foram apresentados.

4.4- Normalização

Antes da análise da expressão gênica diferencial, as intensidades de fluorescência de cada lâmina foram normalizadas para cada um dos tempos após a administração do composto quinazolínico. Esta normalização utiliza ferramentas para corrigir desvios na distribuição dos dados obtidos em cada lâmina. Este procedimento foi realizado para reduzir as variações espúrias e estabelecer uma calibração para todos os valores a serem comparados. Na Figura 4 são mostrados gráficos representativos das intensidades de fluorescência emitidas em cada uma das lâminas antes e depois das normalizações.

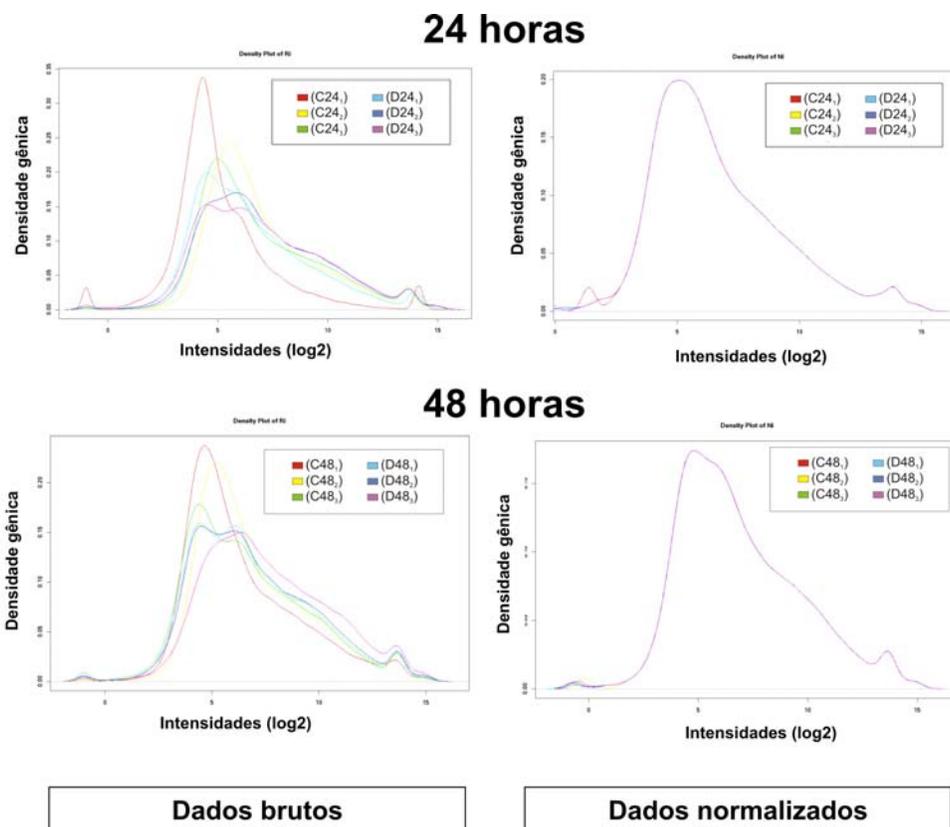


Figura 4- Gráficos representativos das intensidades médias dos pontos presentes em cada uma das lâminas, analisadas separadamente nos tempos de 24 e 48 horas após a administração da quinazolina. No eixo das abcissas, as intensidades de fluorescência (em escala logarítmica por razões intrínsecas ao processo de normalização) e, no eixo das ordenadas, a quantidade de pontos (densidade gênica) em cada lâmina que apresentou cada uma destas intensidades. Os gráficos da esquerda apresentam as curvas antes da normalização (dados brutos) e, à direita, após a normalização (dados normalizados), nos tempos de 24 e 48 horas. A legenda de cores apresenta a identidade das seis lâminas, representadas pela nomenclatura definida na seção de Metodologia. Por meio destes gráficos é possível avaliar a diferença entre as intensidades emitidas por cada lâmina que, por refletirem variações inerentes à própria abordagem experimental, dificultariam as interpretações dos resultados caso não fossem eliminadas através da normalização.

4.5- Análise dos dados

Os experimentos referentes aos efeitos de 24 e 48 horas da quinazolina na expressão gênica ampla do miocárdio foram avaliados separadamente. Após a normalização dos experimentos, os valores das intensidades de fluorescência obtidas para cada gene nas lâminas referentes ao tratamento pela quinazolina foram comparados com os valores das intensidades de fluorescência obtidas nas lâminas referentes ao tratamento com o veículo. A Figura 5 mostra os resultados da análise da expressão gênica diferencial de corações de camundongos tratados com quinazolinas, representados em gráfico do tipo Volcano (correlacionando a significância estatística e a variação da expressão).

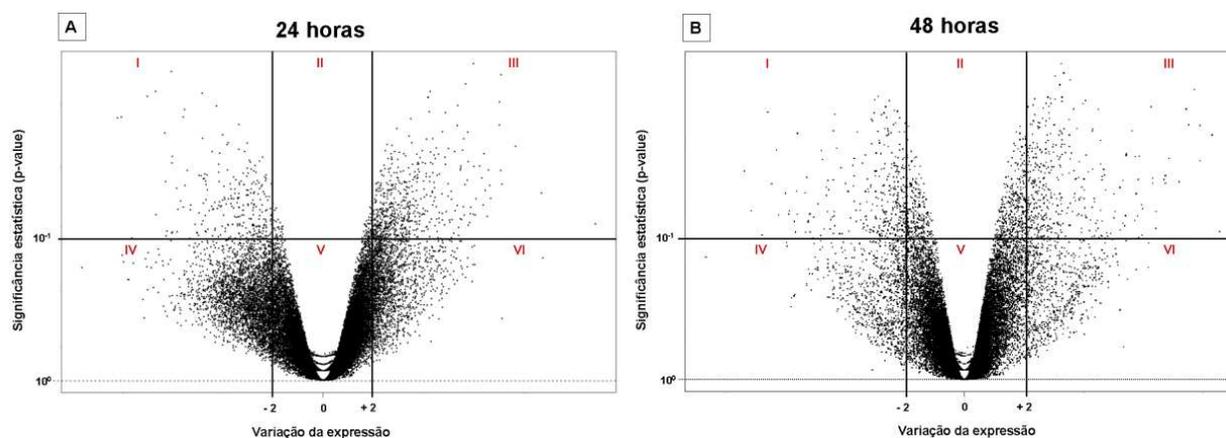


Figura 5- Gráficos Volcano representando a distribuição dos genes em função dos valores associado à sua significância estatística (p-value) no eixo das ordenadas e variação de sua expressão no eixo das abscissas, em 24 horas (A) e 48 horas (B) após o tratamento pela quinazolina. As áreas dos gráficos foram divididas em quadrantes para facilitar a análise, conforme definido pelas linhas contínuas verticais e horizontais. Nos quadrantes I e IV de cada gráfico, os genes que apresentaram repressão da expressão (variação ≤ -2.0). Nos quadrantes III e VI, os genes que foram considerados induzidos (variação $\geq +2.0$). Os quadrantes centrais (II e V) apresentam os genes cuja expressão não foi considerada alterada após o tratamento pela quinazolina. A linha horizontal contínua define o limiar de significância estatística mínima ($p = 10^{-1}$) e, portanto estabelece que, apesar de considerados diferencialmente expressos, os valores obtidos para os genes nos quadrantes IV e VI não foram suficientemente homogêneos ($p > 10^{-1}$). Assim, apenas os genes diferencialmente expressos e estatisticamente significativos (quadrantes I e III) foram considerados para as análises posteriores, formando o que chamamos de transcritomas desencadeados pela quinazolina em 24 e 48 horas.

A comparação entre os gráficos da Figura 5 mostra maior densidade de pontos nas áreas correspondentes à ocorrência de expressão gênica diferencial (quadrantes I e II) no transcrito de 24 horas em relação ao transcrito de 48 horas. Entretanto, a maior parte destes genes não satisfaz os critérios estatísticos, conforme evidenciado pela grande concentração de pontos nos quadrantes inferiores (IV e VI).

4.6- Análise da composição dos transcritos de 24 e 48 horas

Inicialmente, analisamos globalmente os transcritos expressos em resposta à administração da quinazolina em 24 e 48 horas. A Figura 6 apresenta esquematicamente o número de genes considerados diferencialmente expressos em relação ao total de sequências presentes nas lâminas *Codelink*, em 24 horas (**Figura 6A**) e em 48 horas (**6B**). Também estão representadas as proporções entre os genes conhecidos e as sequências funcionalmente desconhecidas (ESTs), bem como a proporção entre indução e repressão gênica em cada um dos dois períodos avaliados.

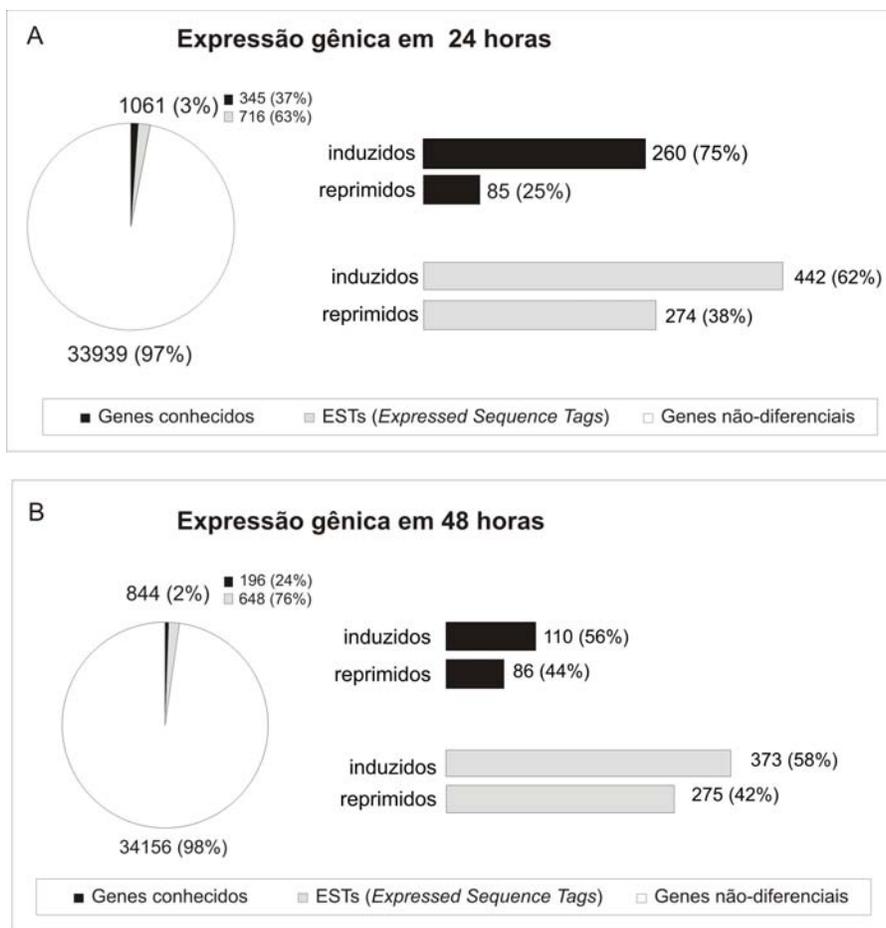


Figura 6- Análise da quantidade de genes conhecidos ou ESTs diferencialmente expressos em 24 horas (A) e 48 horas (B) em relação ao total de genes representados nos microarranjos *Codelink*. As seções assinaladas em preto representam os genes conhecidos que alteraram significativamente sua expressão em resposta ao tratamento pela quinazolina. As seções assinaladas em cinza representam as ESTs diferenciais em cada tempo.

Na Figura 6 observa-se que apenas uma pequena parcela (2-3%) dos genes presentes no genoma de camundongo apresentou expressão diferencial no coração em resposta ao tratamento com as quinazolininas (1061 genes em 24 horas e 844 em 48 horas). Destes, a maior parte (63%-76%) se constitui de genes cuja função ainda não é conhecida (716 ESTs em 24 horas e 648 em 48 horas). A análise também demonstra uma prevalência da ativação da expressão gênica no transcrito de 24 horas (~75% dos genes conhecidos e

62% das ESTs estão induzidos). Em 48 horas esta indução gênica é menos pronunciada (56% dos genes conhecidos e 58% das ESTs estão induzidos). A comparação entre os resultados obtidos em ambos os tempos demonstra ainda que os valores de repressão gênica são praticamente os mesmos, tanto para os genes conhecidos (85 genes em 24 horas; 86 em 48 horas) quanto para as ESTs (274 ESTs em 24 horas; 275 em 48 horas).

Neste ponto das análises, separamos os genes conhecidos daqueles cuja função ainda não foi observada ou descrita, de forma a nos permitir a realização de anotações funcionais separadamente.

4.7- Análise dos genes conhecidos

Para estudar as funções dos genes conhecidos considerados diferencialmente expressos em ambos os transcritomas, os genes foram classificados segundo sua função biológica descrita pelo Gene Ontology (www.geneontology.org). Deste modo, foi possível visualizar quais os principais processos celulares afetados pelo tratamento com a quinazolina DMA. Utilizamos como referência as classes funcionais dos genes presentes nas lâminas *Codelink*, uma vez que estas constituem uma representação do genoma de camundongo, conforme descrita por [94].

As principais classes observadas dentre os genes expressos 24 e 48 horas após o tratamento estão apresentadas pela Figura 7, bem como as classes que se apresentaram estatisticamente mais ou menos representadas após tratamento pelo DMA do que seria esperado de acordo com a distribuição das sequências presentes nas lâminas *Codelink* ($p < 0.05$).

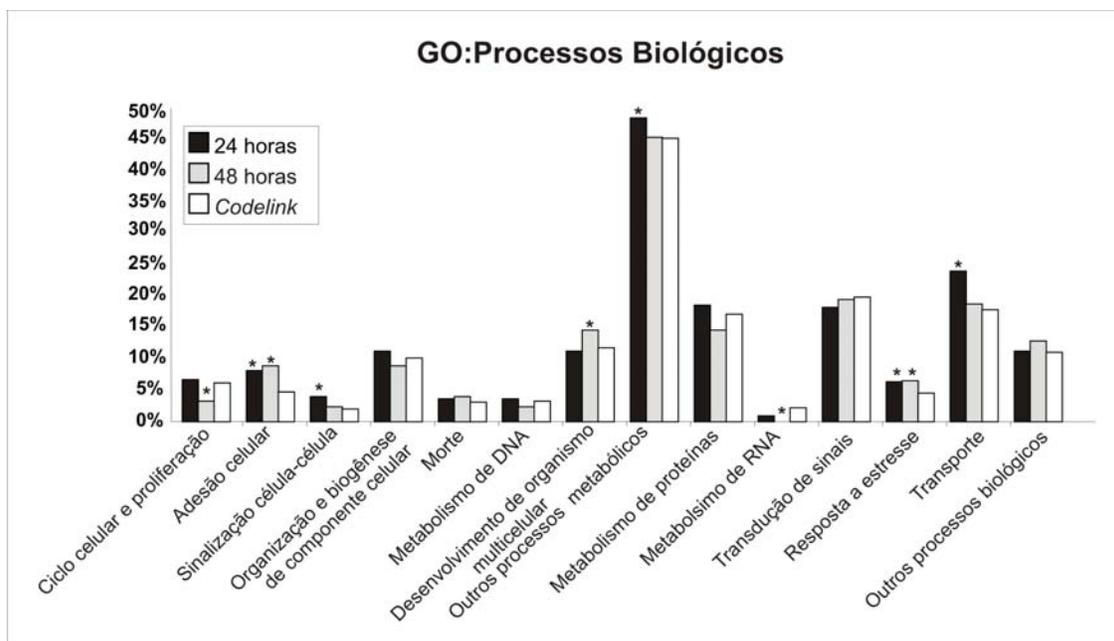


Figura 7- Análise dos principais processos biológicos representados nos transcritomas de 24 e 48 horas. Os percentuais se referem ao total de genes conhecidos diferencialmente expressos que pertencem a cada categoria apresentada, podendo haver sobreposição funcional (i.e., um gene pode pertencer a mais de uma categoria). As barras brancas representam as distribuições das sequências presentes nas lâminas *Codelink* que foram usadas como referência para definir se determinada função está estatisticamente mais ou menos representada nos transcritomas estudados ($p < 0.05$, colunas com asteriscos).

Conforme apresentado na Figura 7, entre os genes conhecidos, 8 de 14 classes funcionais apresentaram uma representação significativa nos transcritomas de 24 e/ou 48 horas: (1) as classes de “adesão celular” e “resposta a estresse” estão super-representadas em ambos os transcritomas; (2) as classes “sinalização célula-célula”, “outros processos metabólicos” e “transporte” estão super-representadas apenas em 24 horas; (3) a classe “desenvolvimento de organismo multicelular” está super-representada apenas em 48 horas; (4) as classes “ciclo celular e proliferação” e “metabolismo de RNA” estão sub-representadas apenas em 48 horas.

Uma vez que a classe “outros processos metabólicos” é bastante genérica e inclui diversas subcategorias importantes, analisamos em detalhes a distribuição dos genes nestas subcategorias. Apenas as classes que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$)

na sua representação dentre os genes diferenciais após o tratamento pela quinazolina em relação à representação nas lâminas *Codelink*, estão apresentadas na Figura 8.

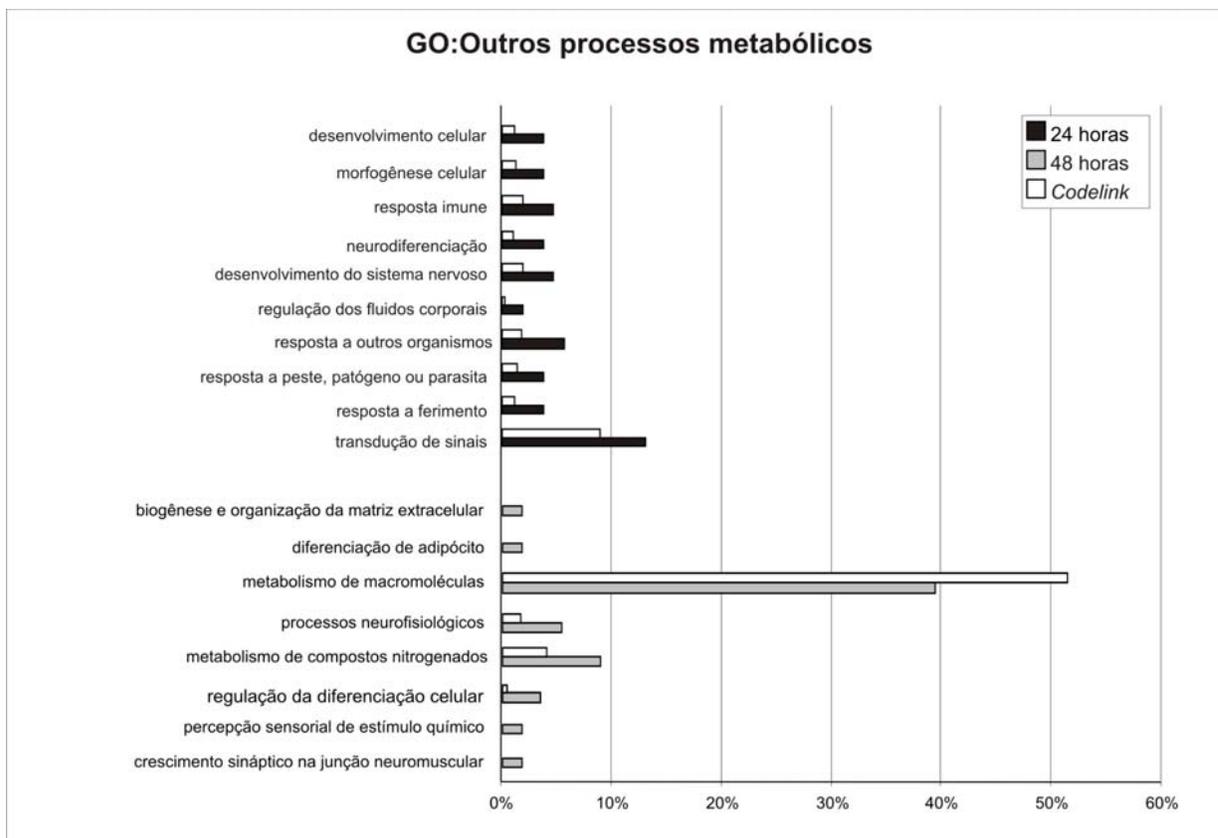


Figura 8- Análise da distribuição dos genes diferenciais nas subcategorias incluídas na classe funcional “Outros processos metabólicos”. Apenas as categorias consideradas estatisticamente significativas ($p < 0.05$) nos transcritomas de 24 e 48 horas em relação ao esperado para as distribuições nas lâminas *Codelink* foram apresentadas.

Podemos observar pela análise da Figura 8 que apenas uma categoria apresentou-se menos representada do que o esperado segundo a distribuição das sequências na lâmina *Codelink*: “metabolismo de macromoléculas”, presente no transcritoma desencadeado 48 horas após o tratamento pelo DMA. As demais categorias tiveram maior representação dentre os genes diferenciais do que seria esperado de acordo com a representação gênica nas lâminas *Codelink*.

Em seguida, foi identificada a proporção entre indução e repressão gênica nas mesmas categorias anteriormente apresentadas na Figura 7, de forma a nos permitir avaliar com maior detalhamento os perfis funcionais. A Figura 9 apresenta estes resultados.

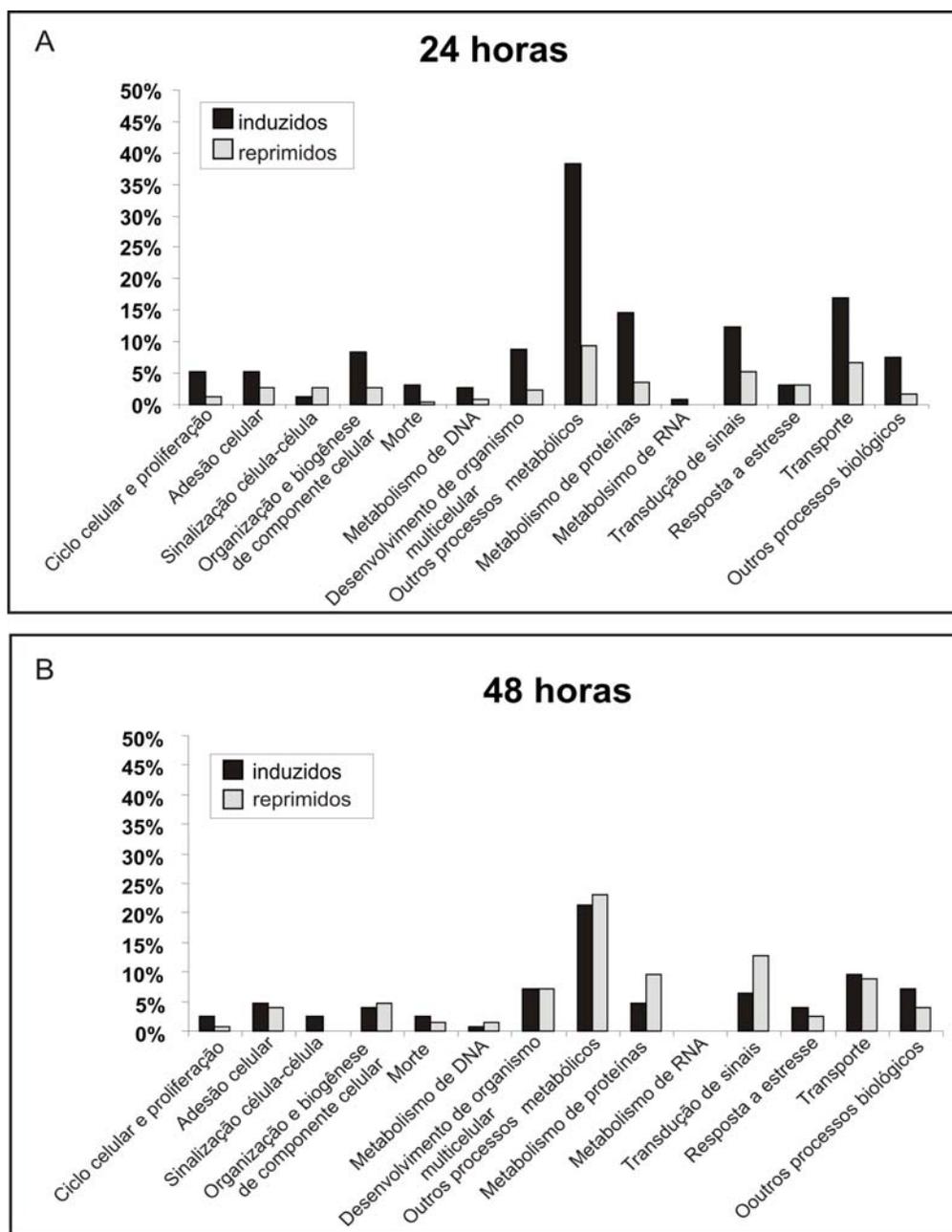


Figura 9- Análise dos transcritomas de 24 horas (A) e 48 horas (B) em função da proporção entre genes induzidos e reprimidos presentes em cada uma das categorias funcionais definidas na Figura 7.

Conforme podemos observar na Figura 9A, o transcrito de 24 horas apresenta prevalência da indução gênica em praticamente todas as classes funcionais, exceto as classes “sinalização célula-célula”, com a maior parte dos genes reprimidos, e “resposta a estresse”, que apresenta igual proporção entre genes induzidos e reprimidos.

Já o transcrito de 48 horas (Figura 9B) apresenta um equilíbrio entre indução e repressão gênica em praticamente todas as categorias, exceto a classe “sinalização célula-célula”, que apresenta a maior parte dos genes induzidos, e as classes “metabolismo de proteínas” e “transdução de sinais”, que apresentam a maioria dos genes reprimidos.

Em seguida, iniciamos a análise das identidades dos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento pelo DMA em ambos os períodos. Inicialmente, avaliamos os genes conhecidos comuns aos dois transcritos, bem como sua expressão em cada período. A Figura 10 apresenta diagramaticamente essa análise.

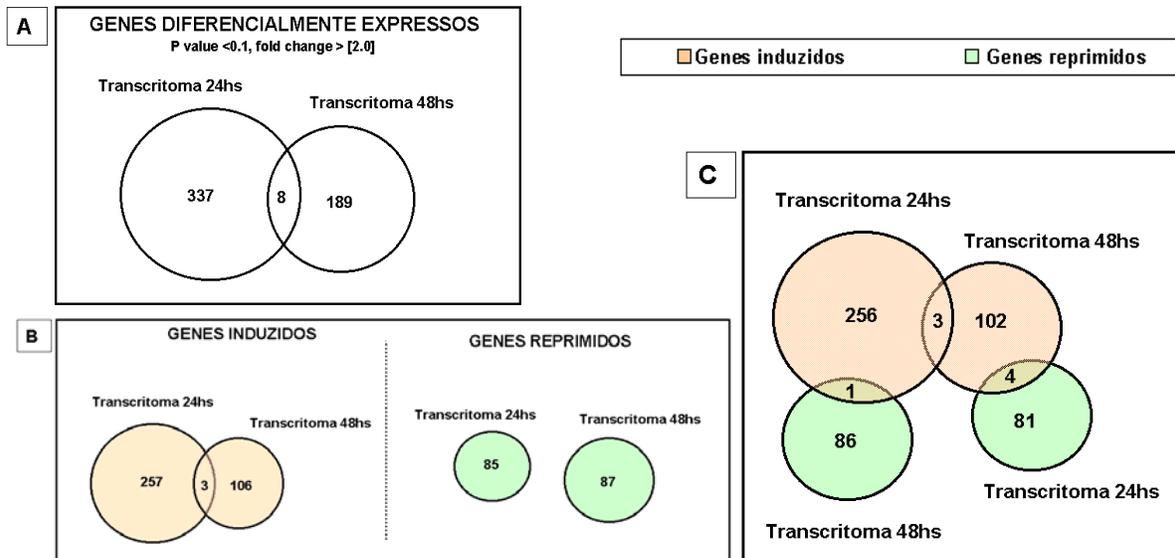


Figura 10 A- Diagramas de Venn representando a ocorrência de genes diferencialmente expressos comuns a ambos os transcritomas. **B-** Diagramas de Venn representando os grupos de genes induzidos ou reprimidos nos transcritomas, buscando observar qual a expressão dos genes presentes na sobreposição dos transcritomas. Notar que entre os genes reprimidos não ocorrem genes comuns a ambos os transcritomas e, portanto, dos oito genes comuns identificados no item (A) não pudemos identificar cinco. **C-** Diagramas de Venn ilustrando que os cinco genes comuns estão presentes na intersecção entre os transcritomas com tendência de expressão oposta. Círculos em tons avermelhados representam os genes induzidos e círculos em tons esverdeados, genes reprimidos, conforme define a legenda.

Conforme pode ser observado na Figura 10A, apenas oito genes diferencialmente expressos são comuns aos dois transcritomas. Quando avaliamos a tendência de sua expressão em ambos os transcritomas, observamos que três genes estão induzidos em ambos os períodos (Figura 10B, “Genes Induzidos”) mas nenhuma coincidência entre os genes reprimidos (Figura 10B, “Genes Reprimidos”). Conforme mostra a Figura 10C, os cinco genes restantes apresentam expressão inversa

entre os dois transcritomas – um gene foi induzido em 24 horas e reprimido em 48 horas e quatro genes foram reprimidos em 24 horas e induzidos em 48 horas.

A Tabela 2 abaixo apresenta a identidade destes 8 genes, o valor da variação de sua expressão e a categoria funcional a que pertencem.

Tabela 2- Identidade e valores de expressão dos genes comuns a ambos os transcritomas.

Fold change: amplitude da variação da expressão gênica. *p-value*: significância estatística.

<i>Fold change</i> 24hs	p-value	<i>Fold change</i> 48hs	p-value	Identidade	Categoria funcional
13.34	0.006	-2.34	0.0908	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 1A (EIF-1A) homolog (EIF-4C) [Mus musculus]	síntese/modificação de proteínas
4.11	0.0897	2.34	0.0125	phospholipase C, zeta 1 (Plcz1)	sinalização
3.47	0.0195	2.02	0.0572	neuronal pentraxin 2 (Nptx2)	estrutural
2.19	0.0341	2.89	0.0807	UDP-glucuronosyltransferase 8 (Ugt8)	metabolismo
-2.91	0.0701	6.73	0.0695	DNA binding protein with his-thr domain (Dbpht1)	expressão de genes
-4.93	0.0221	2.07	0.0687	keratin complex 2, basic, gene 6b (Krt2-6b)	estrutural
-6.03	0.033	2.18	0.0483	similar to gb:M60273 Mouse testosterone 16 α -hydroxylase, type a gene (MOUSE)	metabolismo
-6.13	0.0989	2.06	0.0891	similar to SW:TES2_MOUSE P47226 TESTIN 2	degradação/turn-over de proteínas

As identidades de todos os genes conhecidos considerados diferencialmente expressos em 24 horas e em 48 horas estão apresentadas no Apêndice 1.

A baixa representatividade de genes diferencialmente expressos comuns a ambos os transcritomas nos levou a questionar sobre como se comportariam os genes presentes no transcritoma de 24 horas na fase posterior (48 horas), bem como os genes presentes no transcritoma de 48 horas em relação à fase anterior. Assim, para analisarmos essa transição entre o transcritoma da fase inicial para o transcritoma da fase intermediária da resposta tardia à ação do composto quinazolinico, realizamos uma nova análise dos microarranjos de forma a nos permitir a comparação direta dos valores obtidos em 24 e 48 horas utilizando como referência os controles experimentais de ambos.

4.8- Análise da transição da expressão gênica entre 24 e 48 horas

Para esta análise não nos ativemos apenas aos genes cuja expressão apresentou um mínimo de duas vezes de aumento ou diminuição de sua expressão em relação aos controles experimentais (variação da expressão $\geq [2.0]$), dado que neste tipo de investigação consideramos que a tendência é mais importante que a amplitude da variação. Assim, para estas análises consideramos uma variação $\geq [1.5]$ como tendência de expressão diferencial. Estes genes foram submetidos a uma análise de agrupamento a partir de seu perfil de expressão. Os resultados obtidos para esta análise estão apresentados na Figura 11.

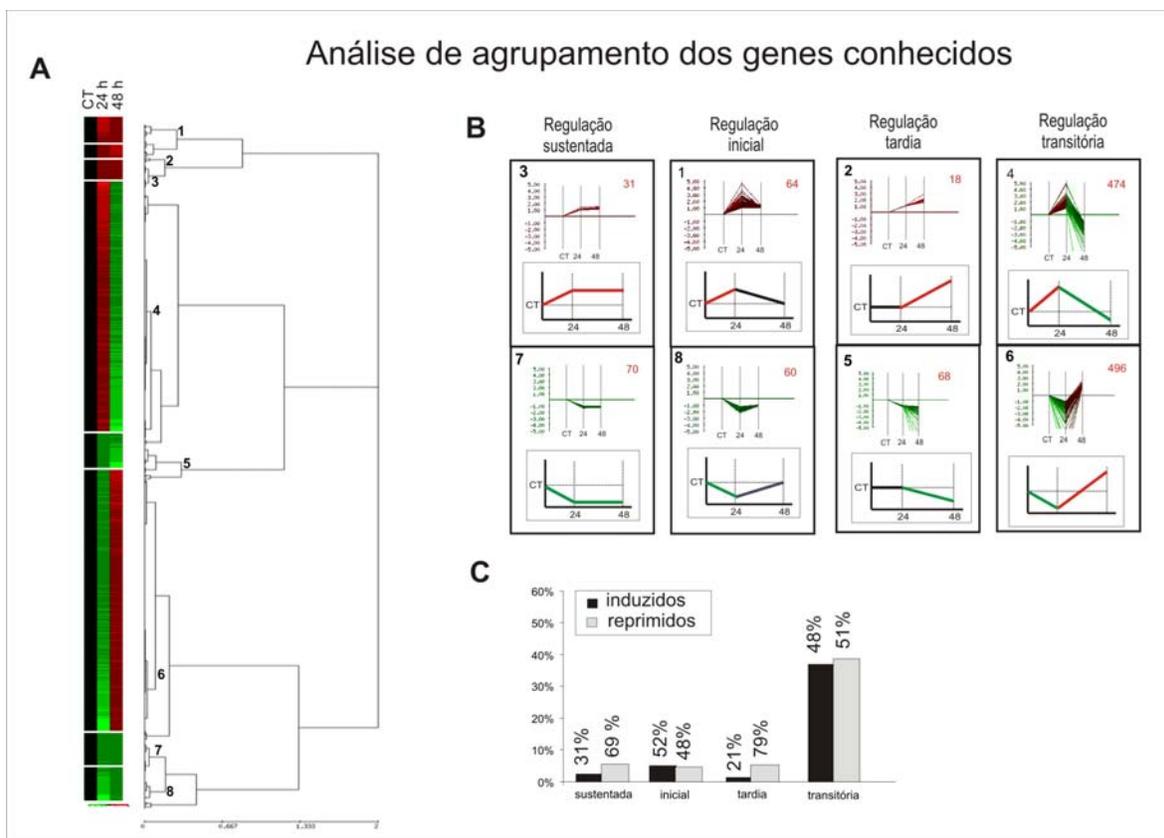
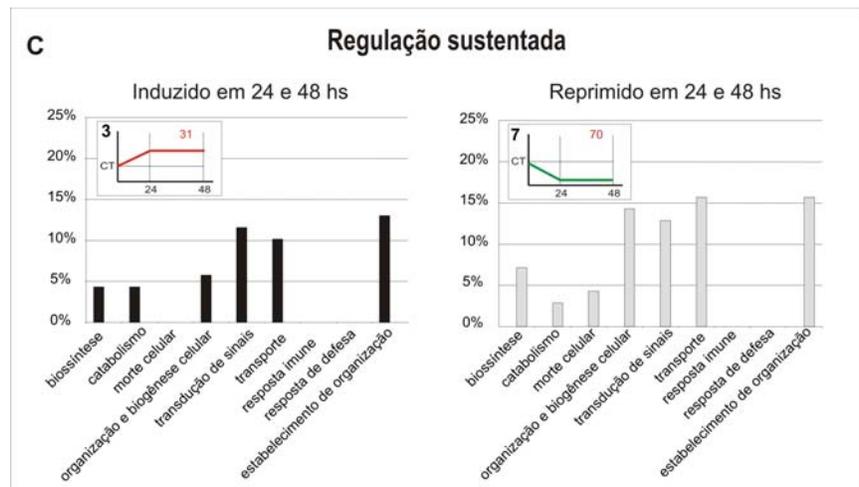
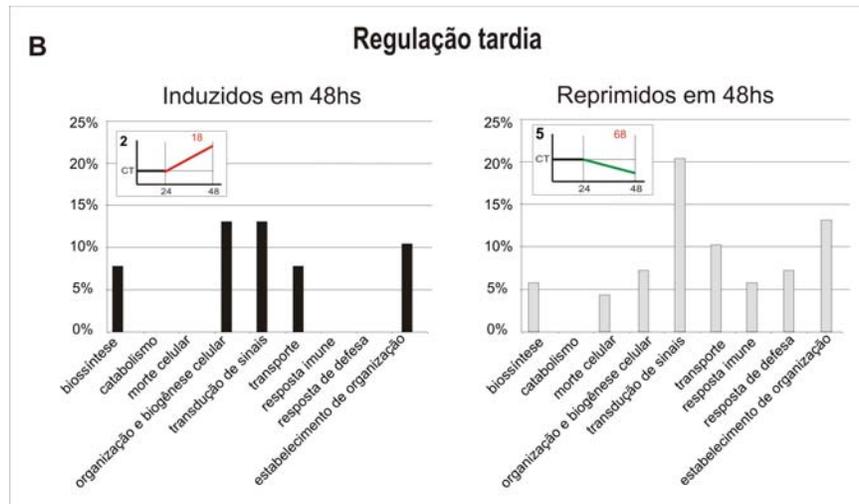
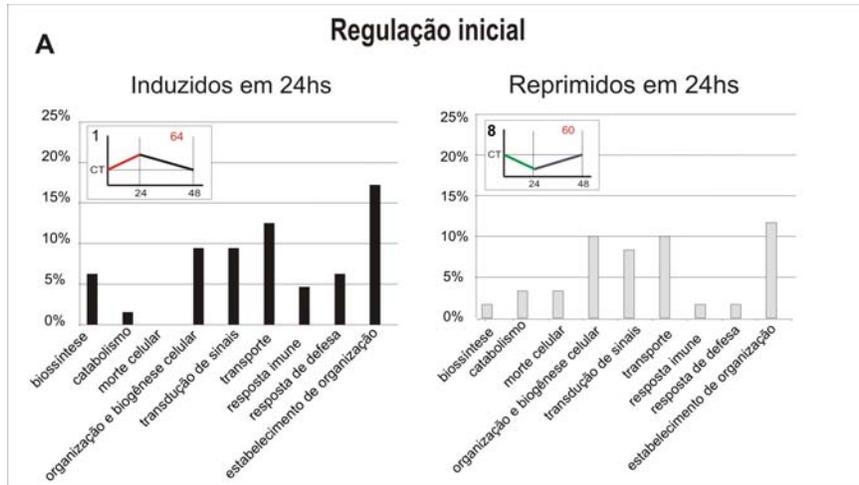


Figura 11- Análise de agrupamento dos genes em função de sua expressão em 24 e 48 horas após a administração do composto quinazolínico. **A-** Representação da análise de agrupamento através de uma árvore hierárquica. A amplitude da variação da expressão dos genes está representada pela graduação das tonalidades de verde (repressão) e vermelho (indução). Marcados de 1 a 8, os perfis de expressão selecionados para estudo detalhado. **B-** Gráficos demonstrativos dos quatro principais tipos de regulação gênica representados pelos grupos 1-8 (cada grupo está identificado pelo número em negrito à esquerda). A quantidade de genes presentes em cada grupo está representada pelo número em vermelho à direita. Nos gráficos, CT = controle, 24 e 48, a expressão nos transcritomas de 24 e 48 horas após o tratamento por DMA. O eixo numerado representa o valor da variação de expressão dos genes. **C-** Distribuição dos genes diferenciais entre os quatro tipos de regulação. A altura das barras se refere ao porcentual de cada tipo de regulação no total de genes diferenciais considerados nesta análise. O valor acima das colunas se refere à proporção entre indução (coluna preta) e repressão (coluna cinza) da expressão gênica em cada tipo de regulação. No caso da regulação transitória, a coluna preta se refere aos genes induzidos em 24 horas e reprimidos em 48 horas, e a coluna cinza à situação oposta.

Conforme podemos observar na Figura 11A e com maior detalhamento na 11B, os genes possuem tendências de expressão bem definidas, que classificamos em quatro grandes grupos: (i) regulação sustentada, que inclui genes cuja expressão tende a permanecer constante (aumentada ou diminuída) nos dois transcritomas; (ii) regulação inicial, que inclui genes cuja expressão aumenta/diminui em 24 horas e depois tende a voltar aos níveis normais; (iii) regulação tardia, que inclui genes cuja expressão tende a aumentar/diminuir apenas em 48 horas; e (iv) regulação transitória, que inclui genes cuja expressão se inverte nos dois transcritomas (aumenta em 24 horas e diminui em 48 horas, ou vice-versa).

Conforme apresentado em 11C, observamos que a maior parte (aprox. 40%) dos genes apresenta regulação transitória (sendo que 48% deles obedece uma regulação do tipo aumento em 24hs seguido por repressão em 48hs, e 51% a tendência inversa). Também notamos que, entre os genes cuja expressão permanece sustentada, a maior parte (69%) está reprimida. O mesmo ocorre com os genes que são regulados na fase tardia (48 horas): a maior parte (79%) foi reprimida.

Em seguida, complementamos a análise de agrupamento pela classificação funcional dos genes presentes em cada um dos oito grupos de expressão, conforme apresentado pela Figura 12.



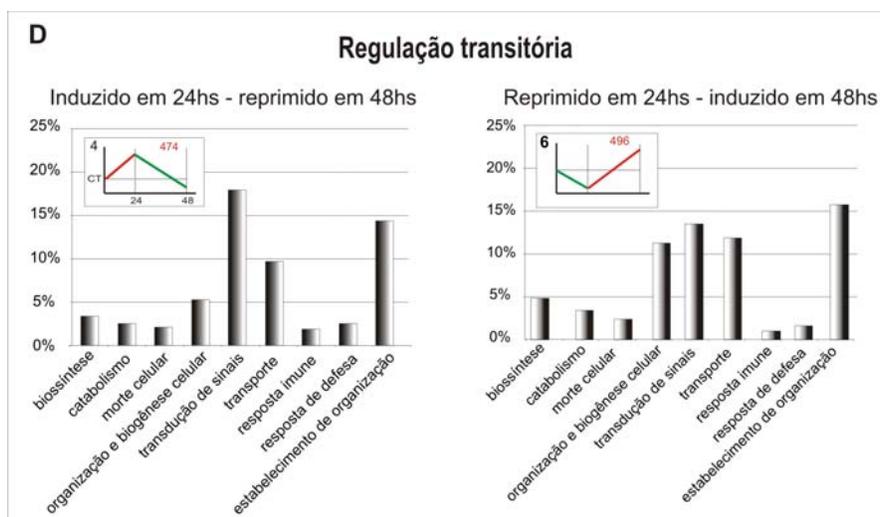


Figura 12- Análise do perfil funcional dos quatro grupos definidos de acordo com o tipo de regulação da expressão gênica entre 24 e 48 horas: (A) regulação inicial; (B) regulação tardia; (C) regulação sustentada; (D) regulação transitória. A tendência de expressão foi discriminada para cada grupo. O esquema de cores das colunas acompanha o definido nas figuras anteriores: preto indica indução gênica e cinza indica repressão gênica. No caso da regulação transitória, utilizamos uma cor de transição preto-cinza para a regulação do tipo indução inicial e repressão tardia, e cinza-preto para a situação oposta.

Podemos observar pela análise da Figura 12A que, entre os genes com tendência à indução na fase inicial (24 horas), não existem genes relacionados à função “morte celular”. A maioria dos genes com este perfil de expressão está presente na classe “estabelecimento de organização” (~17%).

Pela avaliação da Figura 12B, entre os genes com tendência à indução na fase tardia (48 horas), não existem genes relacionados às classes “catabolismo”, “morte celular”, “resposta imune” e “resposta de defesa”. Já entre os genes com tendência à repressão tardia, a maioria pertence à classe “transdução de sinais” (~21%).

Pela análise da Figura 12C, que apresenta os genes que tendem a permanecer induzidos nos dois períodos, notamos a ausência das classes “morte celular”, “resposta imune” e “resposta de defesa”. Entre os genes com tendência à repressão sustentada, estão ausentes genes pertencentes às classes “resposta imune” e “resposta de defesa”.

Finalmente, na Figura 12D vemos que entre os genes que apresentam tendência de regulação transitória no sentido de indução em 24 horas e repressão em 48 horas, existe uma prevalência dos genes pertencentes à classe de “transdução de sinais” (~18%), semelhante ao perfil observado no grupo 5 (reprimidos em 48 horas, ~21%, Fig 12B). Na categoria com expressão inversa, i.e., reprimidos em 24 hs e induzidos em 48 hs, notamos um aumento na participação da categoria “organização e biogênese celular” (~11%), semelhante ao observado nos grupos 2 (induzidos em 48 horas, ~13%, Fig 12B) e 7 (reprimidos em 24 horas, ~11, Fig 12A).

4.9- Análise das ESTs diferencialmente expressas

Pela impossibilidade de realizar investigações funcionais como as anteriormente feitas para os genes conhecidos, classificamos as ESTs de acordo com sua nomenclatura. Uma vez que as ESTs recebem o nome da biblioteca de cDNA a partir da qual foram identificadas, então esta análise foi conduzida para avaliar possíveis tendências na contribuição de seqüências expressas em tecidos e/ou estágios de desenvolvimento específicos dentre os genes diferencialmente expressos em nosso estudo. Estes resultados estão apresentados pela Figura 13.

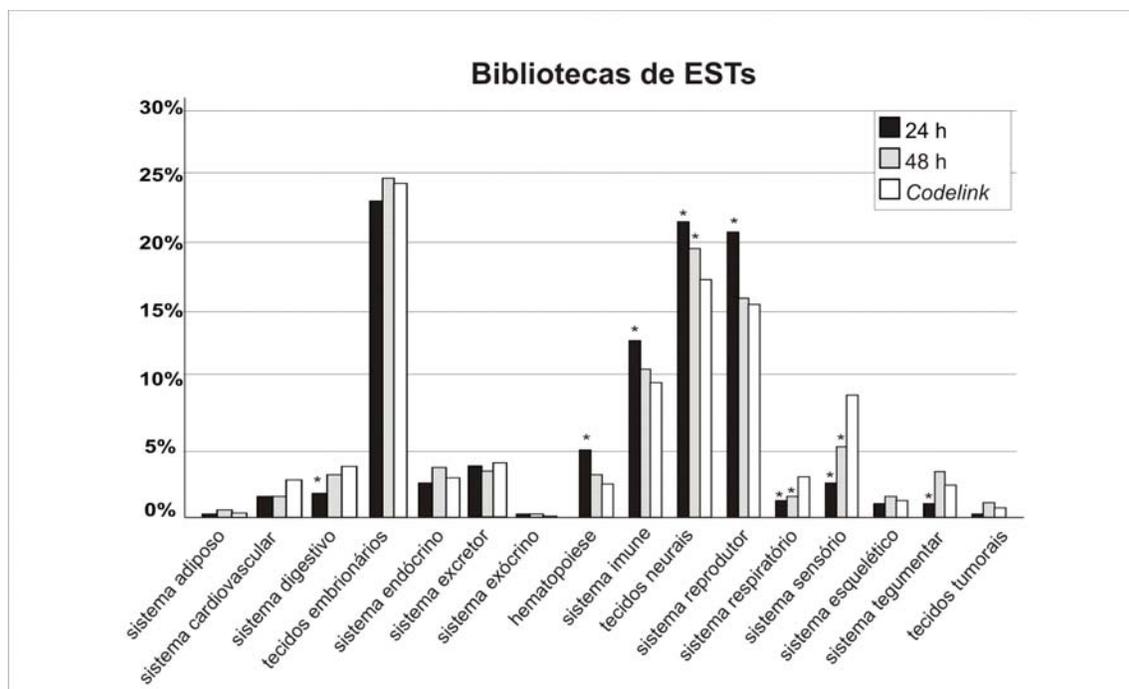


Figura 13- Classificação e distribuição das etiquetas de seqüências expressas (ESTs) em classes representativas dos principais sistemas fisiológicos de mamíferos. Colunas marcadas com um asterisco se referem às classes cujas distribuições nos transcritomas desencadeados pelo tratamento por DMA (24 ou 48 h) apresentaram-se estatisticamente distintas da distribuição esperada (*Codelink*) ($p < 0.05$).

Observamos na Figura 13 que as ESTs provenientes de bibliotecas de cDNA específicas de tecidos neurais e dos sistemas reprodutivo, imunológico e hematopoiético foram considerados super-representados no transcritoma de 24 horas. Apesar de a mesma tendência ser observada em 48 horas, apenas ESTs provenientes de bibliotecas de tecidos neurais foram consideradas estatisticamente super-representadas.

Já a classe de ESTs provenientes de tecidos associados ao sistema digestivo foi considerada menos representada no transcritoma de 24 h do que a proporção esperada, enquanto as classes de ESTs de sistema respiratório e de sistema sensório foram menos representadas tanto em 24 quanto em 48 horas após o tratamento.

A identidade de todas as ESTs diferencialmente expressas em ambos os transcritomas, classificadas de acordo com os sistemas fisiológicos a que pertencem as bibliotecas de cDNA em que foram seqüenciadas, pode ser consultada no Apêndice 2.

Da mesma forma que anteriormente realizado para os genes conhecidos, avaliamos a distribuição de ESTs nestas classes em função da sua expressão, i.e., a proporção entre indução e repressão de sua expressão. A Figura 14 apresenta estes resultados em ambos os transcritomas.

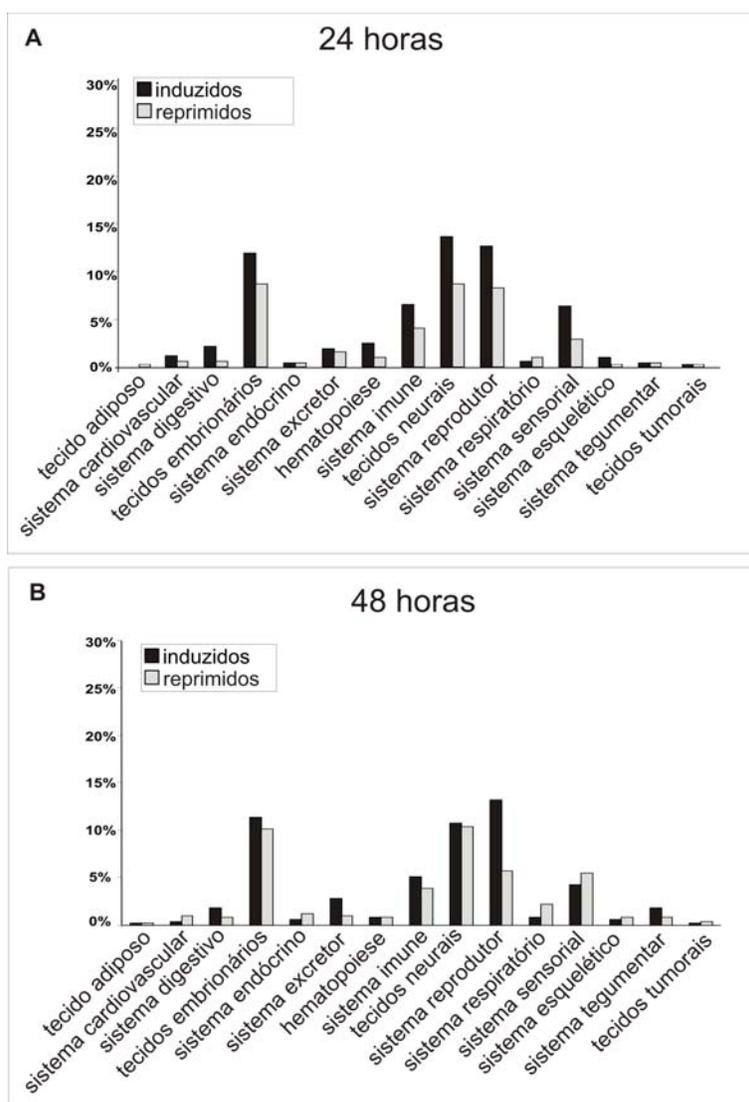


Figura 14- Distribuição das ESTs segundo sua regulação transcricional (indução ou repressão), em cada uma das classes representativas dos principais sistemas fisiológicos de mamíferos. **A-** Distribuição no transcritoma desencadeado 24 horas após o tratamento por DMA. **B-** Distribuição no transcritoma desencadeado 48 horas.

Conforme podemos observar na Figura 14, as ESTs apresentam uma proporção relativamente homogênea entre indução e repressão de sua expressão em ambos os transcritomas.

Entretanto, em 24 horas (Figura 14A) observamos que, em geral, as classes possuem uma maior proporção de ESTs induzidas, principalmente as classes provenientes de tecidos embrionários, sistema imune, tecidos neurais, sistema reprodutivo e sistema sensorial.

Em 48 horas (Figura 14B) observamos um aparente equilíbrio entre indução e repressão gênica, com exceção da classe das ESTs provenientes de tecidos do sistema reprodutivo, que apresentaram-se induzidas em sua maioria.

Também realizamos a análise de agrupamento das ESTs em função de sua expressão em ambos os transcritomas, conforme apresentado pela Figura 15.

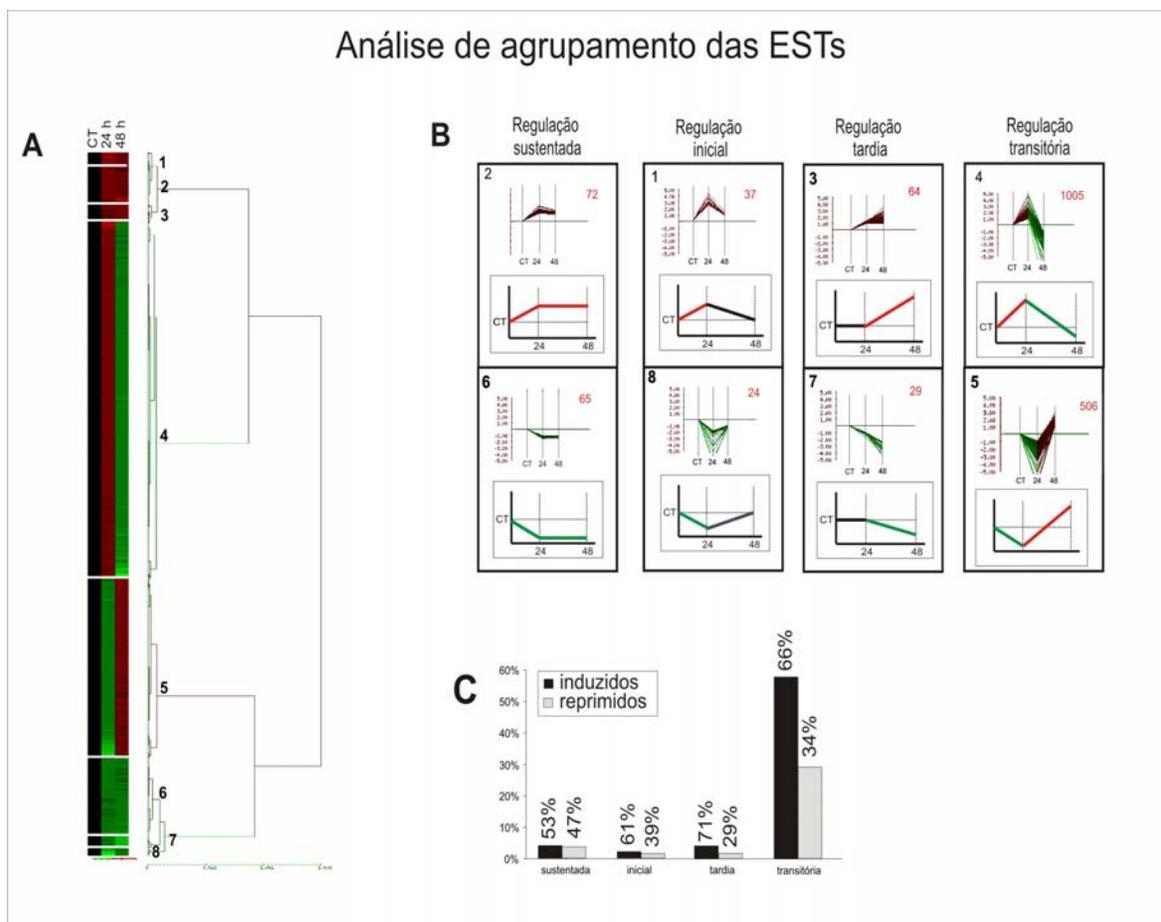
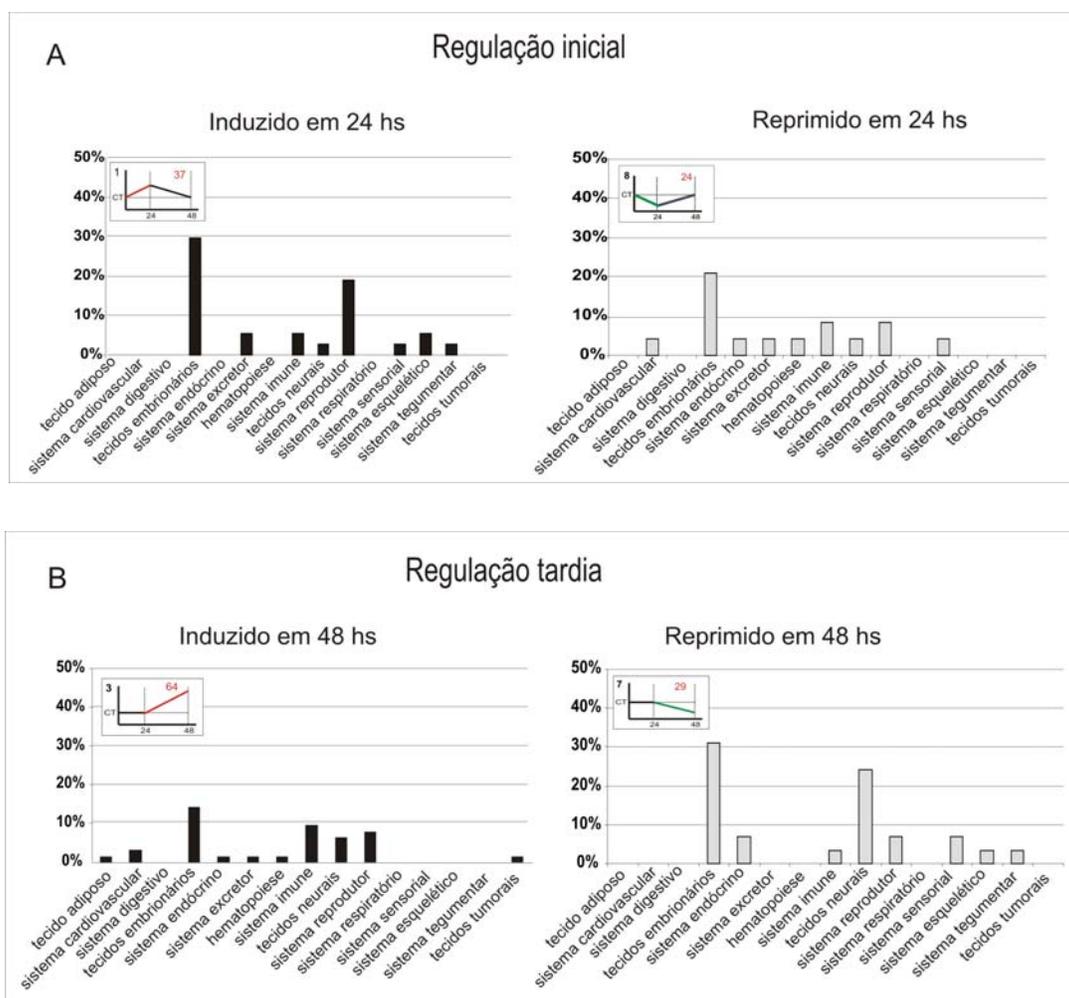


Figura 15- Análise de agrupamento das ESTs em função de sua expressão em 24 e 48 horas após a administração do composto quinazolinico. As representações seguem o previamente definido para a análise de agrupamento dos genes conhecidos. **A-** Representação da análise de agrupamento através de uma árvore hierárquica. Marcados de 1 a 8, os perfis de expressão selecionados para estudo detalhado. **B-** Gráficos demonstrativos dos quatro principais tipos de regulação gênica representados pelos grupos 1-8. **C.** Distribuição dos genes diferenciais entre os quatro tipos de regulação. O valor acima das colunas se refere à proporção entre indução e repressão da expressão das ESTs em cada tipo de regulação.

Conforme podemos observar na Figura 15A e B, a expressão das ESTs também pode ser agrupada de acordo com os quatro tipos principais de regulação: inicial, tardia, sustentada e transitória. Notamos que a maior parte das ESTs apresentam regulação transitória (grupos 4 e 5). Na Figura 15C podemos observar ainda que, entre as ESTs cuja expressão permanece sustentada, ocorre uma tendência a equilíbrio entre indução (51%) e repressão (47%) da sua expressão. Já nos demais tipos de regulação, as ESTs estão em sua maioria induzidas (61-71%).

Em seguida, analisamos cada um dos 8 grupos com base na classificação das ESTs nos principais sistemas fisiológicos de mamíferos. A Figura 16 apresenta estes resultados.



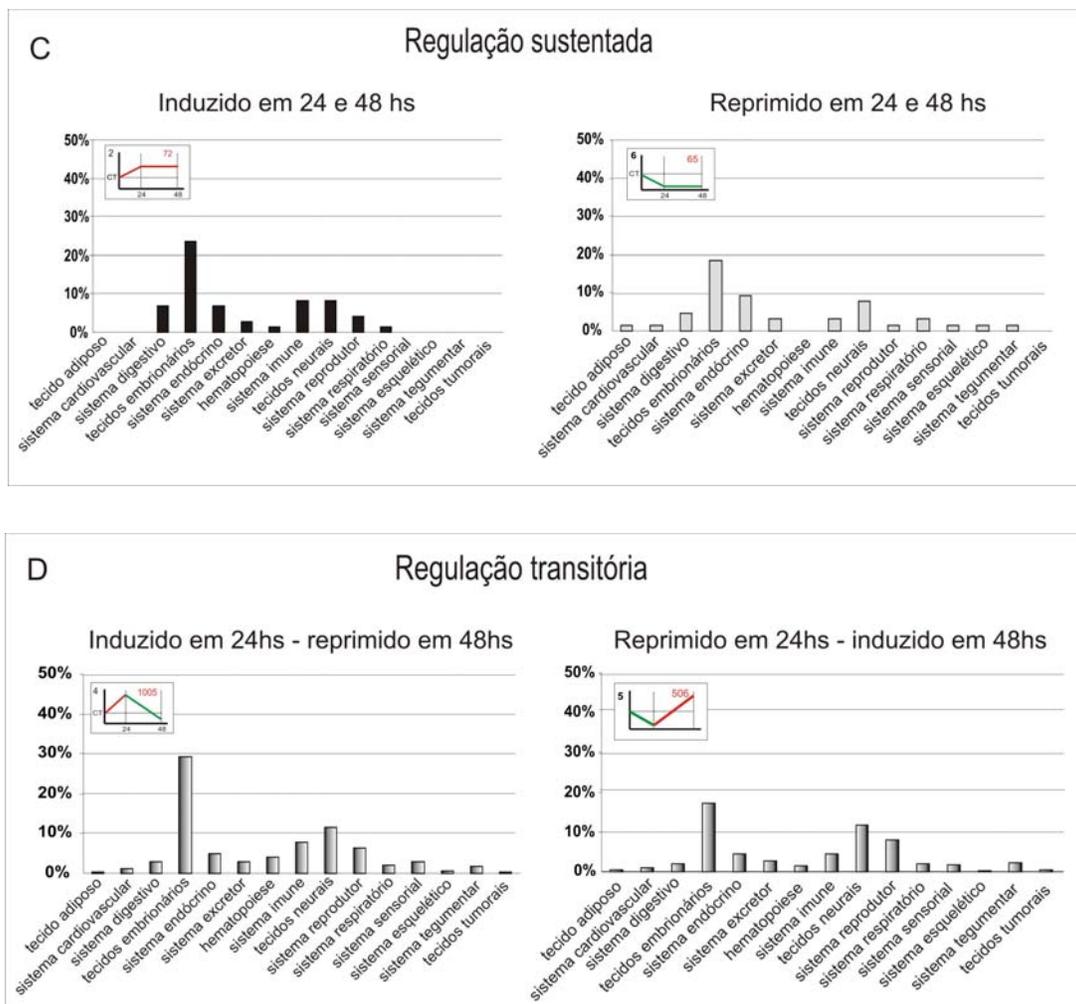


Figura 16- Análise do perfil funcional dos quatro grupos definidos de acordo com o tipo de regulação da expressão das ESTs em 24 e 48 horas: **(A)** regulação inicial; **(B)** regulação tardia; **(C)** regulação sustentada; **(D)** regulação transitória. A tendência de expressão foi discriminada para cada grupo. O esquema de cores das colunas acompanha o definido nas figuras anteriores: preto indica indução gênica e cinza indica repressão gênica. No caso da regulação transitória, utilizamos uma coloração preto-cinza para a regulação do tipo indução inicial/repressão tardia, e cinza-preto para a situação oposta.

Conforme podemos observar na Figura 16, em todos os grupos, a maior parte das ESTs foi obtida a partir de tecidos embrionários. De acordo com a Figura 16A, entre as ESTs que apresentam uma tendência à indução na fase inicial (grupo 1), pronunciam-se também aquelas descritas em tecidos do sistema reprodutor (~20%).

A análise da Figura 16B revela que, no grupo das ESTs reprimidas tardiamente (grupo 7), há uma relativa abundância de ESTs na classe de tecidos neurais (~20%). Notamos ainda que, no grupo de ESTs que apresenta tendência à indução tardia, ocorrem algumas ESTs descritas em tecido adiposo (~1%) e tecidos tumorais (~1%), classes ausentes nos grupos anteriores.

Na Figura 16C observamos que, entre as ESTs que apresentam tendência a indução sustentada, a maior parte foi descrita em tecidos embrionários (~25%). Dentre as ESTs pertencentes ao grupo com repressão sustentada (grupo 6), observamos a ocorrência de ESTs descritas no tecido adiposo (~1%) e em sistema cardiovascular (~1%).

Finalmente, entre as ESTs que apresentam tendência de regulação transitória no sentido de indução em 24 horas e repressão em 48 horas (grupo 4), aquelas descritas em tecidos embrionários atingem a proporção de 30% — a mesma quantidade observada nos grupos 1 (indução em 24 hs) e 7 (repressão em 48 hs). Já no grupo de ESTs que apresenta expressão inversa, i.e., são reprimidas em 24 hs e induzidas em 48 hs (grupo 5), a participação das ESTs descritas nos tecidos embrionários é menor (~18%). Comparando os perfis obtidos em ambos os grupos, observamos ainda que as ESTs descritas em tecidos do sistema imune e sistema reprodutor apresentam distribuições opostas nestes dois grupos (~8% e 6% no grupo 4, em comparação à ~5% e 8% no grupo 5, respectivamente).

Após as análises dos genes conhecidos e ESTs diferencialmente expressos em miocárdio 24 e 48 horas após o tratamento pela quinazolina DMA, investigamos as identidades gênicas em busca das vias metabólicas possivelmente alteradas em resposta ao composto quinazólico.

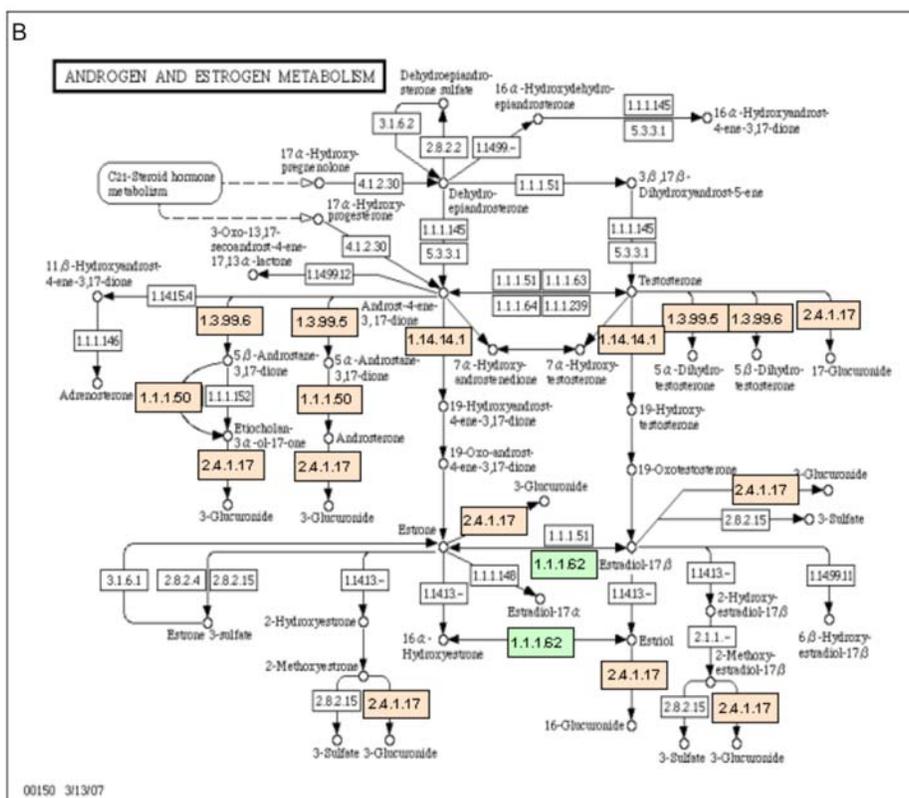


Figura 17- Exemplos de vias metabólicas e de sinalização obtidas após submissão dos genes diferencialmente expressos ao banco de dados KEGG. **A-** Via de sinalização das adipocitocinas. **B-** Metabolismo de hormônios andrógenos e estrógenos. Em ambos os casos, caixas marcadas em tom alaranjado se referem aos genes cuja expressão aumentou após o tratamento por DMA; em verde, genes cuja expressão diminuiu. Dentro das caixas, os símbolos se referem às proteínas codificadas pelos genes; os números, à identificação das enzimas (EC: *Enzyme Class*). AMPK (*protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit*); CPT-1 (*carnitine palmitoyltransferase 1b*); GLUT4 (*solute carrier family 2, member 4*); NFκB (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer*); SHP-2 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13*); STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*); TNFα (*tumor necrosis factor alpha*); TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21*); TRAF2 (*TRAF family member-associated NF-kappa B activator*); EC 1.1.1.50 (*aldo-keto reductase family 1, member C4*); EC 1.1.1.62 (*estradiol 17-beta-dehydrogenase*); EC 1.14.14.1 [*testosterone 16a-hydroxylase, type a gene (Cytochrome P450 2D9)*]; EC 1.3.99.5/6 (*aldo-keto reductase family 1, member C18*); EC 2.4.1.17 (*UDP-glucuronosyltransferase 8*).

A Figura 17A apresenta a via das adipocitocinas e os genes diferencialmente expressos que estão inseridos nesta via. Podemos notar genes diferencialmente expressos apontando para o consumo de glicose (AMPK, GLUT4), a beta-oxidação de lipídeos (CPT-1), o crescimento celular (SHP-2) e a regulação da expressão gênica (NFkB e STAT3). Interessante, os genes que estão inseridos na região da via metabólica que aponta para a diminuição do consumo de glicose e resistência à insulina (TNF α , TNFR1 a TRAF2) estão reprimidos, indicando que esta resposta está diminuída em corações tratados por DMA.

A Figura 17B apresenta as reações do metabolismo de hormônios andrógenos/estrógenos. Podemos notar que, de forma geral, os genes cuja expressão foi alterada codificam enzimas polifuncionais, i.e., que participam de diversas reações, e estes genes encontram-se, em sua maioria, induzidos.

As informações destes mapas foram compiladas e complementadas com dados obtidos através de consultas aos bancos de genes (NCBI), proteínas (Swiss-Prot) e a literatura especializada, de forma a nos permitir a geração de um metaboloma putativo, conforme apresentado no Apêndice 3.

Esta representação ampla apresenta as principais vias metabólicas que foram alteradas em resposta ao tratamento pelo DMA, de acordo com nossos resultados de expressão gênica. As vias modificadas estão identificadas pelos símbolos dos genes ou, em alguns casos, das proteínas que eles codificam.

4.11- Ensaios confirmatórios dos efeitos do tratamento pela quinazolina DMA

4.11.1- Confirmação da expressão gênica

Foram selecionados para confirmação da expressão, através de *Real Time*-PCR, 12 genes e 1 controle endógeno. As identidades e a seqüências dos primers utilizados para os ensaios estão listados na Tabela 3.

Tabela 3- Genes selecionados para estudo confirmatório da expressão após o tratamento pela quinazolina, através de PCR semiquantitativo e RT-PCR. Estão apresentados os valores de expressão e respectivos valores de significância estatística (*p.value*) em 24 e 48 horas. FW; primer *forward* ou sense. RW; primer *reverse* ou antisense.

Gene	Expressão (24 hs)	p.value	Expressão (48hs)	p.value	Seqüência
<i>angiopoietin-like 4 (Angptl4)</i>	4,54	0,0442	1,02	0,6914	Fw 5' AAGATGACCCAGCTCATTGG 3' Rw 5' AAAGTCCACTGTGCCTCTCC 3'
<i>carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle (Cpt1b)</i>	2,00	0,0819	1,74	0,5668	Fw 5' GGACCGTGAAGAGATCAAGC 3' Rw 5' CTGGGATGCGTGTAGTGTG 3'
<i>estradiol 17-beta-dehydrogenase (17βHSD)</i>	-9,36	0,0025	1,72	0,3953	Fw 5' GTTATGAGCAAGCCCTGAGC 3' Rw 5' AGCGGTTTCGTGGAGAAGTAG 3'
<i>fibroblast growth factor 4 (Fgf4)</i>	1,46	0,5399	2,38	0,0025	Fw 5' GGAGCACTTCTCTCGATGG 3' Rw 5' CCCCCGAAAATGAGAATAC 3'
<i>hexokinase 1 (Hk1)</i>	3,88	0,0318	-1,02	0,5214	Fw 5' GAGGCATCTTCGAGACCAAG 3' Rw 5' TTAGACCCAGCTGCTGAAGG 3'
<i>phosphodiesterase 5A, cGMP-specific (Pde5a)</i>	1,59	0,3013	-3,07	0,0875	Fw 5' AACCTGGCCTATTCAACAAC 3' Rw 5' GCCGGCTCCATGTTAAGTTC 3'
<i>pre-B-cell colony-enhancing factor 1 (Pbef1)</i>	4,36	0,0096	1,22	0,8719	Fw 5' CAGCAGCAGAGCACAGTACC 3' Rw 5' ATCGCTGACCACAGACACAG 3'
<i>protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit (ampk)</i>	2,43	0,06	1,07	0,6056	Fw 5' ATGGTGGATTCCCAAAAAGTG 3' Rw 5' GGGGCTTTGAACCTCTCTTC 3'
<i>retinol dehydrogenase 6 (Rdh6)</i>	2,85	0,0729	-1,34	0,2179	Fw 5' CAGACCAGCTCAGAAATCAGG 3' Rw 5' ACAGGTCCTTGTTGCACCTC 3'
<i>signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)</i>	2,23	0,0479	-1,12	0,8777	Fw 5' AGACTCTGGGGATGTTGCTG 3' Rw 5' AGGCTGCCGTTGTTAGACTC 3'
<i>testis expressed gene 12 (Tex12)</i>	-16,21	1,00E-04	2,48	0,4168	Fw 5' GAATTGGAGCCTCAGGTGTC 3' Rw 5' TCGCTCAAATCCTTCTCCAG 3'
<i>glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (gapdh)</i>	-1,04	NA	1,46	NA	Fw 5' TAGAGGGACAAGTGGCGTTC 3' Rw 5' CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG 3'

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de RT-PCR em comparação aos valores de expressão obtidos nos microarranjos *Codelink*.

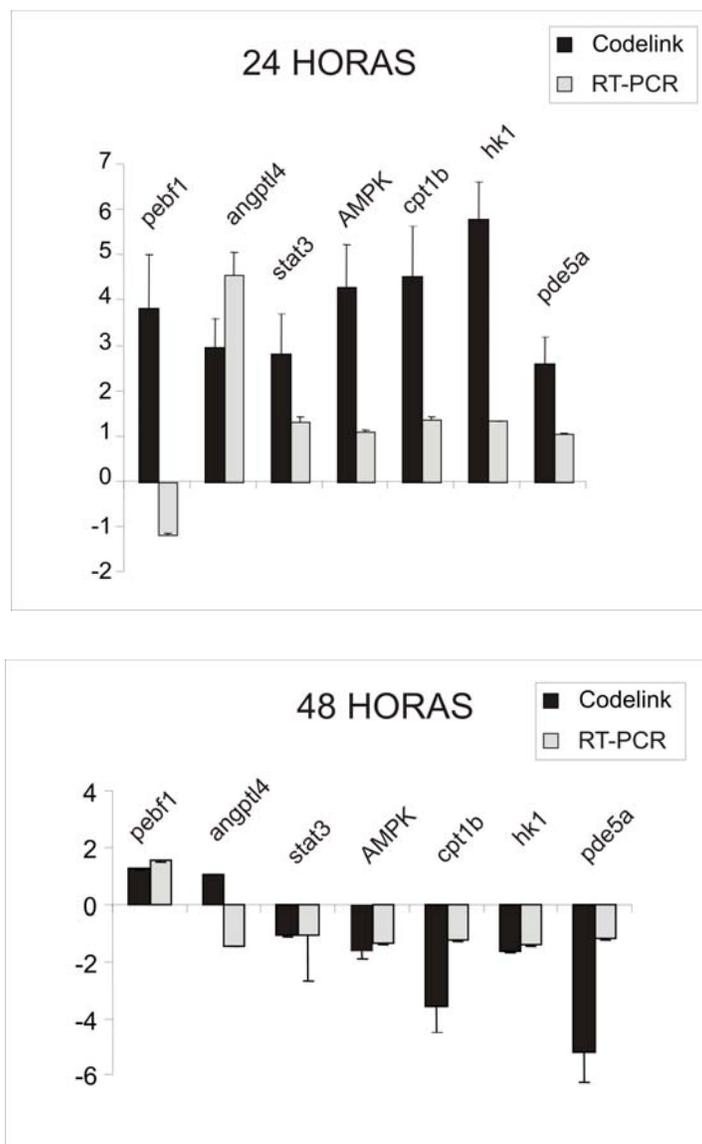
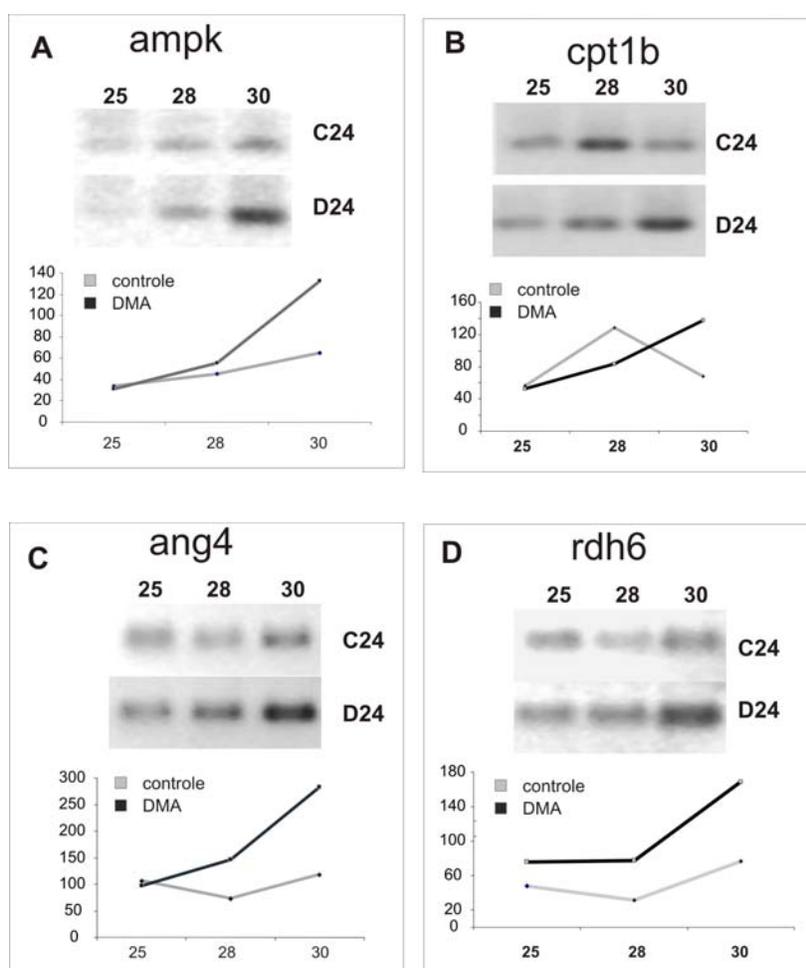


Figura 18- Expressão de alguns genes nos microarranjos *Codelink* e nos ensaios de RT-PCR, em ambos os tempos estudados (24 e 48 horas). A amplitude da variação da expressão está apresentada no eixo lateral. O desvio-padrão foi calculado para 3 amostras nos microarranjos e para 2 amostras no RT-PCR.

Segundo os resultados apresentados pela Figura 18, a tendência de expressão se confirma nas duas técnicas para a maior parte dos genes, exceto *pebfl* em 24 horas e *angptl4* em 48 horas.

Além dos ensaios de RT-PCR, utilizamos os mesmos pares de primers e amostras de cDNA para a realização de alguns ensaios de PCR semi-quantitativo. A Figura 19 apresenta estes resultados.



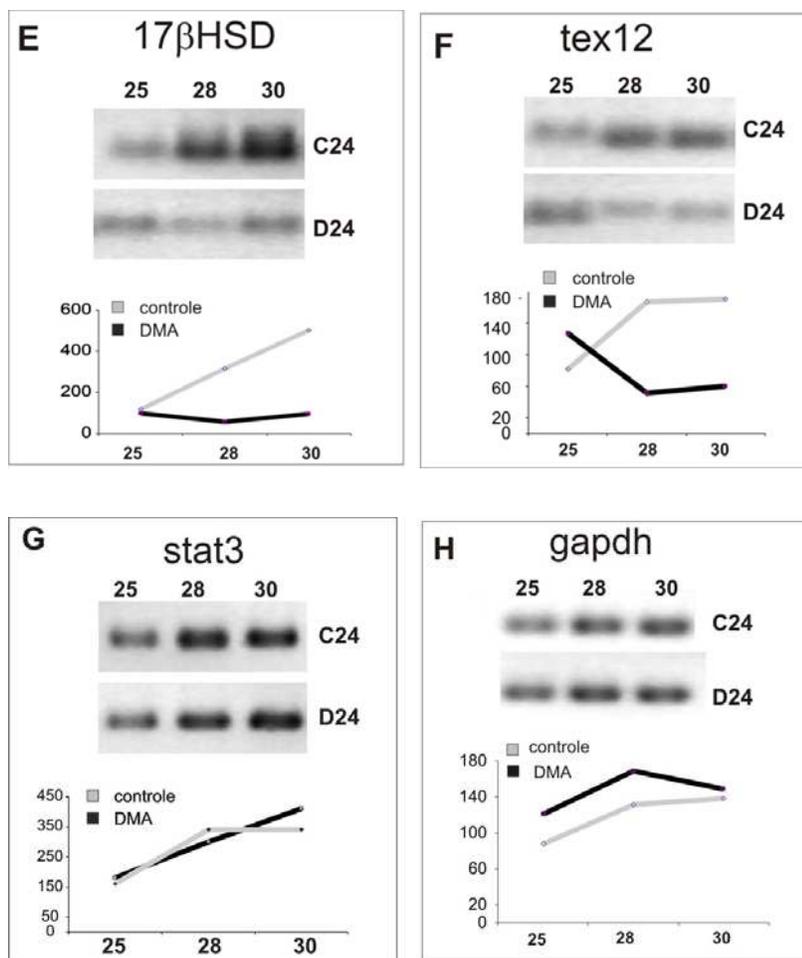


Figura 19- Ensaio de PCR semiquantitativo realizados para alguns dos genes selecionados para confirmação da expressão. **A-H.** Resultados obtidos em algum dos genes (identificados pelas siglas definidas na Tabela 3). Os identificadores 25, 28 e 30 referem-se ao número de ciclos de amplificação, partindo-se de uma mesma quantidade de cDNA proveniente das amostras C24 (controle 24 horas) e D24 (tratamento por DMA 24 horas). Os gráficos representam os valores obtidos pela leitura densitométrica de cada amostra.

Estes experimentos apresentados pela Figura 19 foram conduzidos de forma a complementar os RT-PCR, e confirmaram a tendência de expressão dos genes *ampk*, *angptl4*, *rdh6*, *17βHSD* e *Tex12*.

4.11.2- Expressão de proteínas

Para avaliar a expressão de algumas proteínas codificadas por genes que se apresentaram diferencialmente expressos, realizamos a coleta de miocárdios de camundongos tratados pelo composto ou pelo veículo nos tempos de 24 e 48 horas após o tratamento, para a obtenção do extrato de proteínas totais destes tecidos. Utilizamos anticorpos específicos de algumas proteínas de interesse para realizar a estimativa de sua quantidade após o tratamento pela quinazolina DMA. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos.

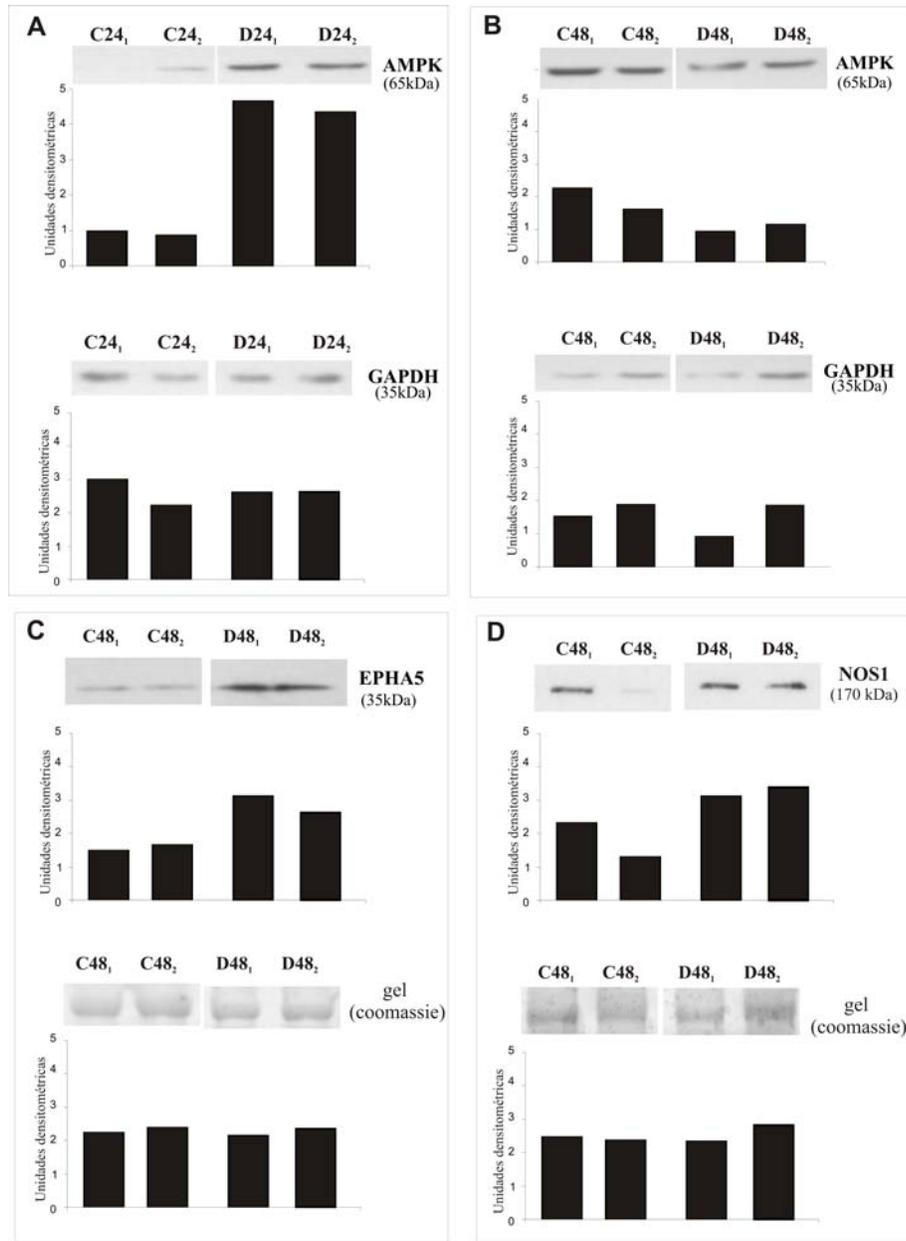


Figura 20- Ensaio de *Western blotting* para estudo da expressão de proteínas de interesse em miocárdios provenientes de camundongos tratados pelo DMA 24 (D24) ou 48 horas (D48) antes da coleta do tecido. O mesmo procedimento foi conduzido em animais tratados apenas pelo veículo DMSO (C24 e C48). **A-** Expressão de AMPK e GAPDH (controle endógeno). **B-** Expressão de AMPK e GAPDH. **C.** Expressão de EPHA5 e respectivo gel corado por coomassie (controle técnico). **D.** Expressão de NOS1 e respectivo gel corado por coomassie.

De acordo com os resultados, existe um nítido aumento da expressão da proteína AMPK 24 horas após o tratamento por DMA (Figura 20A), e esta expressão parece ser revertida em 48 horas (Figura 20B). Estes resultados parecem conferir com aqueles observados para a expressão do gene *ampk* em 24 e 48 horas, tanto por RT-PCR como nos microarranjos.

A expressão da proteína EPHA5 (Figura 20C) sofreu um aumento em 48 horas, bem como a proteína NOS1 (Figura 20D). Em ambos os casos, havíamos observado aumento da expressão dos genes *ephA1* e *nos* (*neuronal NOS*) no transcrito 24 horas após o tratamento.

4.11.3- Modelo *in vitro* para estudo da angiogênese

Conforme as análises realizadas, dentre os metabolismos alterados pelo tratamento com DMA obtivemos expressão diferencial de diversos genes envolvidos na angiogênese. Para verificar se esta resposta estava sendo efetivamente induzida pelo DMA, realizamos um ensaio de diferenciação e proliferação de células endoteliais *in vitro*. Utilizamos células endoteliais prostáticas (PECs) para os ensaios, uma vez que não se diferenciam espontaneamente em Matrigel, precisando da suplementação de fatores de crescimento.

Em nosso estudo, utilizamos o tratamento de DMA como suplementação única, nas doses de 10nM ou 100nM, em comparação à suplementação única com o veículo (DMSO). O efeito do DMA sobre a diferenciação das PECs foi avaliado através da formação de estruturas capilariformes e da estimativa da proliferação celular. A Figura 21 apresenta estes resultados.

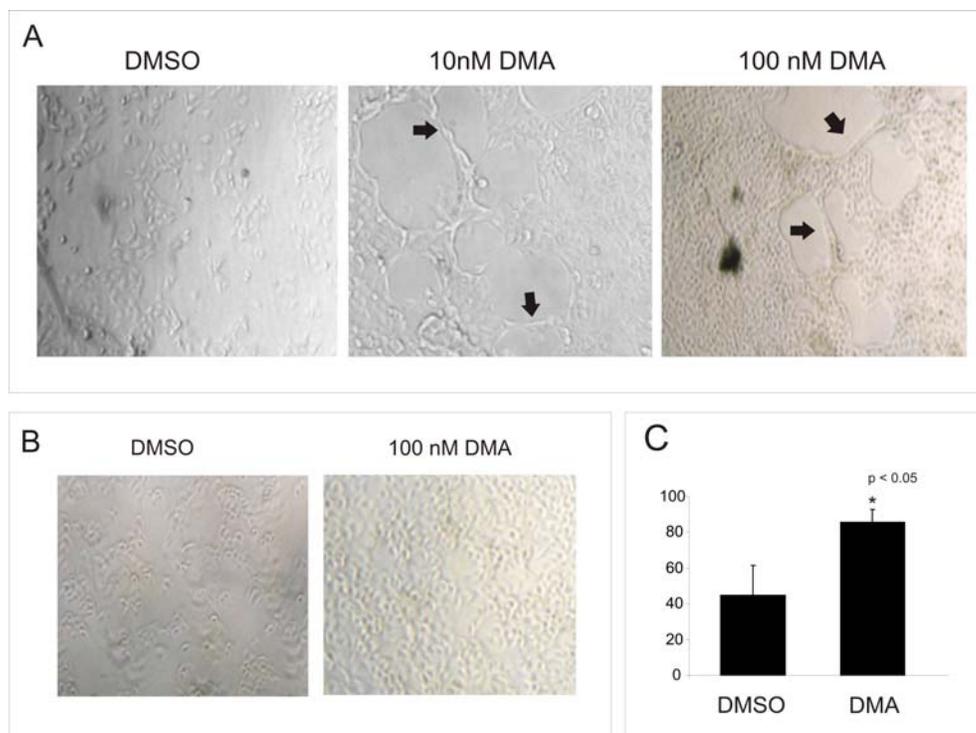


Figura 21- Confirmação dos efeitos angiogênicos do tratamento pela quinazolina DMA.

A- Ensaio de diferenciação de células endoteliais tratadas com 10 ou 100nM de DMA em relação ao tratamento com o veículo, DMSO. As setas apontam estruturas do tipo capilar, que indicam a diferenciação das células endoteliais.

B- Efeito proliferativo observado nas amostras tratadas por 100nM de DMA em relação ao controle experimental. **C.** Estimativa do número de células na amostras controle e tratadas. O asterisco denota diferença significativa entre as duas amostras.

A formação de estruturas do tipo capilar foi observada apenas nas amostras tratadas por DMA 24 horas após o tratamento, em ambas as doses utilizadas (Fig. 21A). Além disso, observamos um pronunciado aumento no número de células após o tratamento, especialmente na dose de 100nM de DMA (Fig 21B). Nesta dose, a estimativa do número de células indicou um aumento da ordem de 2 vezes entre as amostras controle e as amostras tratadas (Fig. 21C).

5- DISCUSSÃO

O fenômeno da proteção miocárdica tardia induzida por isquemia ou por fármacos depende da interação de mecanismos complexos que envolvem diversos aspectos da função celular. No presente estudo foi avaliado (1) o efeito tardio do composto quinazolínico DMA na resposta de corações isolados de camundongos à agressão pelo fenômeno de isquemia/reperfusão e (2) os efeitos tardios do tratamento com o composto quinazolínico DMA na expressão ampla de genes em corações de camundongos.

Demonstramos que o tratamento com compostos quinazolínicos 24, 48 e 72 horas antes da agressão por isquemia/reperfusão promoveu proteção miocárdica, identificada pelo melhor desempenho sistólico e diastólico dos corações tratados com o composto do que aqueles tratados com o veículo. Paralelamente, a análise da expressão gênica ampla em 24 e 48 horas após o tratamento com DMA indicou profundas alterações na expressão de genes relacionados a diversas funções celulares, potencialmente envolvidas nos mecanismos fundamentais relacionados à proteção miocárdica.

Iremos apresentar a discussão dos resultados enfocando primeiramente as análises gerais dos microarranjos, de forma a apresentar um painel descritivo dos transcritomas de 24 e 48 horas (Seção 5.1.). Em seguida, iremos apresentar as análises detalhadas dos genes diferencialmente expressos em função das vias metabólicas em que estão inseridos, de forma a montar um panorama global da ação do composto quinazolínico em miocárdio (Seção 5.2.). Finalmente, a discussão será direcionada aos resultados com potencial para auxiliar na compreensão dos mecanismos de cardioproteção induzida pela quinazolina DMA (Seção 5.3.).

5.1- Estudo descritivo dos transcritomas desencadeados em miocárdio de camundongos 24 e 48 horas após o tratamento pela quinazolina DMA

O estudo da expressão gênica da fase tardia (24 e 48 horas) da cardioproteção induzida pelo composto quinazolínico DMA envolveu a hibridação de sondas fluorescentes de RNA mensageiro de corações de camundongos tratados com DMA em microarranjos comerciais contendo a coleção de genes presentes no genoma de camundongo (35 mil genes). As seqüências consideradas diferencialmente expressas nos corações tratados com DMA foram posteriormente identificadas através de análise computacional.

A lista completa de genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento por DMA em 24 e 48 horas pode ser consultada nos Apêndices 1 (genes conhecidos) e 2 (genes funcionalmente desconhecidos).

Diferentemente dos microarranjos de cDNA, os microarranjos de oligonucleotídeos *Codelink* são fabricados a partir da deposição de sequências nucleotídicas curtas (60 bases) em lâminas de vidro. Estas sequências são sintetizadas a partir das informações depositadas nos bancos de dados gerados após o sequenciamento dos genes presentes no genoma de camundongo. Assim, grande parte das sequências corresponde a genes cujas funções ainda não foram descritas. Neste caso, as seqüências recebem por nome os identificadores da coleção de mensagens expressas (bibliotecas de cDNA) a partir da qual foram originalmente sequenciados (por exemplo, “*adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700086D15 product: hypothetical protein, full insert sequence*”). Por este motivo, estas seqüências são tecnicamente denominadas ESTs (*Expressed Sequence Tags*), podendo ser traduzidas como “etiquetas de seqüências expressas”.

Verificou-se que a expressão gênica no miocárdio apresentou uma grande modificação 24 horas após o tratamento com DMA. Neste período foram diferencialmente expressos 1061 genes, dos quais apenas 37% são conhecidos; os demais constituem genes ainda não caracterizados funcionalmente (ESTs). Em ambos os casos, a maioria dos genes teve sua expressão aumentada após o tratamento por DMA (75% dos genes conhecidos e 62% das ESTs aumentaram sua expressão), sugerindo uma ativação da expressão gênica neste momento.

Em 48 horas após o tratamento com DMA, observamos expressão diferencial de 844 genes, sendo que apenas 24% deles constituem genes conhecidos. Neste período, a diferença entre indução e repressão gênica não foi tão pronunciada (56% dos genes conhecidos e 58% das ESTs têm sua expressão aumentada), sugerindo uma tendência ao equilíbrio entre indução/repressão gênica neste momento.

Interessante, notamos que o número absoluto de genes reprimidos foi bastante semelhante em ambas as categorias (genes conhecidos/ESTs) em ambos os períodos (85/274 em 24 horas *versus* 86/275 em 48 horas). Isto poderia sugerir que, dada a observação de uma tendência ao equilíbrio indução/repressão em 48 horas, esta situação

pode ser sustentada pela redução na indução gênica em 48 horas, e não o aumento na repressão gênica.

Em seguida, passamos à análise da função biológica representada por estes genes diferenciais em resposta ao tratamento pelo DMA, de forma a tentar caracterizar quais as principais respostas celulares afetadas. Nesta análise, pudemos explorar apenas as funções associadas aos genes conhecidos, dado que as ESTs constituem genes que ainda não foram funcionalmente categorizados. Assim, classificamos os genes conhecidos de acordo com as classes definidas pelo Gene Ontology e utilizamos como referência a distribuição esperada dos genes presentes no genoma de camundongo, conforme descrito por [94]. Assim, pudemos acessar a significância estatística do perfil funcional desencadeado 24 e 48 horas após o tratamento pela quinazolina ($p < 0.05$).

Este cuidado estatístico baseou-se no fato de que os genes presentes em um genoma não são distribuídos igualmente entre as diversas categorias funcionais e, portanto, uma maior proporção de determinada categoria em um determinado transcrito não reflete necessariamente uma maior participação desta função nestas células. Para tanto, deve ser avaliado primeiro quantos genes no genoma estudado pertencem a cada uma das categorias funcionais que se deseja estudar, e só então analisar quantos genes diferencialmente expressos pertencem a estas funções. Como, *a priori*, a transcrição gênica segue proporções que atendem às demandas das células, então desvios nas proporções esperadas para estas classes funcionais devem refletir as alterações desencadeadas nas células após determinado estímulo de interesse.

Assim, em 24 horas observamos que as categorias funcionais que apresentaram significância estatística foram “adesão celular”, “sinalização célula-célula”, “metabolismo de proteínas”, “resposta a estresse”, “transporte” e a classe genérica “outros processos metabólicos”. Já em 48 horas, apresentaram-se significativamente mais representadas as classes “adesão celular”, “desenvolvimento de organismo multicelular” e novamente a classe genérica “outros processos metabólicos”. Estes resultados indicam uma maior alteração funcional em 24 horas do que em 48 horas e isto parece coerente com a observação da maior ativação gênica neste momento, conforme discutido acima.

Uma vez que a classe genérica “outros processos metabólicos” pode compreender diversas funções biológicas de interesse para compreender as respostas celulares ao tratamento pelo DMA, buscamos observar quais as subcategorias representadas nesta classe e que se encontram significativamente mais ou menos representadas após o tratamento. Chamou-nos a atenção a prevalência de classes associadas às respostas a estresse em 24 horas (“resposta imune”, “resposta a outros organismos”, “resposta a peste, patógeno ou parasita” e “resposta a fermento”). Também nos chamou a atenção a grande representação das classes associadas a processos neurofisiológicos em ambos os transcritomas (“neurodiferenciação” e “desenvolvimento do sistema nervoso” em 24 horas e “processos neurofisiológicos”, “percepção sensorial a estímulo químico” e “crescimento sináptico na junção neuromuscular” em 48 horas).

A coerência entre estes resultados sugere a existência de uma resposta compensatória em 24 horas, e de uma resposta duradoura em ambos os períodos, indicativa do direcionamento dos efeitos da quinazolina na função celular. Na fase inicial (24 horas), o miocárdio proveniente de animais tratados aparentemente apresenta respostas secundárias aos efeitos do DMA sobre metabolismos específicos na fase aguda do tratamento, em que a quinazolina ainda estaria presente no organismo. Neste momento também parece haver início de uma resposta direcionada às células nervosas, que se estabelece efetivamente em 48 horas. Conforme apresentaremos na seção seguinte, há indícios de que a axonogênese seja um processo afetado pelo tratamento com o DMA.

Interessante notar ainda que em 48 horas obtivemos o único caso de menor representação de uma classe em relação ao estatisticamente esperado: “metabolismo de macromoléculas”. Este resultado indica uma menor contribuição desta resposta em miocárdio depois de decorridas 48 horas do tratamento.

Neste momento chamamos a atenção para o fato de que, se não for analisada a composição de cada uma destas classes em função da proporção indução/repressão gênica, pode-se incorrer no erro de julgar que a menor representação de uma classe representa uma desativação desta resposta pela célula, ou vice-versa (uma maior representação de uma dada classe significando a ativação da função pelas células). Caso uma determinada classe

compreenda a maior parte de seus genes reprimidos, uma maior representação dela em um transcrito representaria, virtualmente, a desativação desta resposta pela célula.

Assim, analisamos a proporção entre genes induzidos e reprimidos em cada uma destas classes funcionais, em ambos os transcritomas. Chamou-nos a atenção que, em 24 horas, os genes induzidos são prevalentes em todas as classes funcionais. Já em 48 horas, ocorre um equilíbrio entre indução e repressão gênica em todas as classes, exceto “metabolismo de proteínas” e “transdução de sinais”, que apresentam a maioria dos genes reprimidos. Nestes dois casos, poderíamos supor uma desativação destas respostas em células cardíacas após 48 horas decorridas do tratamento.

No caso da classe que inclui genes envolvidos em transdução de sinais, esta desativação seria interessante na medida em que esta função sugere a percepção de um estímulo que deve ser transferido para os efetores intracelulares e, dado que tal estímulo em nosso estudo seria decorrente do tratamento pela quinazolina DMA, o curso temporal acusaria que em 48 horas após o tratamento, este estímulo estaria sendo desativado. A análise fenotípica da cardioproteção tardia, avaliada no presente trabalho através da preservação das funções ventriculares durante ensaio de isquemia/reperfusão, parece confirmar esta possibilidade, dado que em 72 horas após o tratamento (momento em que as proteínas codificadas pelos genes diferenciais em 48 horas poderiam estar atuantes) a proteção já se mostra nitidamente reduzida, possivelmente devido à ausência dos estímulos sobre os efetores intracelulares.

Em seguida, iniciamos a análise dos transcritomas em função das identidades gênicas. Entretanto, quando buscamos identificar os genes diferencialmente expressos comuns a ambos os períodos, notamos a ocorrência de apenas 8 genes coincidentes. Este resultado nos pareceu curioso na medida em que estudamos a expressão gênica em dois períodos relativos a uma resposta fenotípica sustentada, a cardioproteção. Portanto, ainda que os transcritomas constituam respostas distintas - ativação (24 horas) e desativação (48 horas), conforme discutido acima - esperávamos uma mesma coleção de genes presentes em ambos os períodos.

Dos oito genes, três apresentam-se induzidos tanto em 24 quanto em 48 horas. Os outros cinco genes apresentam expressão inversa nos dois transcritomas. Os três genes induzidos em ambos os períodos avaliados codificam a isoforma zeta da fosfolipase C

(*phospholipase C, zeta 1*), uma pentraxina neuronal (*neuronal pentraxin 2*) e uma glucuronosiltransferase (*UDP-glucuronosyltransferase 8*). Os genes que apresentaram expressão inversa nos dois períodos dividem-se entre (i) aqueles que foram reprimidos em 24 horas e induzidos em 48 horas e (ii) aqueles que foram induzidos em 24 horas e reprimidos em 48 horas. Com o perfil (i), obtivemos os genes que codificam uma proteína envolvida na degradação e reciclagem de proteínas (*Testin 2*), uma proteína estrutural (*keratin complex 2, basic gene 6b*), uma proteína envolvida na expressão do DNA (*DNA binding protein with his-thr domain*) e a enzima testosterona-hidroxilase (*testosterone 16 α -hydroxylase type a gene*). O único exemplo de gene que segue a regulação (ii) foi o fator de tradução protéica EF-1A (*Eukaryotic translation initiation factor 1A*).

Estudos recentes demonstram que a subunidade zeta da PLC é cerca de 100 vezes mais sensível ao cálcio que as demais subunidades, o que significa que atua mesmo em concentrações nanomolares deste íon, constituindo-se em uma das mais eficientes moléculas capaz de gerar a liberação de cálcio cálcio-dependente [Nomikos *et al*, 2005]. As pentraxinas neuronais possivelmente atuam recapturando produtos sinápticos durante o remodelamento sináptico através de uma atividade cálcio-dependente [Kirkpatrick *et al*, 2000].

Ambos os resultados sugerem que a regulação das concentrações de cálcio citosólico deve estar associada às respostas sustentadas desencadeadas pela administração da quinazolina. Conforme veremos adiante, obtivemos aumento da expressão de canais iônicos cálcio-dependentes e repressão de uma ATPase de cálcio, responsável pela remoção do cálcio citoplasmático, fortalecendo esta possibilidade.

O terceiro gene cuja expressão permanece aumentada em 24 e 48 horas codifica uma UDP-glucuronosiltransferase, que pertence a uma família de enzimas que catalisam a conjugação de ampla gama de substratos com o ácido UDP-glucurônico, constituindo um importante mecanismo de detoxificação [de Wildt *et al*, 1999]. Outro gene expresso em ambos os transcritomas está identificado como uma testosterona-hidroxilase (*testosterone 16 α -hydroxylase type a gene*), que também recebe a identificação de *cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9* (<http://ca.expasy.org/uniprot/Q64463>). Este gene

apresenta forte repressão em 24hs seguido pela indução em 48hs. As citocromo P450 formam uma grande família de enzimas envolvidas na metabolização de compostos xenobióticos. Conforme discutiremos na próxima seção, o metabolismo de citocromos P450 está bem representado em ambos os períodos avaliados, especialmente em 24 horas.

O único gene comum a ambos os transcritomas que apresenta indução em 24 horas e repressão em 48 horas codifica o fator de tradução EF-1A (*Eukaryotic translation initiation factor 1A*), essencial para a ligação do complexo de tradução 43S na extremidade 5' do RNA mensageiro. A forte ativação deste gene em 24 horas (13 vezes mais expresso após o tratamento pela quinazolina) sugere que, neste momento, as células estão fortemente comprometidas com a síntese de proteínas a partir de moléculas mensageiras. Sua repressão em 48 horas pode indicar uma regulação pelo próprio aumento da população de proteínas EF-1A. Interessante, em 48 horas obtivemos aumento da expressão do gene que codifica outro fator relacionado à tradução (*hypothetical Initiation factor IF2/eIF5b, domain 3 structure containing protein*). Este gene apresenta similaridade com o fator de tradução EF5b, o qual faz parte do mesmo complexo de tradução de EF-1A [Marintchev *et al*, 2003], indicando que, apesar da redução na expressão de um importante componente da maquinaria de tradução, a síntese protéica permanece ativada em 48 horas.

Assim, nossos resultados demonstram que o transcritoma desencadeado em 24 horas não é o mesmo transcritoma desencadeado em 48 horas, apesar de observarmos uma resposta fenotípica sustentada (proteção miocárdica). Na tentativa de estudar a transição entre os dois momentos, realizamos uma análise de agrupamento, em que os genes foram agrupados de acordo com similaridades no perfil de expressão apresentado em 24 e 48 horas. Nesta análise utilizamos como critério de inclusão que os genes apresentassem uma tendência de aumento ou redução de sua expressão (i.e., variação \geq [1.5]) nos dois transcritomas.

Buscamos identificar, entre os perfis de expressão obtidos, os grupos que representassem quatro tipos de regulação da expressão gênica: inicial (diferencial apenas em 24 horas), tardia (diferencial apenas em 48 horas), sustentada (diferencial em 24 e em 48 horas) e transitória (expressão inversa entre ambos os períodos). Cada um destes quatro grupos foi subdividido entre os genes que sofreram aumento de sua expressão e aqueles que foram reprimidos, gerando então 8 grupos representativos.

Observamos que a maior parte (aprox. 40%) dos genes apresenta regulação transitória, com semelhante representação entre os genes que são induzidos em 24 horas e depois reprimidos em 48 horas, e aqueles que sofrem regulação inversa. Uma hipótese para justificar esta situação é que, apesar de ser intuitiva a idéia de que as mesmas proteínas sejam continuamente sintetizadas para manter uma resposta prolongada e isto seja reflexo da manutenção de transcritomas similares ao longo do tempo, possivelmente a transcrição gênica obedeça a uma regulação momento-a-momento, de forma que o proteoma gerado pela expressão de um determinado conjunto de genes em um dado momento determine a expressão de um segundo conjunto de genes no momento seguinte e assim por diante. Um padrão bifásico na regulação da expressão gênica foi observado em um estudo recente em que os autores investigaram oito períodos distintos ao longo de 24 horas de reperfusão subsequente à agressão isquêmica em cérebro de ratos [Rickhag *et al*, 2006].

Finalmente, investigamos os perfis funcionais dos 8 grupos de genes, e observamos que a classe funcional “morte celular” está ausente nos grupos que se referem à genes induzidos, seja inicialmente, tardiamente ou de forma sustentada. Já as classes “resposta imune” e “resposta de estresse” estão representadas principalmente nos grupos referentes à indução inicial e de repressão tardia. Este resultado parece justificar aquele obtido na análise da distribuição de genes na categoria genérica “outros processos metabólicos”, discutido acima, em que apontamos a presença de várias classes de resposta de estresse em 24 horas, mas ausência em 48 horas. Este resultado poderia refletir o fato de que na fase tardia este tipo de resposta estaria sendo reprimido.

Finalmente, a classe “transdução de sinais” é prevalente nos grupos de genes reprimidos tardiamente e aqueles que são regulados transitoriamente no sentido de aumento em 24 horas e repressão em 48 horas. Novamente retornando a resultados já expostos, esta observação é coerente com aquela feita na análise da proporção entre indução/repressão gênica em cada uma das classes funcionais principais, em que esta classe funcional apresentava a maior parte de seus genes reprimidos em 48 horas, mas induzidos em 24 horas.

Assim, a ação tardia da quinazolina possivelmente envolve uma regulação dinâmica da expressão gênica e por este motivo os genes expressos em 24 horas não são os mesmos genes expressos em 48 horas. Este resultado pode ser importante na compreensão

das respostas complexas e que envolvem múltiplas vias de sinalização, como é o caso da cardioproteção induzida tanto farmacologicamente quanto através do condicionamento isquêmico.

A última análise descritiva que realizamos dentre os genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento pelo DMA foi a tentativa de classificação funcional das ESTs, uma vez que elas compõem a maioria dos genes regulados pelo DMA mas das quais não se tem ainda informações empíricas. Assim, realizamos uma classificação das ESTs de acordo com a única informação disponível acerca de sua possível função: o tecido ou órgão em que foram originalmente identificadas através de sequenciamento de bibliotecas de cDNA. Para isto recorremos a sua nomenclatura e buscamos a ocorrência de palavras-chave que nos permitisse agrupá-las de acordo com os tecidos que compõem os principais sistemas fisiológicos de mamíferos.

Os resultados foram analisados conforme previamente apresentado para os genes conhecidos. Ou seja, buscamos detectar quais as classes mais ou menos representadas dentre as ESTs diferencialmente expressas após o tratamento pelo DMA, em comparação com a distribuição esperada das ESTs nas lâminas *Codelink*. Nos chamou a atenção a maior representação de ESTs provenientes de tecidos do sistema imune em 24 horas e de tecidos do sistema nervoso tanto em 24 como em 48hs. Estes resultados novamente nos remetem àqueles obtidos na análise da distribuição de genes na categoria genérica “Outros processos metabólicos”, em que chamamos a atenção para um cenário semelhante: classes referentes a respostas a estresse em 24 horas e referentes a processos neurofisiológicos tanto em 24 como em 48 horas.

Outras classes que se apresentaram super-representadas no transcrito desengateado 24 horas após o tratamento pelo DMA foram “hematopoiese” e “sistema reprodutor”. Ambos os resultados são interessantes em vista dos resultados que discutiremos na próxima seção, referentes às análises das vias metabólicas alteradas pelo tratamento com a quinazolina DMA.

As classes de ESTs também foram avaliadas quanto à sua composição entre indução e repressão gênica. Conforme observado previamente nas classes funcionais dos genes conhecidos, as ESTs também apresentam-se preferencialmente induzidas em

24 horas em praticamente todas as categorias, enquanto que em 48 horas a proporção aproxima-se do equilíbrio entre indução e repressão gênica em quase todas as classes. A exceção foi a classe de ESTs provenientes de tecidos do sistema reprodutor, que inclui mais ESTs induzidas do que reprimidas nesta fase tardia.

Em seguida, realizamos a análise de agrupamento das ESTs para investigar as proporções entre os 4 tipos de regulação definidas anteriormente para os genes conhecidos. No caso das ESTs, seguindo a mesma tendência observada para os genes conhecidos mas de forma muito mais pronunciada, a maioria (~80%) apresenta regulação transitória. Porém, diferentemente do que havia sido observado para os genes conhecidos, com semelhante distribuição entre os dois tipos de regulação transitória, no caso das ESTs, a maior parte obedece o tipo indução em 24 horas e repressão em 48 horas (66%).

Finalmente, buscamos identificar a distribuição das classes fisiológicas nestes 8 grupos de regulação das ESTs. Esta análise evidenciou que as ESTs provenientes de tecidos do sistema nervoso apresentam maior representação no grupo de regulação do tipo repressão tardia (48 horas). Este resultado parece sugerir que os processos neurofisiológicos se constituem em uma resposta que obedece um ajuste temporal no sentido de ativação-desativação, tal qual para os genes envolvidos em transdução de sinais, conforme discutido anteriormente .

A análise conduzida na tentativa de avaliar funcionalmente as ESTs deve ser explorada com cautela, uma vez que os genes expressos em determinado tecido não refletem necessariamente a função do órgão, tampouco sua expressão está restrita a estes órgãos. Entretanto, uma vez que estes genes não possuem função conhecida até o presente momento, então podem virtualmente representar mecanismos poucos conhecidos da biologia das células, os quais podem guardar alguma coincidência entre órgãos e tecidos distintos. O fato dos resultados obtidos em nossa análise das ESTs encontrar semelhanças com os resultados funcionais obtidos para os genes conhecidos sugere que esta associação pode ser válida.

As análises transcricionais, ainda que neste momento estejam restritas a um painel essencialmente descritivo, sugerem um paralelo com o fenótipo observado no modelo de coração isolado (resultado apresentado na Figura 1): em termos de preservação

da função contrátil, em 24 horas a proteção à injúria isquêmica se mostra importante, mas é no período de 48 horas que a proteção atinge patamares bastante significativos. Em 72 horas a proteção já demonstra reduções sensíveis, ao menos neste parâmetro. Considerando que os transcritomas indicam quais as proteínas presentes nos momentos posteriores, então a relação possível de ser extraída de nossa investigação ampla poderia ser: transcritoma de 24 horas → fenótipo em 48 horas, e transcritoma de 48 horas → fenótipo em 72 horas. Assim, parece ser bastante relevante as observações de que a alteração gênica em 24 horas indique uma ativação transcricional e a mobilização de várias funções celulares importantes, enquanto em 48 horas haveria uma redução de ambas as respostas, sugerindo o retorno a um estado original.

Em seguida, buscamos avaliar os transcritomas em função das vias metabólicas representadas pelos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento pelo DMA, e como estas alterações poderiam justificar a cardioproteção observada.

5.2- Análise dos transcritomas em função das vias metabólicas alteradas em resposta ao tratamento pelo DMA

5.2.1- Metabolismo de glicose

Obtivemos alguns resultados sugerindo modificações no metabolismo energético cardíaco após o tratamento pelas quinazolininas e estes resultados podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de cardioproteção ao insulto isquêmico desencadeado pelo DMA.

No coração intacto, 60-90% do acetil-CoA é proveniente da beta-oxidação de ácidos graxos e 10-40% provém da oxidação do piruvato produzido pela glicólise e oxidação do lactato [Stanley *et al*, 2005; Lopaschuk *et al*, 1994]. Contudo, durante condições de hipóxia, altos níveis de ácidos graxos podem resultar em desperdício de oxigênio e inibição da oxidação de piruvato pela mitocôndria [Stanley, 2004]. Recentemente, diversos estudos têm demonstrado que a inibição parcial da oxidação de ácidos graxos leva a um aumento do desempenho cardíaco durante condições isquêmicas

[Chandler *et al*, 2003]. Terapias metabólicas no sentido da diminuição do consumo lipídico pelo miocárdio paralelo ao aumento do metabolismo de glicose têm sido propostas para o tratamento de doenças isquêmicas [Stanley, 2004].

Neste contexto, observamos o aumento na expressão do gene *Prkab1* (*protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit*). A proteína codificada por este gene é uma subunidade regulatória da atividade da AMPK (*AMP-activated protein kinase*), a qual constitui uma enzima-chave na percepção do status energético das células. Estudos indicam que a AMPK desempenha um papel cardioprotetor através da ativação da glicólise durante a isquemia e aumentando a eficiência da beta-oxidação de ácidos graxos durante o período de reperfusão [Russel *et al*, 2004].

Em um trabalho recente, Jaswals e colegas demonstraram que alterações na atividade de AMPK contribuem para o aumento na contribuição das vias glicolíticas induzidas pela adenosina em corações submetidos ao estresse causado pela isquemia transiente [Jaswals *et al*, 2006]. Uma vez que o tratamento pelo DMA promove o aumento na biodisponibilidade de adenosina, é interessante que tenhamos observado, 24 horas após a administração do composto, a indução transcricional de um regulador positivo da atividade da AMPK, o que reforça tanto nossos resultados como a correlação observada pelos autores do referido trabalho.

Também no período de 24 horas após o tratamento pelas quinazolininas, observamos o aumento na expressão dos genes que codificam a hexokinase 1 (*hk1*) e o transportador de glicose GLUT4 (*slc2a4*). Ambos os resultados dão suporte à possibilidade de que o tratamento pelo DMA possa afetar o metabolismo energético no sentido do maior consumo de glicose, uma vez que ambos estão diretamente envolvidos na internalização e oxidação da glicose pelas células.

A expressão de *hk1* pode estar também associada com um aumento na eficiência da via glicolítica, uma vez que esta isoforma pode se translocar para a membrana mitocondrial e acoplar os passos citosólicos às etapas oxidativas mitocondriais, e este mecanismo poderia atuar na preservação da integridade da mitocôndria durante os eventos isquêmicos [Sothworth *et al*, 2006]. Interessante notar também que tanto *hk1* como

slc2a4 são alvos transcricionais da atividade da AMPK [Hardie, 2007], o que sugere que esta enzima sinalizatória não é apenas afetada, mas também responsável por algumas das alterações na expressão gênica observadas nos corações de animais tratados pelo DMA.

Enquanto no transcrito desencadeado 24 horas após o tratamento, observamos a expressão diferencial de genes codificadores de importantes proteínas favorecendo o metabolismo de glicose, no transcrito desencadeado 48 horas após a administração do composto obtivemos expressão diferencial de um gene que codifica um fator de transcrição importante na regulação da expressão de enzimas-chave da via glicolítica, *onecut1* (também chamado *hepatocyte nuclear factor 6*, HNF6). No fígado adulto, membros da família HNF estimulam a transcrição dos genes que codificam as enzimas *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, *glucose-6-phosphatase* e *glucokinase* [Rider *et al*, 2004]. Entretanto, Pierreux e colegas demonstraram que o fator HNF6 pode estar regulando negativamente a expressão de enzimas glicolíticas, notadamente *6-phosphofructo-2-kinase* e *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, através de sua ação inibitória sobre os receptores de glicocorticóides [Pierreux *et al*, 1999]. Assim, a indução deste gene em miocárdio tratado pela quinazolina corrobora a hipótese dos efeitos do DMA sobre as vias de consumo de glicose, porém o tipo de regulação (positiva ou negativa) neste segundo momento estudado (48 horas após o tratamento) deve ser estudado mais cuidadosamente.

5.2.2- Metabolismo de lipídeos

Obtivemos alguns resultados sugerindo uma diminuição no consumo de lipídeos por miocárdios de animais tratados pelo DMA. A taxa de consumo de lipídeos pelo miocárdio é determinada, primariamente, pela concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo [Stanley *et al*, 2005]. Eles são transportados em sua forma não-esterificada conjugados com a albumina, ou covalentemente ligados aos triglicerídeos contidos em quilomícrons ou lipoproteínas [Lopaschuk *et al*, 1994]. Nossos resultados incluem a repressão da expressão do gene que codifica albumina 1 (*alb1*) 24 horas após o tratamento, e do gene que codifica o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (*ldlr*) 48 horas após a administração do DMA.

Uma vez no citoplasma, os ácidos graxos devem ser internalizados nas mitocôndrias ou, em menor escala, nos peroxissomos para serem completamente oxidados e gerarem acetil-CoA [Kunau *et al*, 1995]. Como a membrana mitocondrial não é permeável a ácidos graxos, o esqueleto dos ácidos graxos é transferido do citoplasma para a matriz mitocondrial através de um sistema de transporte dependente de carnitina, no qual a enzima carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1) desempenha papel chave, controlando não apenas a translocação mas também a taxa de oxidação de ácidos graxos pela mitocôndria [Stanley *et al*, 2005]. Neste contexto, observamos a indução da expressão do gene *cpt1* que codifica CPT1 no transcrito desencadeado 24 horas após o tratamento pelo DMA.

Interessante, o gene *cpt1* é um alvo transcricional importante da via do PPAR- α (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) [Reddy & Hashimoto, 2001]. As isoformas alfa e gama do PPAR são importantes na regulação da homeostase de lipídeos nas células [Hihi *et al*, 2002], e discutiremos adiante resultados indicando sua expressão em miocárdio de animais tratados pelas quinazolininas.

Em 24 horas após o tratamento pelo DMA observamos a indução do gene que codifica uma redutase de ácidos graxos (*male sterility domain containing 1*), gene que recebe também o nome de FAR2 (*fatty acyl CoA reductase 2*) (acesso UniprotKB/trEMBL: Q7TNT2). Esta enzima atua na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (C16 e C18). Paralelamente, observamos repressão do gene que codifica uma aciltransferase (*bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase*) associada à regulação dos níveis intracelulares de ácidos graxos longos e muito longos (C16-C26) [O'Byrne *et al*, 1997].

Já em 48 horas observamos a repressão do gene que codifica outra enzima associada à síntese de ácidos graxos de cadeias muito longas (*elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3*). Uma vez que o processamento de ácidos graxos é fonte de estresse em células submetidas à isquemia, a redução deste metabolismo parece contribuir para a redução da lesão isquêmica em miocárdio [Hendrickson *et al*, 1997].

Assim, o conjunto destes resultados pode sugerir redução no aporte de lipídeos paralelamente a uma maior eficiência no metabolismo de ácidos graxos intracelulares em células de miocárdio após o tratamento pelas quinazolininas. Este cenário poderia constituir

um dos mecanismos de preservação da homeostase energética de miocárdios tratados pelo DMA e submetidos ao estresse da isquemia/reperfusão.

5.2.3- Via do PPAR- γ e adipocitocinas

A análise das vias metabólicas apontou a ocorrência de genes envolvidos na sinalização via PPAR, especialmente àquela desencadeada pela isoforma gama (PPAR- γ). Esta sinalização está relacionada à regulação da diferenciação de adipócitos e armazenamento de lipídeos [Hihi *et al*, 2002].

Em 24 horas observamos o aumento da expressão do gene que codifica uma proteína que interage com PPAR- γ , PRIP (*PPAR-gamma interacting protein*). Estudos indicam que PRIP é uma molécula ativada por PPAR- γ e que desempenha papel fundamental na efetivação do programa adipogênico [Qi *et al*, 2003]. Além disso, obtivemos em 24 horas a expressão aumentada do gene que codifica um membro da família C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*). Esta é uma família de fatores de transcrição diretamente associada ao estabelecimento do programa adipogênico desencadeado por PPAR- γ [Hihi *et al*, 2002].

Assim, a adipogênese pode ser uma resposta importante induzida pelo tratamento pela quinazolina DMA. Dados de outro trabalho utilizando o composto DMA confirmam estas observações e indicam também a participação da via desencadeada pela isoforma alfa (PPAR- α) (dados não mostrados).

A relação desta observação com a cardioproteção tardia observada após o tratamento com DMA pode residir no fato de que o tecido adiposo não serve apenas ao armazenamento de energia, mas também à síntese e secreção de diversas moléculas bioativas, as adipocitocinas, entre as quais citam-se as leptinas, adiponectinas, resistina e visfatina [Tilg & Moschem, 2006]. O tecido adiposo também pode secretar citocinas clássicas, como TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-1, possivelmente por meio de células inflamatórias infiltradas entre os adipócitos [Guzik *et al*, 2006].

Entre nossos resultados, observamos expressão diferencial dos genes que codificam visfatina, resistina, TNF- α e seu receptor TNFR. Exceto pela visfatina (cujo gene foi originalmente identificado como *pebfl* ou *pre-B-cell colony-enhancing factor 1*), estes genes foram reprimidos em resposta ao tratamento pela quinazolina.

Interessante, a visfatina é uma adipocitocina que se liga e ativa o receptor de insulina e aparentemente sua expressão e secreção podem ser controladas por hormônios sexuais [MacLaren *et al*, 2007]. Este resultado é interessante não apenas porque é coerente com o cenário de ajuste do metabolismo energético cardíaco em direção ao maior consumo de glicose após o tratamento pelo DMA, mas também porque estudos demonstram que a visfatina é transcricionalmente regulada pelo HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 alpha*) em condições de hipóxia [Segawa *et al*, 2006]. Uma vez que o fator HIF-1 α é sugerido como um dos elementos que podem intermediar a cardioproteção desencadeada pelo condicionamento isquêmico [Xu *et al*, 2004], o resultado de que a visfatina aumenta sua expressão em resposta ao tratamento pela quinazolina pode sugerir um mecanismo convergente entre a cardioproteção induzida farmacologicamente e naturalmente.

Além disto, Van der Veer e colegas observaram que a visfatina desempenha um papel essencial na maturação de células musculares lisas vasculares para formar vasos sanguíneos funcionais [van der Veer *et al*, 2005]. Esta observação corrobora nossos resultados sugerindo um efeito pró-angiogênico da quinazolina DMA, conforme discutiremos adiante.

Também possivelmente relacionada à cardioproteção está a observação da repressão do gene que codifica a resistina. A resistina é um peptídeo secretado pelos adipócitos e que, por atuar como antagonista da ação da insulina vem sendo sugerida como um elemento que possivelmente correlacionaria a obesidade e a resistência à insulina [Steppan & Lazar, 2004]. Estudos recentes também têm observado uma associação dos níveis plasmáticos de resistina com quadros de angina instável [Hu *et al*, 2007], progressão aterosclerótica [Burnett *et al*, 2005] e falência cardíaca [Takeishi *et al*, 2007]. Por outro lado, os níveis de visfatina circulante parecem indicar um perfil lipídico benéfico, segundo estudo comparando grupos de pessoas saudáveis e portadores de predisposição à resistência a insulina e hiperlipidemia [Wang *et al*, 2007].

Assim, nossa observação de que o tratamento pelo DMA reduz os níveis de mRNA de resistina enquanto aumenta os de visfatina poderia justificar alguns de nossos resultados demonstrando as propriedades anti-aterogênicas e anti-diabetogênicas desta quinazolina (dados não mostrados).

5.2.4- Metabolismo de purinas e metionina

Resultados do nosso laboratório demonstram que o composto quinazolinico exerce seus efeitos cardioprotetores através do aumento da biodisponibilidade de adenosina e este efeito parece se dever à sua ação inibitória sobre a enzima adenosina quinase (ADK) [Marin, 2005]. Como esta enzima é responsável por uma das etapas essenciais à via de reciclagem dos nucleotídeos purínicos (a fosforilação da adenosina gerando AMP), então sua inibição resulta no aumento das concentrações intracelulares e intersticiais de adenosina.

Em vista dos efeitos benéficos da adenosina frente às agressões isquêmicas e outras injúrias, atualmente muitos estudos têm investigado a possibilidade de uso dos inibidores de adenosina quinase para aumentar a biodisponibilidade de adenosina endógena [Kowaluk & Jarvis, 2000; Gomtsyan & Lee, 2004; Park *et al*, 2006].

Entretanto, por sua importância na via de recuperação de purinas, a inibição de ADK pode interferir neste metabolismo central às células. Neste contexto, observamos que alguns genes envolvidos no metabolismo de purinas apresentaram modificação de sua expressão em 24 horas após a administração do composto quinazolinico. Observamos aumento da expressão de dois genes que codificam enzimas envolvidas na síntese *de novo* de purinas: um deles codifica uma enzima conhecida como Paics (*phosphoribosylaminoimidazole carboxylase*, *phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole*, *succinocarboxamide synthetase*) e o outro codifica uma inosina-monofosfato (IMP) desidrogenase (*inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 1*).

Paics é uma enzima multifuncional que atua em múltiplas etapas da síntese *de novo* de IMP, precursor comum aos nucleosídeos purínicos. Por sua vez, a enzima IMP desidrogenase (IMPDH) catalisa o passo limitante da síntese de nucleotídeos de guanina a partir de IMP, e sua atividade tem sido diretamente associada às taxas de crescimento celular.

Interessante, a inibição de IMPDH foi apontada em um estudo recente como um potente alvo para a inibição da angiogênese, tendo sido observado que seu silenciamento foi suficiente para interromper a progressão do ciclo celular nas células endoteliais [Chong *et al*, 2006]. O aumento da expressão do gene que codifica esta enzima entre nossos resultados pode auxiliar na compreensão da forte resposta angiogênica desencadeada na fase tardia induzida pelo tratamento com o composto quinazolínico, conforme veremos adiante.

A via de recuperação de purinas é acoplada à via de recuperação de metionina e, assim sendo, possivelmente a interrupção de uma delas interfere na síntese de intermediários da outra. Obtivemos em 24 horas a repressão do gene que codifica a enzima metionina adenosiltransferase (*methionine adenosyltransferase I alpha*), que cataliza a formação de S-adenosilmetionina (AdoMet) a partir de ATP e metionina. Pelo fato de AdoMet ser a principal doadora de radicais metil para as metiltransferases [Kloor & Osswald, 2004], então a redução de sua síntese deve resultar na inibição das reações de metilação intracelulares, entre as quais sobressai-se a metilação do DNA, um mecanismo amplamente utilizado pelas células para silenciar a transcrição gênica [Serman *et al*, 2006].

Este efeito do DMA sobre os metabolismos de adenosina e metionina poderia sugerir um mecanismo pelo qual a ação do composto interfere de modo tão amplo na transcrição gênica, conforme observado pelo número de genes cuja expressão foi afetada na fase tardia após o tratamento. Neste contexto obtivemos, no transcrito de 48 horas, a repressão do gene que codifica uma DNA metiltransferase (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase* ou DNMT1). DNMT1 desempenha um papel importante na manutenção dos padrões de metilação do DNA [Mortusewicz *et al*, 2005]. Um estudo silenciou este gene e observou a supressão do crescimento celular, simultaneamente a alterações morfológicas: as células tratadas com o siRNA-DNMT1 se tornaram fibroblastiformes, apresentaram processos similares a neuritos e aumentaram seu potencial adesivo [Saikawa *et al*, 2004].

Esta observação se torna interessante na medida em que obtivemos muitos resultados associados justamente ao crescimento de fibroblastos, axonogênese e adesão celular, tanto em 24 horas quanto em 48 horas após o tratamento pelo DMA.

Em 48 horas, as alterações da expressão de genes codificadores de enzimas do metabolismo de purinas não foi tão significativa, entretanto o gene alterado possui função importante. Observamos a repressão do gene que codifica uma cGMP fosfodiesterase (*phosphodiesterase 5A cGMP-specific* ou PDE5). Demonstrou-se que inibidores desta fosfodiesterase conferem proteção miocárdica em camundongos [Das *et al*, 2005], sendo a cardioproteção relacionada à abertura de canais de potássio mitocondriais (mitoK_{ATP}) [Fisher *et al*, 2005].

Assim, os resultados indicando uma ativação da síntese *de novo* de purinas parecem confirmar a ação inibitória da quinazolina DMA sobre a atividade da enzima ADK, presente na via de recuperação de purinas. Além disso, os resultados indicando redução na síntese de um importante doador de radicais metil e de uma DNA metiltransferase, podem ser instrumentais na compreensão dos mecanismos que associam a ação do composto e a ampla regulação transcricional observada.

5.2.5- Metabolismo de nicotinato e nucleotídeos

Observamos aumento na expressão de dois genes (*nudt12* e *Car1l*) que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de nicotinamida, presentes no transcrito desengateado 24 horas após o tratamento pela quinazolina DMA. Estas enzimas catalisam reações no sentido da síntese de nicotinamida D-ribonucleotídeo.

O gene *nudt12* codifica uma hidrolase da família Nudix similar às NADH pirofosfatase peroxisomais. A família Nudix compreende hidrolases de nucleotídeos presentes em virtualmente todos os organismos, cuja função é a eliminação de metabólitos de nucleotídeos oxidados e potencialmente tóxicos para a célula, assim como regular as concentrações de cofatores nucleotídicos e moléculas sinalizatórias necessárias para o crescimento e sobrevivência celular [Bessman *et al*, 1996]. Particularmente, o membro Nudt12 atua na regulação das concentrações peroxissomais dos cofatores de nicotinamida, necessários ao metabolismo oxidativo nesta organela [Abdelraheim *et al*, 2003].

No contexto dos nossos resultados, esta observação pode estar relacionada a um possível aumento no metabolismo peroxissomal induzido pelos PPARs, bem como no incremento no metabolismo de nucleotídeos, especialmente os purínicos, ambos afetados pelo tratamento pelo DMA, conforme discutido anteriormente.

Ainda parte do metabolismo de nucleotídeos, observamos expressão diferencial dos genes que codificam uma ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (*enpp3*, reprimido) e uma ectonucleotídeo trifosfato di-fosfohidrolase (*entpd2*, induzido), ambos no período de 24 horas após o tratamento. Ambos codificam ectoenzimas envolvidas na regulação das concentrações extracelulares de nucleotídeos [Zimmermann, 2000]. *Enpp3* codifica uma metaloenzima transmembrana localizada na superfície apical de células polarizadas, onde desempenha papéis na modulação da sinalização via receptores purinérgicos, na reciclagem de nucleotídeo e na motilidade celular [Goding *et al*, 2003]. Por outro lado, *entpd2* codifica uma NTPDase 2, um membro da família de di-fosfohidrolases que hidrolizam preferencialmente nucleosídeos trifosfato produzindo seus correspondentes difosfatados [Mateo *et al*, 1999].

Um estudo recente demonstrou que a presença de NTPDase 2 nas regiões adjacentes aos receptores purinérgicos P2Y(1) aumenta expressivamente a atividade basal destes receptores, através da diminuição do EC(50) de ATP em cerca de 15 vezes [Alvarado-castillo *et al*, 2005]. Neste contexto, observamos que o gene que codifica para o receptor purinérgico P2Y(4) (*P2ry4*) apresentou tendência à indução sustentada de sua expressão em ambos os transcritomas.

O contexto destes resultados sugere um aumento da sinalização purinérgica em coração de animais tratados pelo composto quinazolínico, o que pode corroborar os possíveis efeitos desta quinazolina sobre o metabolismo de nucleotídeos e, particularmente, de purinas.

Além disso, interessante notar que a sinalização purinérgica pode estar relacionada à ativação da AMPK por um mecanismo aparentemente independente de alterações na razão AMP:ATP em células endoteliais [da Silva *et al*, 2006], e também com a modulação da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas [Loubatières-Mariani

et al, 1997]. Estas duas observações podem relacionar as alterações no metabolismo de purinas com as possíveis modificações do metabolismo energético, conforme indicado pelos resultados previamente apresentados.

5.2.6- Metabolismo dos citocromos P450

As citocromos P450 (CYPs) representam uma ampla classe de heme-enzimas, normalmente associadas às membranas celulares, que utilizam diversos compostos endógenos e exógenos como substrato. Em animais, as CYPs atuam na metabolização de compostos químicos, toxinas, metabolização e síntese de hormônios (incluindo estrógeno e testosterona), síntese de colesterol e metabolismo da vitamina D [Estabrook, 2003].

Entre nossos resultados obtidos no transcrito desengateado 24 horas após o tratamento pela quinazolina, observamos expressão diferencial de três genes que codificam membros da família CYP2 (*cyp2d3* e *cyp2d22*, expressão induzida, e *cyp2b9*, expressão reprimida) e um gene que codifica um membro da família CYP4 (*cyp4a12*, expressão reprimida). Enquanto a família CYP2 é associada com o metabolismo de compostos químicos e hormônios esteróides, a família CYP4 está envolvida no metabolismo de ácidos graxos e em especial, do ácido araquidônico.

Estes resultados são interessantes na medida em que fortalecem a possibilidade de que o tratamento com a quinazolina DMA esteja afetando o metabolismo de hormônios esteróides e do ácido araquidônico, conforme discutiremos nas próximas seções.

No transcrito desengateado 48 horas após o tratamento pelo DMA, observamos expressão diferencial de dois genes que codificam membros da família CYP2 (*cyp2b9*, induzido, e *cyp2c39*, reprimido).

O gene *cyp2b9* apresentou expressão inversa entre os dois transcritomas estudados (diminuída em 24 horas e aumentada em 48 horas) e já foi apresentado na seção 5.1 como um dos genes coincidentes entre os dois transcritomas. Também conhecido como *testosterone 16 α -hydroxylase type a*, *cyp2b9* codifica um dos citocromos P450

sexo-específicos em camundongo, e estudos demonstram que apresenta repressão transcricional após exposição a hormônios sexuais e glicocorticóides [Nemoto & Sakurai, 1995] e em resposta a aumentos na densidade celular [Nemoto *et al*, 1995]. Neste último estudo também observou-se que sua expressão é regulada positivamente em resposta à exposição a nicotinamida ou isonicotinamida tanto *in vitro* como *in vivo* [Nemoto *et al*, 1995].

Este breve contexto em que a expressão de *cyp2b9* está inserida fornece alguns elementos comuns a outras respostas transcricionais promovidas em corações de animais tratados pelo DMA, notadamente o metabolismo de nicotinamida, conforme discutido anteriormente, mas também os metabolismos de hormônios esteróides e do ácido araquidônico, que discutiremos a seguir.

5.2.7- Metabolismo do ácido araquidônico

Observamos, em 24 horas após o tratamento, o aumento da expressão de dois genes que codificam enzimas essenciais ao metabolismo do ácido araquidônico: *Plaa* (*phospholipase A2 activating protein*) e *Ephx2* (*epoxide hydrolase 2, cytoplasmic*). Ainda parte deste metabolismo, o gene *cyp4a12* apresentou diminuição de sua expressão em resposta ao DMA no transcrito de 24 horas.

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado presente em fosfolípidos que compõem a membrana celular, especialmente fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilinositol. O AA é clivado da molécula fosfolipídica através da ação da enzima fosfolipase A2 [Nanda *et al*, 2007]. Neste contexto, o aumento na expressão de um gene que codifica um regulador positivo da ação de PLA2 (*Plaa*) pode indicar um aumento no conteúdo de AA livre em resposta ao tratamento pelo DMA.

Uma vez liberado, o AA assume três principais rotas: reincorporação nos fosfolípidos de membrana, difusão para o meio extracelular ou metabolização. As citocromos P450 epoxigenases participam da metabolização de AA através de sua conversão em ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs). Alternativamente, CYP450 hidroxilases catalisam a conversão de AA em ácidos 20-hidroieicosatetraenóicos (20-HETEs) [Muller *et al*, 2007].

Um estudo recente demonstrou que a atividade de CYP4A12 é um dos maiores responsáveis pela produção de 20-HETEs [Muller *et al*, 2007]. Assim, a observação da repressão transcricional do gene *cyp4a12* após o tratamento pela quinazolina pode sugerir uma redução na síntese de 20-HETEs nos corações dos animais tratados. A relevância desta observação reside no fato de que estudos têm relatado que a inibição da síntese de 20-HETEs durante episódios de isquemia-reperfusão pode estar associada a uma redução significativa no tamanho do infarto do miocárdio [Nithipatikom *et al*, 2004]. Assim, este metabolismo pode estar associado à resistência isquêmica tardia observada em corações de animais tratados por DMA.

Além disso, as CYP-epoxigenases e seus produtos, as EETs, aparentemente aceleram a recuperação pós-isquêmica através de sua ação sobre os canais de potássio ATP-sensíveis [Nithipatikom *et al*, 2006]. As EETs ainda apresentam diversos efeitos biológicos, como o vasorelaxamento produzido pela modulação de canais iônicos [Weintraub *et al*, 1997], respostas mitogênicas via cascatas de tirosinas quinases [Chen *et al*, 2000], regulação do fluxo de cálcio [Rzagalinski *et al*, 1999] e efeitos anti-inflamatórios na vasculatura [Node *et al*, 1999].

Os efeitos das EETs são finalizados através de sua conversão em seus correspondentes ácidos dihidroecosatrienóicos (DHETs), moléculas biologicamente menos ativas que as EETs, pela ação das epóxi-hidrolases. Estudos recentes sugerem que a diminuição da expressão do gene *ephx2*, que codifica uma epóxi-hidrolase citossólica, pode ter efeitos benéficos em doenças isquêmicas através do prolongamento da ação das EETs [Seubert *et al*, 2006].

Uma vez que observamos aumento na expressão do gene *ephx2* em miocárdio após 24 horas decorridas do tratamento por DMA, este resultado pode nos sugerir um acúmulo de EETs nos momentos anteriores à 24 horas. Entretanto, se este resultado pode refletir uma medida de regulação interna dos níveis de EETs a partir de 24 horas ou, simplesmente, indicar que em 24 horas os efeitos da ação da quinazolina podem estar sendo desativados, são questões pertinentes que devem ser examinadas em estudos funcionais posteriores.

5.2.8- Metabolismo de hormônios esteróides

Interessante, observamos uma grande alteração no metabolismo de hormônios esteróides, principalmente andrógenos/estrógenos. Observamos aumento da expressão de cinco genes pertencentes a este metabolismo, incluindo reações de conversão de precursores inativos (ou menos ativos) em hormônios ativos (ou mais potentes). Por exemplo, a conversão de D5-3 β -hidroxiesteróides em D4-3 β -acetoesteróides pela enzima aldo-keto reductase, codificada pelo gene *akr1c4*; conversão da progesterona em 21-a-dihidroxiprogesterona por uma enzima similar codificada pelo gene *akr1c18*; e a conversão de androstenodiona em dihidroxitesterone pela enzima CRAD1 (*cis-retinol androgen dehydrogenase 1*), codificada pelo gene *rdh6*.

Também observamos expressão diferencial de alguns genes originalmente descritos em gônadas e cujos produtos são responsivos à ação de hormônios sexuais: *membrane progesterin receptor alpha 17*; *secretoglobin family 1A member 1 (uteroglobin)*; *seminal vesicle antigen-like 1*; *seminal vesicle secretion 3*; *testis expressed gene 11*; *testis expressed gene 12*.

Neste contexto, a análise das ESTs demonstrou uma grande representação de seqüências provenientes de bibliotecas de cDNA produzidas a partir de tecidos do sistema reprodutor. Este resultado indica que o tratamento pela quinazolina promove a alteração na expressão de genes desconhecidos, mas que são expressos em tecidos classicamente responsivos aos hormônios sexuais, o que pode fortalecer os resultados apresentados acima.

Recentes evidências apontam a expressão de genes codificadores de enzimas esteroidogênicas em tecido cardíaco de humanos, ratos e camundongos, principalmente corticosterona e desoxicorticosterona [Young *et al*, 2001; Kayes-Wandover & White, 2000]. A síntese de hormônios sexuais ativos a partir de precursores esteróides circulantes tem se mostrado um metabolismo proeminente no tecido adiposo [Kamat *et al*, 2002; Guerre-Millo, 2004; Dieudonne *et al*, 1998]. Uma vez que nossos resultados indicam respostas adipogênicas ao tratamento pelo DMA, é possível que o metabolismo de andrógenos/estrógenos seja parte da resposta específica dos adipócitos à quinazolina.

5.2.9- Metabolismo de ácido retinóico

Apesar do gene *rdh6* que codifica a enzima CRAD1 (*cis-retinol androgen dehydrogenase 1*) apresentar uma atividade preferencial sobre precursores esteróides [Song *et al*, 2003], conforme discutido acima, também apresenta uma atividade significativa como retinol desidrogenase. Neste caso, utiliza retinol como substrato, convertendo-o em retinal, precursor para a síntese de ácidos retinóicos (RAs).

Este metabolismo inclui ainda uma etapa oxidativa catalizada por uma enzima álcool desidrogenase, a qual é codificada pelo gene *adh*. Este gene apresentou-se induzido 24 horas após o tratamento pela quinazolina DMA.

Além disso, um gene mencionado anteriormente, *cyp2c39*, foi recentemente descrito como codificando uma hidroxilase de RAs (*retinoic acid 4-hydroxylase*), que participa de uma etapa essencial do catabolismo de retinóides: a conversão de RA em sua forma inativa, ácido 4-hidroxitretinóico [Andreola *et al*, 2004]. Uma vez que *cyp2c39* apresentou-se reprimido após 48 horas decorridas do tratamento pelo DMA, este resultado poderia sugerir um efeito sustentado de RAs em corações de animais tratados pela quinazolina.

Dados demonstrando que o tratamento por ácido retinóico pode ser benéfico em modelos de doenças cardiovasculares [Riccioni *et al*, 2007] e pode influenciar as respostas angiogênicas [Saito *et al*, 2007] sugerem que este metabolismo pode estar envolvido com a cardioproteção tardia observada após o tratamento pelo DMA, além de possivelmente relacionar-se com a angiogênese induzida pela quinazolina, conforme discutiremos adiante.

5.2.10- Síntese do óxido nítrico

Observamos aumento na expressão do gene que codifica a isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no transcrito desencadeado 24 horas após o tratamento, bem como o gene *pts*, que codifica uma enzima (*6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase*) envolvida na síntese de tetrahidrobiopterina, um cofator essencial à atividade das NOS [168].

A isoforma nNOS é constitutivamente expressa em cardiomiócitos e recentes estudos apontam que sua atividade pode relacionar-se com a modulação da frequência cardíaca em mamíferos [Dawson *et al*, 2005]. Além disso, foi observado que a expressão de nNOS foi aumentada em ventrículos durante o infarto agudo do miocárdio em ratos [Takimoto *et al*, 2000] e que a redução da expressão de nNOS contribuiu para o estresse oxidativo no miocárdio [Sarativa *et al*, 2007].

Diversos estudos evidenciam o papel protetor da nNOS em miocárdio isquêmico [Balligand, 2005]. A observação de que o tratamento pelo DMA levou ao aumento da expressão de nNOS sugere que este pode ser um mecanismo importante no aumento da resistência cardíaca à injúria isquêmica induzida pela quinazolina. Alguns resultados obtidos em outro trabalho conduzido em nosso laboratório confirmam esta hipótese, indicando a importância da síntese de NO em corações de animais tratados por DMA (dados não mostrados).

A função e localização subcelular das NO sintases são controlados por interações proteína-proteína. Foi observado que a nNOS se localiza preferencialmente nos caveolae de células endoteliais e de cardiomiócitos, através de interações com proteínas estruturais destes compartimentos, as caveolinas CAV1 e CAV3, respectivamente [Feron *et al*, 1996]. Dentre nossos resultados, observamos a indução do gene *cav1* (*caveolin 1*) no transcrito desencadeado 24 horas após o tratamento. Uma vez que CAV1 é expressa especificamente em caveolae de células endoteliais, nossos resultados sugerem que o sítio de produção de NO nos corações tratados por DMA pode estar localizado nas células endoteliais, preferencialmente.

Retornando a resultados anteriormente discutidos sobre o metabolismo de nucleotídeos, já foi demonstrado que a sinalização purinérgica pode estar relacionada à produção de óxido nítrico pelas células endoteliais [Burnstock, 2002a], fortalecendo a possibilidade de que a síntese de NO seja uma resposta endotelial ao tratamento pelo DMA.

Alguns trabalhos observaram que a associação entre as NO sintases e as caveolinas pode desempenhar um papel inibitório sobre a produção de NO [Feron & Balligand, 2006]. Entretanto, estudos demonstram que outras interações proteína-proteína

nos *caveolae* podem reverter a inibição de NOS pela caveolinas. Gratton e colegas demonstraram que a presença de HSP90 nos *caveolae* facilita a dissociação entre as NOS e CAV1 [Gratton *et al*, 2000]. Uma vez que observamos aumento da expressão do gene *hsp90*, que codifica HSP90 (tendência a indução sustentada em ambos os transcritomas), podemos admitir uma complexa regulação da produção de NO durante a fase tardia da proteção induzida pelo tratamento pela quinazolina, no sentido da manutenção da atividade de nNOS.

Interessante, um estudo recente demonstrou que CAV1 também interage com o receptor *Patched*, da via de sinalização *Sonic Hedgehog*, e que esta interação pode ser responsável pelo endereçamento do complexo de receptores *Patched/Smoothed*, formado no Golgi, às frações lipídicas/caveolares presentes na membrana plasmática [Karpen *et al*, 2001]. Uma vez na membrana, o complexo de receptores se torna acessível ao seu ligante, *Hedgehog*, desencadeando a sinalização.

Conforme discutiremos na próxima seção, a via *Hedgehog* está associada às respostas neoangiogênicas e nossos dados incluem diversos componentes desta via em particular.

5.2.11- Angiogênese

Observamos diversos genes envolvidos na angiogênese em ambos os transcritomas, sugerindo que este pode ser um mecanismo importante na cardioproteção tardia induzida pela quinazolina.

Observamos a expressão diferencial de alguns genes envolvidos na sinalização da via *Hedgehog*. Esta via é bastante conservada e foi originalmente descrita no contexto da embriogênese, no entanto tem sido observado que ela regula diversos processos em tecidos diferenciados, como a vasculogênese e o remodelamento neuronal [Morrow *et al*, 2006]. Obtivemos em 48 horas a repressão de um gene que codifica um antagonista de *Hedgehog* (*Hedgehog-interacting protein*) e indução de um gene que codifica um dos componentes do complexo intracelular ativado por *Hedgehog* (*suppressor of fused homolog*).

Na análise das tendências de expressão, observamos que o gene que codifica o próprio *Hedgehog* (*sonic hedgehog*) foi considerado como induzido na fase inicial (variação de +2.7 em 24 horas e +1.4 em 48 horas). Também observamos que um gene cuja expressão é diretamente afetada por esta via de sinalização, *wingless* (*wingless-related MMTV integration site 7B*), apresentou indução na fase tardia (variação de -1.09 em 24 horas e + 2.4 em 48 horas), o que nos remete ao componente temporal existente entre os transcritomas desencadeados pela ação da quinazolina. O fato desta via estar praticamente completa entre nossos resultados fortalece a importância da angiogênese entre os mecanismos de resposta à ação do composto DMA.

Outros resultados corroboram esta hipótese. Obtivemos em 24 horas indução do gene que codifica um fator de crescimento (*placental growth factor*) que atua em sinergia com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), apresentando forte atividade pró-angiogênica [Li *et al*, 2006]. Também foram induzidos dois genes que codificam para angiopoietinas (*angiopoietin-like 2*, *angiopoietin-like 4*), membros da mesma família de fatores de crescimento VEGF. Interessantemente, a proteína *angiopoietina-like 4* tem sido descrita não apenas como um importante fator de crescimento das células vasculares, mas também um fator de sobrevivência das células do endotélio vascular induzido durante a isquemia [Le Jan *et al*, 2003].

Observamos também em 24 horas a indução dos genes que codificam o receptor *Epha1* (*ephrin receptor A1*) e uma proteína de membrana denominada *Bves* (*blood vessel epicardial substance*). Os receptores Eph e, em especial, *Epha1*, têm sido descritos como mediadores essenciais aos processos de vasculogênese e angiogênese [Adams *et al*, 2000]. Já a proteína *Bves* é acumulada nos pontos de contato célula-célula e desempenha importante papel na vasculogênese coronária [Wada *et al*, 2001].

Entre os componentes estruturais foram induzidos genes relacionados à potenciação dos sinais angiogênicos. Em 24 horas, obtivemos indução de um gene que codifica uma glicoproteína da membrana plasmática (*glypican 1*) associada à sinalização induzida pelos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) [Steinfeld *et al*, 1996], bem como indução de um gene que codifica uma enzima necessária à síntese de proteoglicanas do tipo heparan-sulfato (*heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1*),

que também são associadas a amplificação dos sinais desencadeados pelos fatores de crescimento de fibroblastos [Skaletz-Rorowski *et al*, 1996].

Neste contexto, trabalhos recentes examinaram o potencial angiogênico e cardioprotetor dos fatores de crescimento de fibroblastos [Cuevas *et al*, 2001; Fukuyama *et al*, 2006]. Uma vez que em 48 horas observamos aumento na expressão de dois fatores de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor 23* e *fibroblast growth factor 4*), esta via de sinalização parece ser importante à angiogênese desencadeada pela ação da quinazolina.

Diante dos resultados indicando forte neovascularização, esperamos encontrar ativação dos genes envolvidos na divisão celular, de forma a permitir a formação de novas células. Quando analisamos os genes que codificam proteínas envolvidas no ciclo celular, pudemos observar a indução de componentes envolvidos na replicação do DNA (*origin recognition complex subunit 5-like*; *DNA primase p58 subunit*; *single stranded DNA binding protein 4*; *telomeric repeat binding factor 2*), no controle da progressão do ciclo celular (*cell division cycle 20 homolog*; *2-cell-stage variable group member 3*; *cyclin L2 transcript variant 2*) e na divisão propriamente dita (*spindlin*; *mitotic arrest deficient 1-like 1*; *suppressor of variegation 3-9 homolog 1*).

5.2.12- Hipóxia

Foi observado que a hipóxia induz a expressão dos receptores Eph e seus ligantes através da indução do fator induzido por hipóxia HIF-1 α [Vihanto *et al*, 2005]. Um estudo observou forte indução de EphA2 em tecido renal após episódio de isquemia-reperfusão tanto *in vitro* como *in vivo* [Baldwin *et al*, 2006]. Também observou-se que as angiopoietinas são induzidas nas células endoteliais em condições de hipóxia [Le Jan *et al*, 2003].

Um estudo recente observou que a via *Hedgehog* está envolvida na regeneração de tecido muscular após episódio isquêmico. Neste estudo, os autores observaram que a isquemia induzida em músculo esquelético induz fortemente a expressão de *Hedgehog*,

tanto no nível do mRNA quanto da proteína. Foi observado neste estudo que as células responsivas a *Hedgehog* produzem o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e que a administração de anticorpos anti-*Hedgehog* inibiu a angiogênese e a produção de VEGF [Pola *et al*, 2003].

Assim, a indução destes genes após a administração da quinazolina sugere um paralelo entre os sinais desencadeados pela isquemia e pelo composto quinazolinico, possivelmente associados à cardioproteção induzida por ambos os estímulos.

No transcritoma desencadeado após 48 horas transcorridas da administração da quinazolina obtivemos outros resultados relevantes à cardioproteção induzida isquemicamente e que poderiam justificar a cardioproteção que observamos em nosso estudo.

O primeiro resultado foi o aumento da expressão de um gene que codifica um neuropeptídeo membro da família dos fatores liberadores de corticotropinas (*urocortin II* ou *stresscopin related peptide*). Estes neuropeptídeos têm sido caracterizados quanto a sua atividade cardioprotetora, apresentando potente atividade anti-apoptótica em episódios de hipóxia/reoxigenação de cardiomiócitos [Latchman, 2001; Brar *et al*, 2004]. Importante, um estudo demonstrou que a habilidade cardioprotetora se mantém ainda que este neuropeptídeo seja administrado após a injúria hipóxica, mas antes da reoxigenação [Chanalaris *et al*, 2003]. Assim, a indução deste gene em 48 horas após o tratamento pela quinazolina nos fornece um possível agente da cardioproteção obtida nos corações tratados e submetidos à isquemia prolongada.

Outro resultado foi a indução do gene que codifica uma proteína envolvida na regeneração tecidual (*regenerating islet-derived 1* ou *Reg1*). Um estudo buscou avaliar sua expressão em miocárdios submetidos a condições de estresse [Kiji *et al*, 2005]. Os autores observaram aumento nos níveis de mRNA de Reg1 em miocárdios submetidos a estresse isquêmico e aumento da proteína secretada no soro sanguíneo após indução de infarto do miocárdio. Assim, o aumento na expressão deste gene 48 horas após o tratamento pela quinazolina sugere que seu aumento pode ser um dos mecanismos envolvidos na cardioproteção tardia desencadeada pela quinazolina.

5.2.13- Transporte

Nos chamou a atenção a significativa presença de genes que codificam carreadores de membrana (*solute carrier family*) entre os resultados obtidos em 24 horas após a administração da quinazolina, todos induzidos.

Também verificamos aumento da expressão do gene que codifica um canal de água (*aquaporin 1*), do gene que codifica uma anidrase carbônica (*carbonic anhydrase 7*) e do gene que codifica um trocador da membrana plasmática responsável pelo transporte de bicarbonato e cloreto no coração (*solute carrier family 26 member 6*) [Alvarez *et al*, 2004]. Estes resultados estão possivelmente inter-relacionados, já que recentemente foi demonstrada a interação física entre os trocadores de bicarbonato/cloreto e as anidrases carbônicas, enzimas que catalisam a reação de hidratação do gás carbônico (CO₂) para gerar o ácido carbônico (HCO₄), formando espontaneamente o bicarbonato (HCO₃⁻), composto mais estável. No caso de tecidos em que este mecanismo é bastante ativo, os canais de água atuam aumentando a permeabilidade da membrana à água, necessária em grandes quantidades nestas reações [Loiselle *et al*, 2004; McMurtrie *et al*, 2004; Vince & Reithmeier, 1998].

Sabendo-se do papel tamponante do bicarbonato, a indução deste sistema em miocárdio tratado pela quinazolina talvez indique um dos mecanismos de proteção das células durante a isquemia prolongada, em que ocorre uma acidificação do pH citosólico.

Já em 48 horas, observamos pouca representação dos transportadores de membrana (*solute carrier family*), incluindo três genes induzidos e dois reprimidos. Entretanto, neste transcrito pudemos observar maior representação de genes que codificam canais iônicos e eles apresentam aumento de sua expressão (*non-selective cation channel 1*; *amiloride-sensitive cation channel 1 neuronal* e *chloride channel CACC*). Interessante notar que estes três canais são ativados pelo estresse oxidativo [Jeulin *et al*, 2002; Andrey *et al*, 2005; Jeulin *et al*, 2005]. O canal não-seletivo de cátions (NSC) e o canal de cloreto (CACC) também são ativados por altas concentrações de cálcio intracelular [Jeulin *et al*, 2002; Jeulin *et al*, 1995].

Neste contexto, observamos a repressão do gene que codifica uma Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática (*ATPase Ca²⁺ transporting plasma membrane 2* ou PMCA2), uma das principais bombas responsáveis pelo controle das concentrações citossólicas de cálcio. Um estudo verificou que o estresse oxidativo reprime a atividade destes canais [Zaidi *et al*, 2003].

Estes resultados, quando analisados conjuntamente, sugerem duas situações: alterações no estado redox das células e aumento nas concentrações de cálcio intracelular. No contexto da cardioproteção induzida pelo condicionamento, estas duas situações poderiam justificar a resistência à agressão isquêmica observada após o tratamento pela quinazolina. Estudos clássicos demonstraram que tanto o aumento do cálcio citossólico [Miyawaki *et al*, 1996] quanto a produção de radicais livres [Tritto *et al*, 1997] induzem as células a entrarem em um estado condicionado e, em ambos os casos, a remoção destes estímulos reduz a extensão ou abole totalmente o estado condicionado [Miyawaki & Ashraf, 1997; Baines *et al*, 1997].

5.2.14- Axonogênese

Obtivemos resultados que sugerem a modificação na população axonal após o tratamento pela quinazolina. Observamos a ativação de um fator promotor da axonogênese (*SLIT homolog 1*) e dois de seus receptores putativos (*roundabout 1*; *roundabout 4*), além da ativação no transcrito de 48 horas de um quarto gene deste mesmo grupo (*SLIT and NTRK-like family member 3*). Estes genes controlam o correto posicionamento e ramificação dos axônios durante a formação de novos ramos neuronais [Marillat *et al*, 2002], além de regular a polaridade das células cardíacas durante o desenvolvimento do coração [Qian *et al*, 2005] e controlar a ramificação dos vasos durante a angiogênese [Fujiwara *et al* 2006].

Durante o desenvolvimento axonal, diversas proteínas atuam guiando a direção das ramificações, através de atividades promotoras e inibidoras do crescimento. Entre os promotores do crescimento, observamos em 24 horas a indução de genes que codificam

componentes da família das caderinas (*protocadherin 8*; *EY-cadherin precursor*; *cadherin 6*), além do aumento na expressão do gene que codifica a proteína netrina (*netrin-G1d*), que faz parte de uma família de proteínas de adesão que atua no direcionamento axonal durante a formação de novas sinapses [Nakashiba *et al*, 2000].

Paralelamente a estes genes induzidos, observamos a repressão do gene que codifica a neurotrimina (*neurotrimin*), outra proteína pertencente à família das moléculas de adesão neural. Aparentemente, sua expressão obedece a uma regulação espaço-temporal e estudos sugerem que desempenha importante papel na fasciculação axonal e na formação e estabilização de sinapses excitatórias [Chen *et al*, 2001].

Neste contexto, observamos que outros genes cuja expressão foi reprimida em 24 horas após o tratamento por DMA estão *Chrn3* (*cholinergic receptor nicotinic beta polypeptide 3*) e *Chrna4* (*cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide 4*), que codificam receptores colinérgicos presentes em neurônios do sistema simpático. Em 48 horas, observamos repressão do gene que codifica o receptor adrenérgico *Adrb1* (*adrenergic receptor beta 1*), também associado à sinalização do sistema simpático.

Associado à regulação das sinapses excitatórias, obtivemos aumento na expressão do gene que codifica o receptor de galanina *Galr3* (*galanin receptor 3*) em 24 horas. A galanina é um neuropeptídeo com ação anti-epiléptica, e sua ação parece residir na ativação de canais de K_{ATP} e/ou bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes, promovendo uma modulação da atividade excitatória [Schlifke *et al*, 2006]. A expressão do mRNA dos receptores GALR3 foi detectada em coração, baço e testículo, mas não em cérebro [Wang *et al*, 1997], e seus efeitos incluem a modulação da secreção de insulina e a homeostase de glicose [Branchek *et al* XXXX; Mongillo *et al*, 2007].

O conjunto destes resultados sugere uma resposta especificamente direcionada à modulação da sinalização simpática em miocárdio tratados pelo composto quinazolinico, aparentemente no sentido da sua inibição. Interessante, estudos associam quadros de falência cardíaca com um aumento da sinalização simpática, possivelmente devido ao aumento na liberação e deficiência na recaptção da noradrenalina neuronal [Eisenhofer *et al*, 1996]. Além disto, o tratamento prolongado de cardiomiócitos com noradrenalina,

mimetizando o quadro de ativação crônica do sistema simpático, promoveu resistência à insulina através de um mecanismo associado à fosforilação cAMP/PKA-dependente dos receptores de insulina [Morisco *et al*, 2005].

Assim, a possível diminuição da sinalização simpática poderia ser um mecanismo pelo qual a função cardíaca em animais tratados por DMA apresentaria-se significativamente preservada após injúria isquêmica, além de representar outro indício da regulação do metabolismo de glicose e insulina em miocárdios tratados por DMA.

No contexto da axonogênese também estão inseridos os resultados da classificação funcional dos genes diferencialmente expressos, em que observamos redundância de classes associadas com processos neurofisiológicos em ambos os transcritomas estudados. Também se inserem os resultados de expressão diferencial das ESTs provenientes de bibliotecas de cDNA produzidas a partir de tecidos do sistema nervoso. Apesar de requerer experimentos comprovando a possibilidade de que o tratamento pelo composto quinazolinico esteja desencadeando respostas no sentido do remodelamento neuronal em miocárdios de animais tratados, a consistência dos resultados transcricionais aponta para esta hipótese.

Classicamente, o coração era considerado um órgão innervado apenas por neurônios do sistema parasimpático; atualmente sabe-se que o miocárdio possui um sistema nervoso intrínseco, constituído por uma complexa rede de neurônios aferentes, neurônios do circuito local (interconectantes) e neurônios eferentes do sistema simpático e parasimpático [Armour, 1999]. Este sistema nervoso cardíaco intrínseco é capaz de auto-remodelamento, de acordo com estudos que relatam a re-enervação de corações transplantados [Murphy *et al*, 2000] e efeitos de longa-duração da estimulação medular sobre o miocárdio isquêmico, em pacientes portadores de angina *pectoris* [Armour *et al*, 2002].

Esta observação poderia sugerir mecanismos ainda pouco explorados, envolvidos com o remodelamento neuronal em miocárdio, e que provavelmente remetem ao elemento-memória descrito no contexto do condicionamento isquêmico, que permite a ocorrência da fase tardia da proteção.

5.2.15- Comunicação GABAérgica

Entre os genes que codificam proteínas envolvidas na comunicação celular, observamos a ocorrência de genes associados à transmissão GABAérgica: *Gabra1* (*gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 1*), *cacc* (*calcium-dependent chloride channel*), *Bzrap1* (*benzodiazepine receptor 1*), além de uma proteína que interage com os receptores GABA, *GRIF-1* (*GABA-A receptor interacting factor-1*, também denominado *amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 homolog*).

Em vertebrados, o neurotransmissor GABA (ácido γ -aminobutírico) atua preferencialmente em sinapses inibitórias, através de sua ligação com receptores específicos presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos. A ligação GABA/receptor leva à abertura de canais iônicos na membrana plasmática, permitindo o influxo de ânions cloreto ou efluxo de cátions potássio, culminando em uma hiperpolarização da membrana neuronal.

Além dos canais de cloreto, os receptores de GABA são encontrados em associação com receptores benzodiazepínicos, formando um complexo funcional. Assim, é interessante que tenhamos observado a expressão diferencial de genes que codificam proteínas representativas do complexo funcional GABAérgico (*gabral*, *bzrap1* e *cacc*). Já a proteína GRIF1 foi recentemente descrita como envolvida no tráfego endossomo-lisossomo [Kirk *et al*, 2006]. Por sua interação com os receptores de GABA, esta proteína pode estar envolvida na modulação da atividade GABérgica, seja atuando na reciclagem dos receptores, em sua estabilização na membrana plasmática ou ainda regulando eventuais modificações pós-traducionais destes receptores [Chen & Olsen, 2007].

A importância da observação da expressão diferencial do sistema GABAérgico em resposta ao tratamento pela quinazolina DMA reside no envolvimento desta sinalização na plasticidade e remodelamento neuronal [Waagepetersen *et al*, 1999], o que é coerente com os demais resultados apresentados. Além disso, a expressão e regulação da função dos receptores de GABA têm sido observadas em resposta à exposição a hormônios neuroesteróides [Reddy & Rogawski, 2002; Maguire & Mody, 2007], o que pode sugerir

uma conexão com as alterações observadas no metabolismo de hormônios esteróides após o tratamento por DMA, conforme anteriormente discutido.

Em relação à proteção tecidual, a atividade GABAérgica tem se mostrado um potente agente neuroprotetor em eventos de isquemia cerebral [Costa *et al*, 2004]. Estudos demonstram que, no sistema nervoso central, o condicionamento isquêmico ocasiona um aumento na expressão dos receptores GABA do tipo A e este aumento foi associado à neuroproteção observada [Dave *et al*, 2005]. Já em relação à cardioproteção, estudos recentes demonstram que a atividade dos receptores benzodiazepínicos está associada com a proteção miocárdica, provavelmente através de um mecanismo que envolve a preservação da função mitocondrial pela inibição da formação do poro de transição da permeabilidade [Leducq *et al*, 2003; Obame *et al*, 2007].

Interessante, relacionando estes resultados com aqueles sugerindo alterações no metabolismo energético e, em particular, uma possível sinalização em resposta à insulina, estudos indicam a presença de enzimas envolvidas na síntese de GABA nas células β -pancreáticas, responsáveis pela síntese e secreção de insulina [Adeghate & Ponery, 2002]. A presença de GABA e benzodiazepínicos atuam no sentido do aumento da insulina plasmática e redução dos níveis de glicose circulante [Gomez *et al*, 1999]. A insulina tem sido proposta como um agente neuroprotetor devido ao seu papel na preservação da função dos receptores GABAérgicos, os quais são reprimidos durante episódios de privação de glicose/oxigênio nos tecidos corticais [Mielke & Wang, 2005].

Assim, estes resultados podem indicar um mecanismo através do qual a quinazolina DMA poderia atuar no sentido da preservação funcional das células nervosas presentes no miocárdio, bem como na proteção mitocondrial durante a isquemia prolongada. Estes resultados também confirmam outros resultados anteriormente discutidos, o que fortalece a ação ampla do composto quinazolínico sobre a fisiologia celular.

5.2.16- Apoptose e resposta imune

Obtivemos, em 24 horas, a indução de um gene com atividade anti-apoptótica (*baculoviral IAP repeat-containing* ou *CIAP2*) e repressão de um gene pró-apoptótico (*seven in absentia 1B* ou *SIVA*). Interessante, a ação de ambos está relacionada à sua ligação com o fator TNF- α [Yuan *et al*, 2005; Xue *et al*, 2002].

No transcrito desencadeado 24 horas após o tratamento por DMA, observamos expressão diferencial do gene que codifica uma proteína TNF- α (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 8*) e de outros dois genes que codificam um receptor de TNF- α (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 21*) e um ativador deste receptor (*TRAF family member-associated Nf-kappa B activator*). Os três genes foram reprimidos pelo tratamento pela quinazolina, o que sugere um efeito anti-inflamatório do DMA, dado que TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória com importante papel na regulação da proliferação e diferenciação celular e nas respostas apoptóticas [Baud & Karin, 2001].

Nos chamou a atenção a grande quantidade de genes diferencialmente expressos em 24 horas que estão associados à resposta imune, particularmente aqueles que codificam receptores e complexos típicos das células T (a maioria ativada). Entretanto, em 48 horas apenas três genes estão associados a esta resposta e todos estão reprimidos. Também obtivemos diminuição da expressão de duas interleucinas, envolvidas na proliferação e maturação das células T.

Esta resposta pode estar vinculada ao intenso remodelamento tecidual que nossos resultados sugerem. Obtivemos em ambos os transcritomas a indução de diversos genes que codificam para proteases extracelulares, as quais atuam degradando componentes do tecido conjuntivo para que novos tipos celulares ocupem o espaço. A presença de linhagens imunes nestas regiões pode estar associada ao desenvolvimento de tolerância do organismo a si próprio, evitando o desencadeamento de respostas auto-imunes e inflamatórias [Levings *et al*, 2006].

A análise ampla da transcrição gênica induzida em corações de camundongo 24 e 48 horas após o tratamento pela quinazolina DMA nos permitiu investigar vias metabólicas e de sinalização afetadas em resposta a este composto. Uma vez que observamos nestes mesmos períodos um efeito de proteção miocárdica frente à agressão isquêmica, então nosso objetivo final foi tentar apreender quais os possíveis mecanismos que unem os dois resultados.

5.3- Possíveis mecanismos associados à cardioproteção tardia induzida pelo tratamento com a quinazolina DMA

Na tentativa de formar um modelo geral da cardioproteção tardia desencadeada pelo tratamento pelo DMA, buscamos classificar nossos resultados de acordo com o modelo proposto no contexto do condicionamento isquêmico. Assim, discutiremos os possíveis elementos desencadeadores, mediadores e efetores da proteção miocárdica induzida pela quinazolina DMA.

5.3.1- Elementos desencadeadores

Uma vez que resultados em nosso laboratório indicam que o tratamento pela quinazolina DMA promove um efeito inibitório sobre a atividade da adenosina quinase (ADK), enzima presente na via de reciclagem de purinas e responsável pela fosforilação da adenosina e conseqüente formação de AMP citosólico, então a ação do composto deve se refletir no aumento da adenosina endógena. Resultados em nosso laboratório confirmam este aumento (dados não mostrados).

Assim, na fase aguda (horas) após o tratamento, a indução do fenótipo condicionado provavelmente se deve à ação da adenosina sobre seus receptores A₁ e A₃ [Dougherty *et al*, XXXX]. Entretanto, nossos dados preliminares indicam que a meia-vida do composto DMA no organismo de murinos não ultrapassa 3 horas, portanto os efeitos tardios observados 24 e 48 horas após o tratamento em dose única provavelmente não se

devem à adenosina diretamente mas sim às respostas secundárias desencadeadas por sua sinalização na fase aguda.

De fato, nossos resultados obtidos na fase tardia não incluem a expressão diferencial de receptores de adenosina (ver Tabela 4).

Tabela 4- Expressão de alguns genes envolvidos com a sinalização e metabolismo de adenosina nos microarranjos *Codelink*. Estão apresentados os valores de expressão (*fold change*) e respectivos valores de significância estatística (*p.value*) em 24 e 48 horas.

Identidade	Expressão (24 horas)	p.value	Expressão (48 horas)	p.value
adenosine A1 receptor (Adora1)	-1,54	0,17	-1,22	0,31
adenosine A2a receptor (Adora2a)	-1,05	0,38	1,11	0,10
adenosine A2b receptor (Adora2b)	-1,14	0,23	-1,13	0,31
adenosine A3 receptor (Adora3)	1,35	0,61	1,19	0,36
adenosine deaminase (Ada)	-1,08	0,23	1,31	0,05
adenosine deaminase, RNA-editing, B1 (Adarb1)	1,63	NA	1,53	0,21
adenosine deaminase, RNA-editing, B2 (Adarb2)	-1,99	0,19	1,42	0,08
adenosine kinase (Adk)	1,91	0,29	1,22	0,24

Conforme podemos observar na Tabela 4, apesar de alguns valores de expressão sugerirem tendência de expressão diferencial (variação>[1.5]), estes genes não foram considerados diferencialmente expressos porque não foram aprovados pelos critérios estabelecidos em nossas análises (variação>[2.0]; p.value<0.1).

Interessante notar, entretanto, que o gene que codifica a enzima adenosina quinase (*adk*) apresentou tendência a indução (+1,91) enquanto o gene que codifica o receptor A₁ (*adora1*) apresentou tendência à repressão (-1,54) da expressão 24 horas após o tratamento pela quinazolina.

A tendência a aumento da expressão do mRNA do gene *adk* no período de 24 horas parece confirmar a inibição da proteína ADK pelo DMA nos períodos anteriores. A observação da tendência à repressão do gene *adora1* 24 horas após o tratamento, por outro lado, parece confirmar a terminação da sinalização mediada pelo receptor A₁ na fase tardia, além de uma possível redução nos níveis de adenosina intersticial neste momento, mas esta possibilidade requer avaliações experimentais ainda não realizadas.

Além disso, obtivemos resultados sugerindo alterações tardias no metabolismo de purinas, no sentido da ativação da via de síntese *de novo*, bem como aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo e sinalização via nucleotídeos purínicos (seções 5.2.4 e 5.2.5). A inibição de ADK 24 horas antes da obtenção destes resultados pode indicar uma resposta compensatória das células à interrupção da via de reciclagem de purinas.

Outro provável elemento desencadeador da fase tardia da cardioproteção observada após o tratamento pelo composto DMA é o óxido nítrico (NO). Conforme nossos resultados, os miocárdios tratados apresentaram indução da expressão do gene *nos* (*neuronal nitric oxide synthase*) 24 horas após a administração do composto, e este aumento foi verificado também nos níveis da proteína NOS1 após 48 horas.

Além disso, obtivemos resultados indicando aumento da eficiência de síntese de NO pela NOS (aumento da expressão dos genes *pts* e *hsp90*). *Pts* codifica uma enzima envolvida na síntese de tetrahydrobiopterina, uma molécula que atua como cofator das NOS e possivelmente também como regulador positivo de sua atividade [Huang *et al*, 2000]. *Hsp90* (*heat shock protein 90*), por sua vez, parece atuar sobre a interação das NOS com outras proteínas presentes nos caveolae, de forma a induzir sua atividade [Gratton *et al*, 2000].

Dados da literatura demonstram que o óxido nítrico participa como desencadeador e mediador da cardioproteção tardia induzida pelo condicionamento isquêmico [35, 36]. No caso da proteção miocárdica induzida pelo DMA, resultados preliminares em nosso laboratório indicam que o tratamento simultâneo de animais com a quinazolina DMA e o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME (*N-nitro-L-arginine-*

methyl ester) impede a ocorrência da proteção tardia (dados não mostrados). Assim, a presença do NO parece ser importante também na cardioproteção farmacológica induzida pelo composto quinazolinico em coração.

5.3.2- Elementos mediadores

A ativação dos receptores de adenosina ativa cascatas de sinalização intracelulares que se iniciam por proteínas G_i e estas, por sua vez, ativam fosfolipases da membrana citoplasmática. Dentre nossos resultados, observamos aumento da expressão de duas subunidades da proteína G: *Gng5* (*guanine nucleotide binding protein gamma 5 subunit*) e *Gna14* (*guanine nucleotide binding protein alpha 14*), além do aumento sustentado (em 24 e 48 horas) da expressão do gene *Plcz1*, que codifica a isoforma zeta da fosfolipase C (PLC- ζ).

A ação da PLC sobre lipídeos da membrana citoplasmática gera cofatores lipídicos que ativam a PKC [Yellon & Downey, 2003]. Entre nossos resultados, observamos aumento da expressão do gene *pacsin3* (*protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3*) 24 horas após o tratamento com DMA.

Outros mediadores descritos no contexto da cardioproteção tardia e que se posicionam *downstream* à PKC, são as tirosina quinases e as MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*). Entre nossos resultados observamos expressão diferencial de alguns genes que codificam elementos presentes nestas vias sinalizatórias, como a indução de *mapkapk5* (*MAP kinase-activated protein kinase 5*) 24 horas e *mapkbp1* (*mitogen activated protein kinase binding protein 1*) 48 horas após o tratamento com o composto quinazolinico. Entre os genes reprimidos, observamos os genes *mapk8* (*mitogen activated protein kinase 8*) em 24 horas e *musk* (*muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase*) e *mapk8ip2* (*mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2*) em 48 horas.

Também descrito no contexto da cardioproteção tardia, o fator transcricional Nf- κ B parece ser ativado tanto pelo estímulo isquêmico quanto por doadores de NO [Xuan *et al*, 1999]. Entre os genes induzidos em 24 horas pelo tratamento pela quinazolina

está o gene *nfkB2* (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100*). Nf-kB é um fator classicamente associado à regulação da expressão de genes que codificam proteínas de defesa e resposta a estresse, mas que também está associado a proliferação celular (revisão em [Ali & Mann, 2004]) e entre nossos resultados no transcrito de 24 horas obtivemos alteração da expressão de dois genes-alvo da sinalização via NF-kB: *defb9* (*defensin beta 9*), reprimido e *plau* (*plasminogen activator, urokinase*), induzido.

As defensinas são peptídeos com efeitos na resposta imune, sendo expressas constitutivamente ou em resposta a citocinas pró-inflamatórias [Schneider *et al*, 2005]. A redução de sua expressão após o tratamento pelo DMA sugere contenção desta resposta em miocárdios tratados pela quinazolina. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório indicam que esta quinazolina também possui efeitos anti-inflamatórios (dados não mostrados).

Já *plau* codifica o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), uma enzima central nos mecanismos de regulação da migração e adesão celular durante o remodelamento tecidual. Por esta atividade, uPA tem sido diretamente associado ao estabelecimento e efetivação das respostas angiogênicas [Pepper, 2001], portanto o possível aumento de sua atividade contribui para a compreensão das respostas angiogênicas em animais tratados pela quinazolina.

Além de sua ação nas respostas angiogênicas, uPA também exerce efeitos diretos sobre a sinalização intracelular de células endoteliais e da musculatura lisa, através da ligação com seu receptor, uPAR [Hildenbrand *et al*, 2008]. Uma via sinalizatória ativada por uPA é a via da *Janus* quinase (JAK) e dos fatores de transcrição da família das STATs (*signal transducer and activator of transcription*) – com efeitos aparentemente específicos sobre os membros STAT2 e STAT4 [Dumler *et al*, 1999]. Neste contexto, observamos no transcrito de 24 horas o aumento da expressão dos genes que codificam os fatores de transcrição STAT2 e STAT4, além de STAT3. Estes resultados fortalecem a possibilidade de que a sinalização via Nf-kB esteja entre os mediadores da sinalização tardia desencadeada em miocárdio pelo tratamento por DMA.

Por sua vez, a ativação de STAT3 foi associada à proteção miocárdica contra injúria isquêmica, aparentemente através de sua ação sobre as metalotneínas MT1 e MT2 [Oshima *et al*, 2005]. Camundongos nocaute para STAT3 demonstraram maior

suscetibilidade às injúrias cardíacas causadas por isquemia, inflamação sistêmica e toxicidade por compostos farmacológicos, além de mais propensos a desenvolver falência cardíaca em idades mais avançadas [Hilfiker-Kleiner *et al*, 2005]. Assim, a indução da expressão do gene *stat3* após o tratamento por DMA pode se constituir em um mediador importante da cardioproteção à injúria isquêmica.

5.3.3- Efeitos finais

Segundo os resultados transcricionais obtidos em miocárdio 24 e 48 horas após o tratamento pelo composto DMA, os principais efeitos da proteção miocárdica à injúria isquêmica induzida por esta quinazolina seriam (i) as alterações no metabolismo energético e (ii) a regulação do fluxo de íons e da tonicidade celular. Estes efeitos também são descritos no contexto da proteção miocárdica induzida pelo condicionamento isquêmico [Yellon & Downey, 2003].

(i) regulação do metabolismo energético

A observação de que o tratamento pela quinazolina DMA promove aumento dos níveis de mRNA e da proteína AMPK (AMP-dependente proteína quinase) indica modificações na fisiologia energética das células miocárdicas. Diversos outros resultados apresentados fortalecem a possibilidade deste ajuste na fase tardia da proteção induzida pelo composto quinazolinico, como a indução dos genes que codificam um transportador de glicose (GLUT4), a primeira enzima da via glicolítica (hexoquinase), um facilitador da sinalização insulínica (visfatina), um transportador de ácidos graxos para a matriz mitocondrial (carnitina palmitoiltransferase 1), entre outros.

Conforme já discutimos anteriormente, a AMPK é uma molécula-chave na regulação do metabolismo energético celular, atuando no sentido da ativação de vias catabólicas, como a glicólise e a beta-oxidação de lipídeos, e inativação das vias anabólicas, como gliconeogênese e lipogênese. Estudos indicam que a ativação da AMPK apresenta efeitos cardioprotetores através da ativação da glicólise durante a isquemia e tornando mais eficiente a oxidação de ácidos graxos durante a reperfusão [Russel *et al*, 2004; Hardie, 2003].

O metabolismo do músculo cardíaco é essencialmente aeróbico, pois retira a sua energia para contração e metabolismo basais através de mecanismo oxidativo. Em condições normais, os ácidos graxos e a glicose são as principais fontes energéticas, sendo que os ácidos graxos constituem as fontes preferenciais [Russel *et al*, 2004]. Em caso de isquemia, o miocárdio é regulado para preservar energia suficiente, a fim de proteger a integridade funcional e estrutural dos miócitos. Quando a isquemia miocárdica é leve, a síntese de glicogênio aumenta, a glicólise é estimulada, porém os ácidos graxos continuam a ser a maior fonte energética. Em caso de isquemia severa, ocorre aceleração da utilização do glicogênio tecidual e da glicose exógena, inibição da oxidação dos ácidos graxos livres, cessação do metabolismo oxidativo e diminuição dos níveis de ATP. Existe a transformação do metabolismo aeróbico em anaeróbico, com a glicólise fornecendo uma quantidade de energia mesmo na ausência de oxigênio (glicólise anaeróbica) [Pitella, 2004].

Assim, a possível modificação do metabolismo energético em miocárdios tratados por DMA no sentido do favorecimento da glicólise pode ser um fator determinante dos níveis de preservação funcional obtidos durante o protocolo de isquemia/reperfusão induzidos modelo de coração isolado.

Além deste ajuste metabólico, a preservação do status energético em células tratadas por DMA poderia ser justificada também pelo resultado de indução do gene *Slc6a8* (*solute carrier family 6, member 8*), que codifica um transportador de creatina CT1. A creatina, essencial na regeneração das reservas de ATP em células musculares, é produzida principalmente no fígado e rins, e seu consumo em outros tecidos depende da captação da corrente sanguínea por transportadores específicos de creatina. A suplementação por creatina é reconhecida como um recurso ergogênico (melhora do desempenho muscular durante esforço intenso) [Volek *et al*, 1997], mas também demonstra propriedades anti-oxidantes [Lenz *et al*, 2005], atividade anti-inflamatória em células endoteliais [Nomura *et al*, 2003], efeitos sobre a sobrevivência e diferenciação de neurônios GABAérgicos [Andres *et al*, 2005] e aumento da resistência de células musculares submetidas à condições hipertônicas [Alfieri *et al*, 2006].

Interessante, neste último estudo Alfieri e colegas relatam que a exposição de células C2C12 ao estresse hipertônico induziu o aumento dos níveis do mRNA do transportador de creatina CT1, bem como da atividade de transporte de creatina, principalmente após 24 horas decorridas do início do experimento [Alfieri *et al*, 2006]. Dado que observamos aumento dos níveis de mRNA de CT1 neste mesmo intervalo (24 horas após o tratamento por DMA) e em vista de resultados indicando que as células de miocárdios tratados apresentam um quadro de hipertonicidade (ver discussão no tópico ii), estes resultados se fortalecem e se interconectam para montar o cenário da proteção miocárdica.

(ii) regulação do fluxo de íons e tonicidade celular

Outro mecanismo efetor da cardioproteção induzida na fase tardia após o tratamento pela quinazolina parece ser a regulação do fluxo de íons e a tonicidade das células, conforme indicam os resultados de alteração da expressão de diversos carreadores solúveis, trocadores e canais iônicos em ambos os transcritomas.

A isquemia determina uma acidificação do ambiente intracelular causada, principalmente, pelo influxo descompensado de íons e a produção de lactato durante a glicólise anaeróbica [Anderson *et al*, 1990]. Mecanismos que reduzem os efeitos destas respostas nas células isquêmicas constituem elementos protetores da viabilidade celular.

Neste contexto, conforme exposto na seção 5.2.13, verificamos aumento da expressão de genes que codificam componentes importantes do sistema de tamponamento via bicarbonato, e este poderia ser um dos mecanismos de proteção das células tratadas por DMA à acidificação imposta durante a isquemia prolongada.

Eventos isquêmicos envolvem profundas alterações no fluxo de íons entre os meios intra e extracelulares. Resumidamente, a condição de baixa energia imposta durante a isquemia determina o aumento nas concentrações intracelulares de prótons (H^+) e sódio (Na^+), provavelmente refletindo a redução da atividade da bomba sódio/potássio ($Na^+/K^+ATPase$) paralelamente ao aumento da atividade dos trocadores sódio/hidrogênio (Na^+/H^+ exchanger ou NHE) [Pedersen *et al*, 2006]. A sobrecarga de Na^+ citoplasmático tem por consequência a ativação do trocador sódio/cálcio (Na^+/Ca^{+2} exchanger ou NCX).

Segue então um aumento das concentrações citosólicas de cálcio, não compensada pela atividade de bombas do retículo sarcoplasmático (*sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase* ou SERCA) ou da membrana plasmática (*Ca²⁺ ATPase*). Essa sobrecarga celular de cálcio pode lesar organelas intracelulares e produzir disfunção mecânica prolongada, sendo diretamente associada ao fenômeno da contratura pós-reperfusão em miocárdio isquêmicos (*stunning*) [Pitella, 2004].

Conforme alguns resultados expostos na seção 5.2.13 e outros que serão discutidos adiante, os resultados obtidos no presente trabalho incluem diversos genes que codificam proteínas sensíveis a cálcio, indicando um aumento das concentrações citosólicas de cálcio em miocárdio tratado pelo DMA. Em vista do que foi exposto acima, estas observações podem sugerir respostas convergentes entre o contexto induzido pela isquemia e pelo tratamento com o composto quinazolinico.

As concentrações intracelulares de osmólitos desempenham um papel essencial na regulação de diversos processos fisiológicos das células. A redução da osmolaridade intracelular ou aumento da osmolaridade extracelular ocasionam uma perda de volume celular (hipotonicidade ou *shrinkage*); o processo inverso, i.e., aumento da osmolaridade intracelular ou redução da extracelular, determina o inchaço das células (hipertonicidade ou *swelling*) [Hoffman & Dunham, 1995]. Ambos são processos que desencadeiam fluxos compensatórios de íons e água para restaurar o volume original das células.

Os mecanismos de transporte iônico mais importantes à compensação das alterações osmóticas internas são o trocador sódio/hidrogênio (NHE) funcionando em paralelo ao trocador cloreto/bicarbonato (AE), e o co-transportador sódio/potássio/2 cloretos (NKCC) [Pedersen *et al*, 2006]. Em ambos os casos, a regulação do volume celular está associada ao aumento no influxo de sódio e subsequente entrada de água nas células. Este mesmo mecanismo pode ser ativado em células normais após estímulos hormonais ou por fatores de crescimento [Hoffman & Dunham, 1995].

Neste contexto, em 24 horas após o tratamento pela quinazolina, observamos a indução dos genes *slc9a3r2* (*solute carrier family 9 isoform 3 regulator 2*), que codifica uma isoforma do trocador de sódio/hidrogênio (NHE3), e *slc26a6* (*solute carrier family*

26 member 6), que codifica um trocador de cloreto/bicarbonato. Observamos a repressão dos genes *atp1b4* (*ATPase, (Na⁺)/K⁺ transporting, beta 4 polypeptide*), que codifica um peptídeo da bomba sódio/potássio, e *kcnma1* (*potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1*), que codifica um canal de potássio ativado por cálcio (maxi-K).

Em 48 horas, observamos a indução do gene *Slc12a1* (*solute carrier family 12, member 1*), que codifica um cotransportador de sódio/potássio/cloreto (NKCC1), e repressão dos genes *atp2b2* (*ATPase Ca²⁺ transporting plasma membrane 2*), que codifica uma Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática, e *kcna3* (*potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3*), que codifica o canal de potássio ativado por voltagem Kv1.3.

Os resultados sugerem uma ativação do principal sistema de regulação osmótica celular (NHE, AE e NKCC), paralelamente à inibição de duas ATPases (Na⁺/K⁺ ATPase e Ca²⁺ ATPase) e dois canais de potássio (maxi-K e Kv1.3). Novamente, estes resultados sugerem que o tratamento pela quinazolina estabelece condições de estresse osmótico similares àqueles desencadeados na isquemia.

A repressão dos canais de potássio maxi-K foi observada em resposta à hipóxia e demonstrou ser sensível ao aumento dos níveis citoplasmáticos de cálcio [Lewis *et al*, 2002]. Da mesma forma, a repressão dos canais de potássio Kv1.3 já foi observada em resposta à hipóxia em linfócitos T, tipos celulares em que estes canais são bastante prevalentes [Conforti *et al*, 2003].

Interessante, os canais Kv1.3 estão envolvidos na sinalização da insulina [Xu *et al*, 2003] e na migração dos transportadores GLUT4 para a membrana plasmática por mecanismos cálcio-dependentes [Li *et al*, 2006]. Outros resultados também se interconectam com as alterações observadas em resposta à ação do DMA sobre metabolismos específicos no miocárdio: a transcrição do NHE3 parece ser induzida pela ação de glicocorticóides em células renais [Baum *et al*, 1996], e nossos resultados sugerem respostas desencadeadas por receptores de glicocorticóides. A insulina desempenha papel na ativação dos NHE através de um mecanismo que inclui a ativação da PLC- ζ [Sauvage

et al, 2000], e o gene que codifica esta isoforma (zeta) da PLC foi mantido induzido em ambos os transcritomas. A ação da AMPK já foi associada à regulação do fluxo de íons pelo NKCC1 em células renais [Fraser *et al*, 2007] e, conforme já foi bastante explorado, o tratamento por DMA induz a expressão da AMPK.

Desta forma, é bastante provável a regulação das concentrações osmóticas intracelulares seja um elemento fundamental no condicionamento induzido pelo DMA. Uma vez que o tratamento pela quinazolina induz uma modificação ampla nos elementos que regulam o fluxo de íons intracelulares e, conseqüentemente, o pH citosólico, o volume celular e o potencial de membrana das células, é possível que o miocárdio de animais tratados, quando submetidos ao protocolo de isquemia/reperfusão, estejam previamente munidos de mecanismos compensatórios à injúria imposta pelo período de baixos níveis energéticos.

6- CONCLUSÃO

Os dados obtidos até presente momento indicam que o composto quinazolínico DMA, paralelamente ao efeito de proteção miocárdica tardia, provoca alterações no perfil de expressão gênica no miocárdio de camundongos. Estas alterações referem-se à indução e repressão de genes que codificam proteínas relacionadas a diversas funções celulares importantes para respostas às agressões de diversas naturezas.

Apesar de ter sido encontrado um número relativamente grande de genes diferencialmente expressos no miocárdio de camundongos tratados com DMA 24 ou 48 horas antes do sacrifício, curiosamente poucos foram os produtos gênicos cuja expressão diferencial esteve representada nos dois períodos, sugerindo uma resposta bifásica de expressão gênica. Com base em resultados de estudos anteriores e também na constatação no presente estudos de que alguns genes reguladores e regulados (vide caso *Hedgehog*) apresentam diferenças sequenciais na sua expressão, é possível supor que a segunda fase da resposta seja determinada pela ação regulatória da primeira fase.

De fato, as análises descritivas dos transcritomas desencadeados 24 e 48 horas após o tratamento pela quinazolina indicam a ativação de várias funções celulares importantes em 24 horas, seguidas pelo equilíbrio entre ativação/inativação em 48 horas, sugerindo um retorno do miocárdio ao estado original. Se considerarmos a janela temporal que existe entre a transcrição *per se* e os processos de tradução, maturação e ativação das proteínas, então este perfil gênico encontra um paralelo com o contexto do fenótipo observado em coração isolado submetido à agressão da isquemia/reperfusão. Nos corações tratados pelo composto quinazolínico, em 48 horas a proteção à injúria isquêmica se mostra bastante significativa, seguida por uma sensível redução dos parâmetros da cardioproteção em 72 horas.

A análise dos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento pela quinazolina em coração incluiu os genes funcionalmente não caracterizados – as etiquetas de seqüências expressas (ESTs) – partindo-se da premissa que as respostas transcricionais atuam em uma escala genômica e que os genes típicos de uma determinada célula ou tecido podem ser expressos em outros sob demandas específicas. Além disto, realizamos esta análise por acreditar que o cruzamento entre a informação de expressão das ESTs em contextos biológicos diversos permite acrescentar dados para a anotação funcional dos

genes desconhecidos, em vista que eles constituem a maior parte dos genes presentes em genomas complexos, como ratos, camundongos e humanos.

O aprofundamento das análises dos genes conhecidos permitiu traçar um esboço das vias metabólicas e de sinalização afetadas pelo tratamento pela quinazolina DMA, e os resultados explorados corroboram a possibilidade de que a cardioproteção tardia induzida pelo composto se sustente em alterações amplas da fisiologia das células cardíacas.

De maneira geral, a análise dos nossos resultados indica que a proteção miocárdica induzida pelo composto DMA envolve (1) alterações do metabolismo energético do miocárdio em direção ao consumo preferencial de carboidratos, e (2) alterações da homeostase de íons e micronutrientes capazes de preparar as células miocárdicas para períodos de isquemia prolongada e para o estresse oxidativo causado pela reperfusão.

A observação da expressão diferencial de diversos genes ligados à angiogênese indicou ser este um efeito tardio do tratamento pelo composto quinazolínico, e estudos *in vitro* confirmaram estes dados. Agentes que atuam promovendo a neovascularização miocárdica têm sido propostos no tratamento de doenças isquêmicas do coração e, portanto, esta resposta à administração do DMA pode contribuir para a proteção miocárdica tardia.

Outros metabolismos afetados podem constituir respostas importantes para a proteção tardia induzida pelo composto quinazolínico DMA. Os resultados indicando respostas específicas do tecido adiposo e o aumento da produção de adipocitocinas benéficas representam mecanismos recentemente caracterizados como importantes à cardioproteção e, portanto, merecem estudos funcionais aprofundados. Da mesma forma, os resultados indicando um intenso remodelamento neuronal na fase tardia da cardioproteção induzida pelo DMA podem constituir um alvo interessante em estudos buscando elucidar elementos de memória intrínsecos ao fenômeno do condicionamento tardio.

Assim, através do estudo dos genes transcritos, o presente trabalho permitiu formar um quadro amplo e complexo das respostas do miocárdio ao tratamento pelo DMA, um composto inédito capaz de desencadear cardioproteção aguda e tardia. Várias respostas

foram avaliadas na tentativa de compreender as respostas celulares ao tratamento e, dentre elas, quais constituem elementos importantes ao fenótipo de proteção à injúria isquêmica.

A partir deste trabalho, diversos estudos poderão ser delineados de forma a confirmar ou refutar os mecanismos propostos. Além disto, a extensão das respostas sugere que a administração do composto quinazolínico pode atuar em diversos outros órgãos e tecidos, e cabe a estudos futuros conduzir experimentos para avaliar a possibilidade de emprego terapêutico da quinazolina DMA em outros sistemas biológicos que não somente o coração isquêmico.

Finalmente, a análise comparativa dos resultados obtidos no presente estudo com aqueles obtidos na proteção desencadeada por outros fármacos ou pelo condicionamento isquêmico pode contribuir para a compreensão do fenômeno da proteção miocárdica tardia.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelraheim, S.R., D.G. Spiller, and A.G. McLennan, Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein. *Biochem J*, 2003. 374(Pt 2): p. 329-35.

Adams, R.H. and R. Klein, Eph receptors and ephrin ligands. essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med*, 2000. 10(5): p. 183-8.

Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Apr 1;109(4):1344-51.

Adeghate E, Ponery AS. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell*. 2002 Feb;34(1):1-6.

Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk C, Gurbuz P, Nayci A, Oral U. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002;18:476-480.

Alfieri RR, Bonelli MA, Cavazzoni A, Brigotti M, Fumarola C, Sestili P, Mozzoni P, De Palma G, Mutti A, Carnicelli D, Vacondio F, Silva C, Borghetti AF, Wheeler KP, Petronini PG. Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress. *J Physiol*. 2006 Oct 15;576(Pt 2):391-401.

Ali S, Mann DA. Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem Funct*. 2004 Mar-Apr;22(2):67-79.

Alvarado-Castillo, C., T.K. Harden, and J.L. Boyer, Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol*, 2005. 67(1): p. 114-22.

Alvarez, B.V., et al., Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol*, 2004. 561(Pt 3): p. 721-34.

An J, Bosnjak ZJ, Jiang MT. Myocardial protection by isoflurane preconditioning preserves Ca²⁺ cycling proteins independent of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels. *Anesth Analg*. 2007 Nov;105(5):1207-13.

Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, and Cala PM. Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol Cell Physiol* 259: C940–C948, 1990.

Andreola, F., et al., Mouse liver CYP2C39 is a novel retinoic acid 4-hydroxylase. Its down-regulation offers a molecular basis for liver retinoid accumulation and fibrosis in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Biol Chem*, 2004. 279(5): p. 3434-8.

Andres RH, Ducray AD, Huber AW, Perez-Bouza A, Krebs SH, Schlattner U, Seiler RW, Wallimann T, Widmer HR. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J Neurochem*. 2005;95:33–45.

Andrey, F., et al., Acid sensing ionic channels: modulation by redox reagents. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1745(1): p. 1-6.

Armour JA. Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovasc Res*. 1999 Jan;41(1):41-54.

Armour J.A., Linderoth B., Arora R.C., DeJongste M.J.L., Ardell J.L., Kingma Jr. J.G., Hill M., Foreman R.D.. Long-term modulation of the intrinsic cardiac nervous system by spinal cord neurons in normal and ischaemic hearts. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 95 (2002) 71– 79.

Arrell DK, Elliott ST, Kane LA, Guo Y, Ko YH, Pedersen PL, Robinson J, Murata M, Murphy AM, Marban E. et al. Proteomic Analysis of Pharmacological Preconditioning: Novel Protein Targets Converge to Mitochondrial Metabolism Pathways. *Circ. Res.*, September 29, 2006; 99(7): 706 – 714.

Auchampach JA, Rizvi A, Qiu Y, Tang X-L, Maldonado C, Teschner S, and Bolli R. Selective activation of A3 adenosine receptors with N6-(3-iodobenzyl) adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ Res* 80: 800-809, 1997.

Baines, C.P., M. Goto, and J.M. Downey, Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. 29(1): p. 207-16.

Baldwin, C., et al., Upregulation of EphA2 during in vivo and in vitro renal ischemia-reperfusion injury: role of Src kinases. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. 291(5): p. F960-71.

Balligand, J.L., "La Donna e Mobile...": is cardiac neuronal nitric oxide synthase such a disconcerting enzyme? *Circulation*, 2005. 112(24): p. 3668-71.

Barry SP, Townsend PA, Latchman DS, and Stephanou A (2007) Role of the JAK-STAT pathway in myocardial injury. *Trends Mol Med* 13(2): 82-89.

Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001 Sep;11(9):372-7.

Baum M, Amemiya M, Dwarakanath V, Alpern RJ, and Moe OW. Glucocorticoids regulate NHE-3 transcription in OKP cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 270: F164–F169, 1996.

Baxter G.F., F.P., Delayed preconditioning of myocardium: current perspectives. *Basic Res Cardiol*, 2001. 96: p. 329-344.

Baxter G.F., M.M.S., Patel V.C., Yellon D.M., Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 h after ischemic preconditioning. *Circulation*, 1994. 90: p. 2993-3000.

Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol*. 1997 Jun;92(3):159-67.

Bessman, M.J., D.N. Frick, and S.F. O'Handley, The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem*, 1996. 271(41): p. 25059-62.

Bolli R, Manchikalapudi S, Tang X-L, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, and Jadoon AK. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. *Circ Res* 81: 1094-1107, 1997.

Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33 (2001), pp. 1897–1918

Bolli R., B.Z.A., Tang X-L, Qiu Y., Zhang Q., Guo Y., Jadoon A.K., Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ.Res.*, 1997. 81: p. 42-52.

Bonventre JV: Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11:43-48.

Branchek T, Smith KE & Walker, MW. Molecular Biology and Pharmacology of Galanin Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 863, 94-107.

Brar, B.K., et al., Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology*, 2004. 145(1): p. 24-35; discussion 21-3.

Budas GR, Churchill EN, and Mochly-Rosen D (2007) Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res* 55: 523-536.

Burnett, M.S., et al., The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2005. 182(2): p. 241-8.

Burnstock G (2002a) Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 364-373.

Canyon SJ, Dobson GP. Pretreatment with an adenosine A1 receptor agonist and lidocaine: A possible alternative to myocardial ischemic preconditioning. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Volume 130, Issue 2, August 2005, Pages 371-377.

Chanalaris, A., et al., Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. 35(10): p. 1295-305.

Chandler, M.P., et al., Partial inhibition of fatty acid oxidation increases regional contractile power and efficiency during demand-induced ischemia. *Cardiovasc Res*, 2003. 59(1): p. 143-51.

Chen S, Gil O, Ren YQ, Zanazzi G, Salzer JL, Hillman DE. Neurotrimin expression during cerebellar development suggests roles in axon fasciculation and synaptogenesis. *Journal of Neurocytology* 30, 927–937 (2001).

Chen ZW, Olsen RW. GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem*. 2007 Jan;100(2):279-94.

Chen, J.K., J. Capdevila, and R.C. Harris, Overexpression of C-terminal Src kinase blocks 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *J Biol Chem*, 2000. 275(18): p. 13789-92.

Chong, C.R., et al., Identification of type 1 inosine monophosphate dehydrogenase as an antiangiogenic drug target. *J Med Chem*, 2006. 49(9): p. 2677-80.

Cikos S, Bukovska A, Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*. 2007 Dec 20;8(1):113.

Conforti L, Petrovic M, Mohammad D, Lee S, Ma Q, Barone S, Filipovich AH. Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation. *J Immunol*. 2003 Jan 15;170(2):695-702.

Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anaesthetics protect the ischaemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86: 699–709.

Costa C, Leone G, Saulle E, Pisani F, Bernardi G, Calabresi P. Coactivation of GABA(A) and GABA(B) receptor results in neuroprotection during in vitro ischemia. *Stroke*. 2004 Feb;35(2):596-600.

Cuevas, P., F. Carceller, and G. Gimenez-Gallego, Fibroblast growth factors in myocardial ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning. *J Cell Mol Med*, 2001. 5(2): p. 132-42.

Dana A., B.G.F., Walker J.M., Yellon D.M., Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 31: p. 1142-1149.

Dana A., S.M., Papakrivopoulou J., Yellon D.M., Adenosine A1 receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism. *Circ.Res.*, 2000. 86: p. 989-997.

Das S, Cordis GA, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jan;288(1):H328-35.

Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *J Biol Chem*, 2005. 280(13): p. 12944-55.

Dave KR, Lange-Asschenfeldt C, Raval AP, Prado R, Busto R, Saul I, Pérez-Pinzón MA. Ischemic preconditioning ameliorates excitotoxicity by shifting glutamate/gamma-aminobutyric acid release and biosynthesis. *J Neurosci Res*. 2005 Dec 1;82(5):665-73.

Dawson VL, Dawson TM. Neuronal ischemic preconditioning. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21:423-424.

Dawson, D., et al., nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation*, 2005. 112(24): p. 3729-37.

De Hert SG, Turani F, Mathur S, Stowe DF. Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg*. 2005 Jun;100(6):1584-93.

de Wildt, S.N., et al., Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet*, 1999. 36(6): p. 439-52.

Di Lisa P, Bernardi P (2006) Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 70: 191-198.

Dieudonne, M.N., et al., Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *Am J Physiol*, 1998. 274(6 Pt 1): p. C1645-52.

Diez D., Alvarez R, and Dopazo A. Codelink: an R package for analysis of GE healthcare gene expression bioarrays. *Bioinformatics*, 2007. 23(9): p. 1168-9.

Dillman W.H., M.H.B., Barrieux A., Guth B.D., Neely W.E., Ross J.J., Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 72. *Circ.Res.*, 1986. 59: p. 110-114.

Donato M, Gelpi RJ. Adenosine and cardioprotection during reperfusion--an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003 Sep;251(1-2):153-9.

Dougherty C, Barucha J, Schofield PR, Jacobson KA, Liang BT. Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor. *FASEB J*. 12: 1785-1792.

Dumler I, Kopmann A, Wagner K, Mayboroda OA, Jerke U, Dietz R, Haller H, Gulba DC. Urokinase induces activation and formation of Stat4 and Stat1-Stat2 complexes in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):24059-65.

Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, et al. Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation* 1996;93(9):1667-76.

Estabrook, R.W., A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos*, 2003. 31(12): p. 1461-73.

Evora, P.R; Pearson, P.J; Seccombe, J.F; Schaff, H.V. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq. Bras. Cardiol*; 66(4):239-245, Abr. 1996.

Feron, O. and J.L. Balligand, Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc Res*, 2006. 69(4): p. 788-97.

Feron, O., et al., Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996. 271(37): p. 22810-4.

Fisher, P.W., et al., Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*, 2005. 111(13): p. 1601-10.

Fraser SA, Gimenez I, Cook N, Jennings I, Katerelos M, Katsis F, Levidiotis V, Kemp BE, Power DA. Regulation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochem J*. 2007 Jul 1;405(1):85-93.

Fujiwara, M., M. Ghazizadeh, and O. Kawanami, Potential role of the Slit/Robo signal pathway in angiogenesis. *Vasc Med*, 2006. 11(2): p. 115-21.

Fukuyama, N., et al., Intravenous injection of phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/biodegradable gelatin complex promotes angiogenesis in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model. *Basic Res Cardiol*, 2006.

G.K. Smyth. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3:Article 3, 2004.

Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Rjodriguez-Sinovas A, and Mirabet M. Gap-junction mediated intercellular communication in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 55: 456-465, 2002.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, and Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81: 1072-1082, 1997.

Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999 Dec;16(6):639-46.

Goding, J.W., B. Grobber, and H. Slegers, Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta*, 2003. 1638(1): p. 1-19.

Gomez R, Asnis N, Tannhauser SL, Barros HM. GABA agonists differentially modify blood glucose levels of diabetic rats. *Jpn J Pharmacol*. 1999 Aug;80(4):327-31.

Gomtsyan, A. and C.H. Lee, Nonnucleoside inhibitors of adenosine kinase. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(10): p. 1093-103.

Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*. 1995 Sep;77(3):611-21.

Gottlieb RA, Burlerson KO, Kloner RA, Babior BM, and Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94: 1621-1628, 1994.

Gratton, J.P., et al., Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem*, 2000. 275(29): p. 22268-72.

Gross GJ and Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70: 223-233, 1992.

Guerre-Millo, M., Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab*, 2004. 30(1): p. 13-9.

Guzik, T.J., D. Mangalat, and R. Korbut, Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol*, 2006. 57(4): p. 505-28.

Halestrap AP, Clarke SJ, and Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61: 372-385.

Hardie, D.G., et al., Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, 2003. 546(1): p. 113-20.

Hardie, D.G., Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett*, 2007.

Hausenloy DJ and Yellon DM (2006) Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 70: 240-253.

Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Nov;285(5):H1797-818.

Hendrickson SC, St Louis JD, Lowe JE, Abdel-aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 1997 Jan;166(1-2):85-94.

Hihi, A.K., L. Michalik, and W. Wahli, PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(5): p. 790-8.

Hildenbrand R, Gandhari M, Stroebel P, Marx A, Allgayer H, Arens N. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol*. 2008 Feb;23(2):227-36.

Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Drexler H. Many good reasons to have STAT3 in the heart. *Pharmacol Ther*. 2005 Jul;107(1):131-7.

Hoffmann EK and Dunham PB. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 161: 173–262, 1995.

Holmuhamedov EL, Wang L, and Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* 519: 347-360, 1999.

Hoshida S., K.T., Fuji H., Yamashita N., Oe H., Hori M., Suzuki K., Taniguchi N., Tada M., Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1993. 264: p. H33-H39.

Hu, W.L., et al., Plasma resistin is increased in patients with unstable angina. *Chin Med J (Engl)*, 2007. 120(10): p. 871-5.

Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*. 2000 Jun 9;275(23):17399-406.

Irene Schlifke, Eugenia Kuteeva, Tomas Hokfelt and Merab Kokai. Galanin expressed in the excitatory fibers attenuates synaptic strength and generalized seizures in the piriform cortex of mice. *Experimental Neurology*. Volume 200, Issue 2, August 2006, Pages 398-406.

Jaswal, J.S., et al., Effects of adenosine on myocardial glucose and palmitate metabolism after transient ischemia: role of 5'-AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(4): p. H1883-92.

Jeulin, C., A.C. Dazy, and F. Marano, Effects of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals on the cytosolic side of a non-selective cation channel in the cultured human bronchial epithelial cell line 16HBE14o. *Pflugers Arch*, 2002. 443(4): p. 574-83.

Jeulin, C., R. Guadagnini, and F. Marano, Oxidant stress stimulates Ca²⁺-activated chloride channels in the apical activated membrane of cultured nonciliated human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 289(4): p. L636-46.

Jones SP and Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J. Mol. Cel. Cardiology* .Vol 40, Issue 1, Jan. 2006:p16-23.

Kamat, A., et al., Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. 13(3): p. 122-8.

Karpen, H.E., et al., The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 19503-11.

Kayes-Wandover, K.M. and P.C. White, Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(7): p. 2519-25.

Kiji, T., et al., Activation of regenerating gene Reg in rat and human hearts in response to acute stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(1): p. H277-84.

Kirk E, Chin LS, Li L.J GRIF1 binds Hrs and is a new regulator of endosomal trafficking *Cell Sci*. 2006 Nov 15;119(Pt 22):4689-701.

Kirkpatrick, L.L., et al., Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *J Biol Chem*, 2000. 275(23): p. 17786-92.

Kitakase M., H.M., Morioka T., Minamino T., Takashima S., Sato H., Shinozaki Y., Chujo M., Mori H., Inoue M., Kamada T., Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. *Circulation*, 1994. 89: p. 1237-1246.

Kloor, D. and H. Osswald, S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. 25(6): p. 294-7.

Kowaluk, E.A. and M.F. Jarvis, Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000. 9(3): p. 551-64.

Kunau, W.H., V. Dommes, and H. Schulz, beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res*, 1995. 34(4): p. 267-342.

Kuzuya T., H.S., Yamashita N., Fuji H., Oe H., Hori M., Kamada T., Tada M., Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ.Res.*, 1993. 72: p. 1293-1299.

Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Gouverneur G, Bonoron-Adele S, Saks VA, Garlid KD and Santos P. (2001). Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 947-956.

Lascano EC, Valle HF, Negroni JA. Nitroglycerin induces late preconditioning against arrhythmias but not stunning in conscious sheep. *Scand Cardiovasc J.* 2007 Jun; 41(3):160-6.

Latchman, D.S., Urocortin protects against ischemic injury via a MAPK-dependent pathway. *Trends Cardiovasc Med*, 2001. 11(5): p. 167-9.

Le Jan, S., et al., Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 2003. 162(5): p. 1521-8.

Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL, O'Connor SE, Herbert JM. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Sep; 306(3):828-37.

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, and Herman B (1997) The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 174: 159-165.

Lenz H, Schmidt M, Welge V, Schlattner U, Wallimann T, Elsasser HP, Wittern KP, Wenck H, Stab F, Blatt T. The creatine kinase system in human skin: protective effects of creatine against oxidative and UV damage in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 2005;124:443-445.

Levings, M.K., et al., Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol*, 2006. 92: p. 119-55.

Lewis A, Peers C, Ashford ML, Kemp PJ. Hypoxia inhibits human recombinant large conductance, Ca(2+)-activated K(+) (maxi-K) channels by a mechanism which is membrane delimited and Ca(2+) sensitive. *J Physiol*. 2002 May 1;540(Pt 3):771-80.

Li B., et al., VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *Faseb J*, 2006. 20(9): p. 1495-7.

Li Y, Kloner RA. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Cardiovasc Res*. 1992 Mar;26(3):226-31.

Li Y., Wang P., Xu J., and Desir G. V. Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a Ca²⁺-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, February 1, 2006; 290(2): C345 - C351.

Liu GS, T.J., Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM., Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 1991. 84(350-356).

Liu Y, Sato T, O'Rourke B, and Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97: 2463-2469, 1998.

Loiselle, F.B., et al., Regulation of the human NBC3 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter by carbonic anhydrase II and PKA. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286(6): p. C1423-33.

Lopaschuk, G.D., et al., Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1213(3): p. 263-76.

Loubatières-Mariani MM, Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, and Petit P (1997) P2 purinoceptor agonists: new insulin secretagogues potentially useful in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus, in *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics* (Jacobson KA and Jarvis MF eds) pp 253-260, Wiley-Liss, New York.

MacLaren, R., W. Cui, and K. Cianflone, Visfatin expression is hormonally regulated by metabolic and sex hormones in 3T3-L1 pre-adipocytes and adipocytes. *Diabetes Obes Metab*, 2007. 9(4): p. 490-7.

Maguire J, Mody I. Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci*. 2007 Feb 28;27(9):2155-62.

Marber M.S., L.D.S., Walker J.M., Yellon D.M., Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 1993. 88: p. 1264-1272.

Marillat, V., et al., Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol*, 2002. 442(2): p. 130-55.

Marin RM. Caracterização do efeito inibitório de derivados anilinoquinazolínicos na atividade da adenosina quinase. 2007. In Tese de Doutorado. Departamento de Clínica Médica-Faculdade de Ciências Médicas-Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Marintchev, A., et al., Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003. 100(4): p. 1535-40.

Martin, D., et al., GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. *Genome Biol*, 2004. 5(12): p. R101.

Mateo, J., T.K. Harden, and J.L. Boyer, Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol*, 1999. 128(2): p. 396-402.

McMurtrie, H.L., et al., The bicarbonate transport metabolon. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2004. 19(3): p. 231-6.

Mielke JG, Wang YT. Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface GABA receptors following oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *J Neurochem*. 2005 Jan;92(1):103-13.

Miyawaki, H. and M. Ashraf. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*, 1997. 80(6): p. 790-9.

Miyawaki, H., X. Zhou, and M. Ashraf, Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*, 1996. 79(1): p. 137-46.

Mocanu MM and Yellon DM (2007) PTEN, the Achilles' heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury? *Br J Pharmacol* 150: 833-838.

Mongillo M, John AS, Leccisotti L, Pennell DJ, Camici PG. Myocardial pre-synaptic sympathetic function correlates with glucose uptake in the failing human heart. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007 Aug;34(8):1172-7.

Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Sadoshima J, et al. Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res* 2005;96(2):180-8.

Morrow, D., et al., Biomechanical Regulation of Hedgehog Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro and in Vivo. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006.

Mortusewicz, O., et al., Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(25): p. 8905-9.

Muller, D.N., et al., Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyecosatetraenoic acid formation. *Biochem J*, 2007. 403(1): p. 109-18.

Murphy DA, Thompson GW, Ardell JL, McCraty R, Stevenson RS, Sangalang VE, Cardinal R, Wilkinson M, Craig S, Smith FM, Kingma JG, Armour JA. The heart reinnervates after transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000 Jun;69(6):1769-81.

Murray C.J., L.A.D. Alternate projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet*, 1997. 349: p. 1498-1504.

Murry C.E., J.R.B., Reimer K.A., Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986. 74: p. 1124-1136.

Nakashiba T, Ikeda T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, Culotti JG, Itohara S. Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6540-50.

Nanda, B.L., et al., PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants--a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem*, 2007. 7(8): p. 765-77.

Nemoto, N. and J. Sakurai, Glucocorticoid and sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in the mouse liver and hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1995. 319(1): p. 286-92.

Nemoto, N., J. Sakurai, and Y. Funae, Maintenance of phenobarbital-inducible Cyp2b gene expression in C57BL/6 mouse hepatocytes in primary culture as spheroids. *Arch Biochem Biophys*, 1995. 316(1): p. 362-9.

Nicolau JC, Timerman A, Piegas LS, Marin-Neto JA, Rassi A. Jr. Guidelines for Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction of the Brazilian Society of Cardiology (II Edition, 2007). *Arq Bras Cardiol* 2007; 89 (4): e89-e131.

Nithipatikom, K., et al., Epoxyeicosatrienoic acids in cardioprotection: ischemic versus reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(2): p. H537-42.

Nithipatikom, K., et al., Inhibition of cytochrome P450 omega-hydroxylase: a novel endogenous cardioprotective pathway. *Circ Res*, 2004. 95(8): p. e65-71.

Node, K., et al., Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 1999. 285(5431): p. 1276-9.

Nomikos, M., et al., Role of phospholipase C-zeta domains in Ca²⁺-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca²⁺ oscillations. *J Biol Chem*, 2005. 280(35): p. 31011-8.

Nomura A, Zhang M, Sakamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Mochizuki M, Kimura T, Uchida Y, Sekizawa K. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol*. 2003;139:715–720.

Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A, Morin D. Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Oct;323(1):336-45.

O'Byrne, J., et al., The human bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase functions in the conjugation of fatty acids to glycine. *J Biol Chem*, 2003. 278(36): p. 34237-44.

Okazaki, Y., et al., Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 2002. 420(6915): p. 563-73.

Oldenburg O, Critz SD, Cohen MV, and Downey JM (2003) Acetylcholine-induced production of reactive oxygen species in adult rabbit ventricular myocytes is dependent on phosphatidylinositol 3- and Src-kinase activation and mitochondrial KATP channel opening. *J Mol Cell Cardiol* 35: 653-660.

Onody, A., et al., Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FEBS Lett*, 2003. 536: p. 35-40.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde e Sistema Único de Saúde. Painel de Indicadores do SUS. Ano I – n 1 - Agosto de 2006.

Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res*. 2005 Feb 1;65(2):428-35.

Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Feb;282(2):H531-9.

Pain T, Yang X-M, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, and Downey JM. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 87: 460-466, 2000.

Park, J., B. Singh, and R.S. Gupta, Inhibition of adenosine kinase by phosphonate and bisphosphonate derivatives. *Mol Cell Biochem*, 2006. 283(1-2): p. 11-21.

Peart JN, Gross GJ. Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts. *Basic Res Cardiol*. 2005 Jul;100(4):328-36.

Pedersen SF, O'Donnell ME, Anderson SE and Cala PM. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in the heart, brain, and blood. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1-R25, 2006.

Pepper M S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1104–1117.

Perrault LP, Menasché P. Preconditioning: can nature's shield be raised against surgical ischemic-reperfusion injury? *Ann Thorac Surg*. 1999 Nov;68(5):1988-94.

Peter Ferdinandy, Rainer Schulz and Gary F. Baxter. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev*. 2007 Dec;59(4):418-58.

Pierreux, C.E., et al., Antigluocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(16): p. 8961-6.

Pittella FJM. Bases metabólicas do miocárdio isquêmico – miocárdio stunned, hibernado e pré-condicionamento isquêmico. *Editorial Laranjeiras*, Vol.1, nº 4, Agosto 2004.

Pola, R., et al., Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation*, 2003. 108(4): p. 479-85.

Preckel B, Schlack W, Comfère T et al. Effects of enflurane, sevoflurane, and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth* 1998; 81: 905–12.

Qi, C., et al., Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)-interacting protein, is required for PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem*, 2003. 278(28): p. 25281-4.

Qian, L., J. Liu, and R. Bodmer, Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis. *Curr Biol*, 2005. 15(24): p. 2271-8.

Qiu Y, Ping P, Tang X-L, Manchikalapudi S, Rizvi A, Zhang J, Takano H, Wu W-J, Teschner S, and Bolli R. Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that ϵ is the isoform involved. *J Clin Invest* 101: 2182-2198, 1998.

Reddy DS, Rogawski MA. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *J Neurosci*. 2002 May 1;22(9):3795-805.

Reddy, J.K. and T. Hashimoto, Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 2001. 21: p. 193-230.

Riccioni, G., et al., Antioxidant vitamin supplementation in cardiovascular diseases. *Ann Clin Lab Sci*, 2007. 37(1): p. 89-95.

Rickhag, M., et al., Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. *J Neurochem*, 2006. 96(1): p. 14-29.

Rider, M.H., et al., 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J*, 2004. 381(Pt 3): p. 561-79.

Rocco SA.; Barbarini JE; Rittner R. Syntheses of some 4-anilinoquinazoline derivatives. *Synthesis. Journal of Synthetic Organic Chemistry, Alemanha*, v. 3, p. 429-435, 2004.

Rolim Filho LA. Proteção Miocárdica por Cloridrato de 6,7-Dimetóxi-4-N (3-N, N-Dimetilfenil) Aminoquinazolina em Corações Isolados de Ratos. 2005. In *Dissertação de Mestrado. Departamento de Farmacologia – Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)*.

Rosamond W. et al. Heart Disease and Stroke Statistics - 2007 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007;115:e69-e171.

Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischemia. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13:439–445.

Russell, R.R., 3rd, et al., AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*, 2004. 114(4): p. 495-503.

Rzizgalinski, B.A., et al., Calcium influx factor, further evidence it is 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid. *J Biol Chem*, 1999. 274(1): p. 175-82.

Sahinkanat T, Ozkan UK, Tolun FI, Ciralik H, Imrek SS. The protective effect of ischemic preconditioning on rat testis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007 Dec 20;5(1):47.

Saikawa, Y., et al., Inhibition of DNA methyltransferase by antisense oligodeoxynucleotide modifies cell characteristics in gastric cancer cell lines. *Oncol Rep*, 2004. 12(3): p. 527-31.

Saito, A., et al., All-trans retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor: possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology*, 2007. 148(3): p. 1412-23.

Sakamoto K, Yonoki Y, Kuwagata M, Saito M, Nakahara T, Ishii K. Histological protection against ischemia-reperfusion injury by early ischemic preconditioning in rat retina. *Brain Res*. 2004 Jul 23;1015(1-2):154-60.

Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, and Garlid KD. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H284–H295, 2002.

Saraiva, R.M., et al., Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in ob/ob mice. *Nitric Oxide*, 2007. 16(3): p. 331-8.

Sauvage, M, Maziere P, Fathallah H, and Giraud F. Insulin stimulates NHE1 activity by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in human erythrocytes. *Eur J Biochem* 267: 955-962, 2000.

Schena M., S.D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. *Science*, 1995. 270: p. 467-470.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med*. 2005 Aug;83(8):587-95.

Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation Research*. 1996;78:1100-1104.

Schulz R, Rose J, and Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H1341-H1352, 1994.

Segawa, K., et al., Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 349(3): p. 875-82.

Serman, A., et al., DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. *Coll Antropol*, 2006. 30(3): p. 665-71.

Seubert, J.M., et al., Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function. *Circ Res*, 2006. 99(4): p. 442-50.

Shen YT, Fallon JT, Iwase M, Vatner SF. Innate protection of baboon myocardium: effects of coronary artery occlusion and reperfusion. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 2): H1812-8.

da Silva, C.G., et al., Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ Res*, 2006. 98(5): p. e39-47.

da Silva, R., et al., Ischemic but not pharmacological preconditioning elicits a gene expression profile similar to unprotected myocardium. *Physiol Genomics*, 2004. 20(1): p. 117-30.

Skaletz-Rorowski, A., et al., Heparin-induced overexpression of basic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor receptor, and cell-associated proteoglycan sulfate in cultured coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(8): p. 1063-9.

Song, M.S., et al., Identification of a mouse short-chain dehydrogenase/reductase gene, retinol dehydrogenase-similar. Function of non-catalytic amino acid residues in enzyme activity. *J Biol Chem*, 2003. 278(41): p. 40079-87.

Southworth, R., et al., A re-evaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006.

Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 2005. 85(3): p. 1093-129.

Stanley, W.C., Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2004. 9 Suppl 1: p. S31-45.

Steenbergen C (2002) The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 97: 276-285.

Steinfeld, R., H. Van Den Berghe, and G. David, Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J Cell Biol*, 1996. 133(2): p. 405-16.

Steppan, C.M. and M.A. Lazar, The current biology of resistin. *J Intern Med*, 2004. 255(4): p. 439-47.

Strohm C, Barancik T, Brühl ML, Kilian SA, and Schaper W (2000) Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 218-229.

Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol*. 1998 Oct; 93(5):384-90.

Sun J-Z, T.X.-L., Knowlton A.A., Park S-W, Qiu Y., Bolli R., Late preconditioning against myocardial stunning: an endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 h after brief ischemia in conscious pigs. *J Clin Invest*, 1995. 95(388-403).

Sun J-Z, Tang X-L, Knowlton AA, Park S-W, Qiu Y, and Bolli R. Late preconditioning against myocardial stunning: an endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 h after brief ischemia in conscious pigs. *J Clin Invest* 95: 388-403, 1995.

Takano H, Bolli R, Black RG Jr, Kodani E, Tang X-L, Yang Z, Bhattacharya S, and Auchampach JA. A1 or A3 adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res* 88: 520-528, 2001.

Takano H, Manchikalapudi S, Tang X-L, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, and Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 98: 441-449, 1998.

Takashi E, Wang Y, Ashraf M. Activation of mitochondrial K(ATP) channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res.* 1999 Dec 3-17;85(12):1146-53.

Takeishi, Y., et al., Serum resistin is associated with high risk in patients with congestive heart failure--a novel link between metabolic signals and heart failure. *Circ J*, 2007. 71(4): p. 460-4.

Takimoto, Y., et al., Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol*, 2000. 76(2-3): p. 135-45.

Tilg, H. and A.R. Moschen, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(10): p. 772-83.

Tritto, I., et al., Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*, 1997. 80(5): p. 743-8.

Tsuchida A., T.R., Olsson R.A., Downey J.M., The anti-infarct effect of an adenosine A1-selective agonist is diminished after prolonged infusion as is the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. 26: p. 303-311.

van der Veer, E., et al., Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation. *Circ Res*, 2005. 97(1): p. 25-34.

Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, and Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 266: H829-H839, 1994.

Vegh A, Komori S, Szekeres L, and Parratt JR. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res* 26: 487-495, 1992.

Vihanto, M.M., et al., Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin. *Faseb J*, 2005. 19(12): p. 1689-91.

Vince, J.W. and R.A. Reithmeier, Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger. *J Biol Chem*, 1998. 273(43): p. 28430-7.

Volek J.S., Kraemer W.J., Bush J.A., Boetes M., Incledon T., Clark K.L., Lynch J.M. Creatine supplementation enhance muscular performance during high intensity resistance exercise. *Journal of American Dietetic Association*, Chicago, v.97, n.7, p.765-770, 1997.

Waagepetersen HS, Sonnewald U, Schousboe A. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J Neurochem*. 1999 Oct;73(4):1335-42.

Wada, A.M., D.E. Reese, and D.M. Bader, Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Development*, 2001. 128(11): p. 2085-93.

Wang, P., et al., The circulating PBEF/NAMPT/visfatin level is associated with a beneficial blood lipid profile. *Pflugers Arch*, 2007. 454(6): p. 971-6.

Wang, S., C. He, T. Hashemi & M. Bayne. 1997. Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes. *J. Biol. Chem*. 272: 31949–31952.

Weintraub, N.L., et al., Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res*, 1997. 81(2): p. 258-67.

Willems L, Headrick JP. Protecting murine hearts from ischaemia-reperfusion using selective inhibitors of adenosine metabolism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 Mar;32(3):179-83.

Xiao X-H and Allen DG. Activity of the Na^+/H^+ exchanger is critical to reperfusion damage and preconditioning in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 48: 244-253, 2000.

Xu J, Koni PA, Wang P, Li G, Kaczmarek L, Wu Y, Li Y, Flavell RA, Desir GV. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Hum Mol Genet.* 2003 Mar 1;12(5):551-9.

Xu, F.F., X.H. Liu, and L.R. Cai, Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in the prevention of cardiomyocyte injury induced by hypoxic preconditioning. *Sheng Li Xue Bao*, 2004. 56(5): p. 609-14.

Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, Qiu Y, Li JJ, Bolli R. Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res.* 1999 May 14;84(9):1095-109.

Xue, L., et al., Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 6925-30.

Yang, Y.H., et al., Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(4): p. e15.

Yellon D.M., Downey J.M., Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol. Rev.*, 2003. 83: p. 1113-1151.

Young, M.J., et al., Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(11): p. 5121-6.

Yuan, H., et al., Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*, 2005. 24(32): p. 5069-78.

Zaidi, A., et al., Oxidative inactivation of purified plasma membrane Ca²⁺-ATPase by hydrogen peroxide and protection by calmodulin. *Biochemistry*, 2003. 42(41): p. 12001-10.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H579-H588.

Zimmermann, H., Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. 362(4-5): p. 299-309.

Zubakov, D., et al., Late ischemic preconditioning of the myocardium alters the expression of genes involved in inflammatory response. FEBS Lett, 2003. 547: p. 51-55.

8- APÊNDICES

A- Genes conhecidos diferencialmente expressos 24 horas após a administração do composto quinazolínico

Gene (símbolo): identidade dos genes. Categorias: descrição das funções descritas para as proteínas codificadas pelos respectivos genes. Variação da expressão: os valores representam a amplitude da variação nas amostras tratadas pelo DMA em relação aos tratamentos com o veículo. Valores positivos, aumento da expressão (indução gênica); valores negativos, redução da expressão (repressão gênica). P.value: significância estatística (corte em $p < 0.1$).

Gene (símbolo)	Categorias	Variação da expressão	p.value
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta) (Agpat2)	metabolismo/lipídeos	2,42	0,0563
2-cell-stage, variable group, member 3 (Tcstv3)	ciclo celular	2,17	0,0529
6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (Pts)	metabolismo/biossíntese de NO	2,51	0,0831
hypothetical Pleckstrin putative G-protein interacting domain containing protein, full insert sequence	sinalização/ativação Rac GTPase	3,39	0,0944
a disintegrin and metalloprotease domain 26 (testase3) (Adam26)	proteólise	-3,27	0,0967
acyl-Coenzyme A binding domain containing 6 (Acbd6)	metabolismo/lipídeos	-5,60	0,0684
adenylate cyclase 3 (Adcy3)	sinalização/transdução	2,43	0,0498
ADP-ribosyltransferase 1 (Art1)	tradução/modificação de proteínas	2,11	0,076
albumin 1 (Alb1)	metabolismo/lipídeos/ transporte	-2,34	0,0331
alcohol dehydrogenase 1 (class I) (Adh1)	metabolismo	3,07	0,0472
amino-terminal enhancer of split (Aes)	ciclo celular/diferenciação	2,46	0,0926
amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 (Apha2)	sinalização/excitose de vesículas	2,16	0,0525
amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (Aplp1)	sinalização/neurodegeneração	3,34	0,0975
angiomotin (Amot)	estrutural/angiogênese	3,22	0,0466
angiopoietin-like 2 (Angptl2)	sinalização/fator	2,30	0,0959
angiopoietin-like 4 (Angptl4)	sinalização/fator	4,54	0,0442
ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 6 (Asb6)	sinalização/adipócitos/ resposta a insulina	2,75	0,0897
aquaporin 1 (Aqp1)	transporte	4,45	0,0614

arylacetylase deacetylase (esterase) (Aadac)	metabolismo/lipídeos	2,09	0,0872
asparagine-linked glycosylation 1 homolog (yeast, beta-1,4-mannosyltransferase) (Alg1)	tradução/modificação, glicosilação	2,26	0,0764
ATPase, (Na+)/K+ transporting, beta 4 polypeptide (Atp1b4)	transporte	-2,32	0,0885
ATPase, H+ transporting, V1 subunit E-like 2 isoform 2 (Atp6v1e2)	transporte/lisossomos	2,05	0,0644
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7 (Abca7)	transporte	2,99	0,0538
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1 (Abcf1)	transporte	2,47	0,0654
baculoviral IAP repeat-containing 3 (Birc3)	ciclo celular/anti-apoptose	2,77	0,0396
BCL2-like 13 (apoptosis facilitator) (Bcl2l13)	ciclo celular/apoptose	2,02	0,0816
benzodiazapine receptor associated protein 1 (Bzrap1)	metabolismo/lipídeos	2,45	0,0732
biglycan (Bgn)	estrutural/membrana	3,19	0,0879
bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (Baat)	metabolismo/lipídeos	-2,13	0,0784
blood vessel epicardial substance (Bves)	sinalização/angiogênese	3,24	0,0167
branched chain aminotransferase 2, mitochondrial (Bcat2)	metabolismo/aminoácidos	3,44	0,0674
breast cancer anti-estrogen resistance 3, full insert sequence	sinalização/CDC42	2,01	0,0699
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A (Baz2a)	tradução/cromatina	2,27	0,0173
Btg3 associated nuclear protein (Banp)	transcrição	3,43	0,0909
C79309 C79309 Mouse 3.5-dpc blastocyst cDNA cDNA clone J0064C11 3' similar to House mouse; Musculus domesticus DNA for GTPase-activating	desconhecido	4,64	0,0144
cadherin 6 (Cdh6)	estrutural/adesão celular	2,45	0,075
calbindin 2 (Calb2)	transporte/cálcio	-2,94	0,0542
calmodulin-dependent protein kinase II beta M isoform mRNA	sinalização/cálcio	4,33	0,0431
camello-like 2 (Cml2)	estrutural/adesão celular	6,56	0,0365
carbohydrate kinase-like (Carkl)	metabolismo/carboidratos	3,57	0,0937
carbonic anhydrase 7 (Car7)	metabolismo/tamponamento	2,78	0,0861
carboxypeptidase N, polypeptide 1 (Cpn1)	proteólise	4,11	0,0215
carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle (Cpt1b)	metabolismo/sinalização	2,00	0,0819
cathepsin C (Ctsc)	proteólise	2,21	0,0948
cathepsin D (Ctsd)	proteólise	2,12	0,0849
caveolin, caveolae protein (Cav)	tráfego/reciclagem	2,28	0,0421
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (Cebpa)	transcrição/biogênese (adipócitos)	2,73	0,0349
CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S cerevisiae) (Ccrn4l)	sinalização/ritmo circadiano	2,39	0,0761
CD3 antigen, epsilon polypeptide (Cd3e)	sinalização/resposta imune	2,64	0,0577
CD33 antigen (Cd33)	sinalização/resposta imune	2,08	0,0854
CD8 antigen, beta chain (Cd8b)	sinalização/resposta imune	3,05	0,015
cell division cycle 20 homolog (S cerevisiae) (Cdc20)	ciclo celular/divisão	2,85	0,0279

cell growth regulator with EF hand domain 1, mRNA (cDNA clone MGC:28551 IMAGE:4206019)	ciclo celular	-2,78	0,0717
chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1 (Ccr111)	sinalização/receptor	4,98	0,009
chemokine (C-C motif) receptor 8 (Ccr8)	sinalização/receptor	-2,73	0,0233
cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4 (Chrna4)	sinalização/receptor	-2,46	0,0607
cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3 (Chrb3), transcript variant 2	sinalização/receptor	-3,75	0,0374
chymotrypsin-like (Ctrl)	proteólise	2,07	0,0482
cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2 (Cstf2)	transcrição/processamento	6,37	0,0196
cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1 (Cstf1)	transcrição/processamento	3,03	0,037
coagulation factor II (F2)	sinalização/fator	2,89	0,0729
coronin, actin binding protein 6 (Coro6)	estrutural	5,92	0,006
Corpos mRNA, 3' untranslated region	desconhecido	2,86	0,0938
C-reactive protein, petaxin related (Crp)	sinalização	-2,24	0,0729
CRYPTDIN-RELATED PROTEIN 4C-2 PRECURSOR	metabolismo/xenobióticos	2,61	0,0236
C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 10 (Clecsf10)	estrutural/adesão celular	2,12	0,0505
cyclin L2 (Ccnl2), transcript variant 2	ciclo celular/divisão	2,00	0,0586
CYTOCHROME P450 2D3 (EC 1.14.14.1) (CYP11D3) (P450-DB3) (DEBRISOQUINE 4-HYDROXYLASE) [Rattus norvegicus], full insert sequence	metabolismo/xenobióticos	3,24	0,0485
cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22 (Cyp2d22)	metabolismo/xenobióticos	3,04	0,06
cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12 (Cyp4a12)	metabolismo/xenobióticos	-3,12	0,0206
DBX HOMEBOX (FRAGMENT) homolog [Mus sp], full insert sequence	transcrição	-4,55	0,0058
defensin beta 1 (Defb1)	metabolismo/xenobióticos	-4,67	0,0567
defensin beta 9 (Defb9)	metabolismo/xenobióticos	-3,13	0,0255
defensin related cryptdin, related sequence 10 (Defcr-rs10)	metabolismo/xenobióticos	2,62	0,0099
dentatorubral pallidolusian atrophy (Drpla)	sinalização/fator	2,91	0,0676
desmin (Des)	estrutural	2,90	0,0855
desmocollin 1 (Dsc1)	estrutural/adesão celular	-2,29	0,087
dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis) (Dkk4)	sinalização/inibidor via Wnt	2,13	0,0759
DNA binding protein with his-thr domain (Dbpht1)	transcrição/transporte nucleo- citoplasma	-2,91	0,0701
DNA fragmentation factor, beta subunit (Dffb)	ciclo celular/apoptose	2,47	0,0216
DNA primase, p58 subunit (Prim2)	ciclo celular/replicação	2,31	0,099
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (Dnajb1)	tradução/folding	2,40	0,0845

DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10 (Dnajc10)	tradução/folding	2,40	0,0771
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6 (Dnajc6)	tradução/folding	-5,98	0,013
dopamine receptor D1A (Drd1a)	sinalização/receptor	-2,38	0,0636
double C2, gamma (Doc2g)	tráfego/vesículas	2,04	0,0894
dual specificity phosphatase 7 (Dusp7)	sinalização/transdução	3,86	0,0463
dynactin 2 (Dctn2)	estrutural	2,08	0,0803
dynein, cytoplasmic, intermediate chain 2 (Dncc2)	estrutural/citoesqueleto	2,33	0,0908
E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain (Ets2)	ciclo celular/proliferação	-2,75	0,058
ecotropic viral integration site 5 (Evi5)	ciclo celular	5,55	0,0032
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (Entpd2)	metabolismo/nucleotídeos	2,36	0,0975
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3, mRNA (cDNA clone IMAGE:3495326)	metabolismo/nucleotídeos	-2,72	0,0665
elastin microfibril interfacier 1 (Emilin1)	estrutural/adesão celular	-2,93	0,0911
Eph receptor A1 (Epha1)	sinalização/receptor	2,03	0,0453
epoxide hydrolase 2, cytoplasmic (Ephx2)	metabolismo/xenobióticos	3,64	0,0097
esterase 22 (Es22) (egasyn)	metabolismo/lipídeos	-2,16	0,08
etoposide induced 24 mRNA (Ei24)	ciclo celular/xenobióticos	2,15	0,0934
EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 1A (EIF-1A) homolog (EIF-4C) [Mus musculus], full insert sequence	tradução	13,34	0,006
EY-cadherin precursor, mRNA	estrutural/adesão celular	2,31	0,0262
F-box only protein 25 (Fbxo25)	transporte	2,09	0,0647
Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide (Fcer1a)	sinalização/receptor	-2,21	0,0686
feline sarcoma oncogene (Fes)	ciclo celular/proliferação	2,11	0,0955
ferritin light chain 1 (Ftl1)	transporte	3,67	0,089
Fgfr1 oncogene partner (Fgfr1op)	ciclo celular/proliferação	2,58	0,0733
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (Flrt1)	estrutural	3,37	0,0177
FK506 binding protein 5 (Fkbp5)	tradução/folding	2,93	0,0807
FK506 binding protein-like (Fkbp1)	tradução/folding	4,27	0,0636
Ftsj homolog (E coli) (Ftsj)	Tradução/rRNA metilase	2,34	0,0482
G protein-coupled receptor kinase 1 (Grk1)	sinalização/transdução	2,29	0,0609
galanin receptor 3 (Galr3), mRNA	sinalização/receptor	6,48	0,0176
gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 1 (Gabra1)	sinalização/receptor	3,43	0,0332
GLUTAMINYL-TRNA SYNTHETASE (EC 61.1.18) (GLUTAMINE--TRNA LIGASE) (GLNRS) homolog [Homo sapiens], full insert sequence	tradução	3,08	0,0588
glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase (Gcdh)	metabolismo/lipídeos	2,43	0,0437
glycine receptor, alpha 3 subunit (Glr3)	sinalização/receptor	-2,66	0,0597
glycine-N-acyltransferase (Glyat)	sinalização/receptor	-2,37	0,0362

glycosyltransferase-like 1B (Gylt11b)	tráfego/modificação de proteínas	3,48	0,0819
glypican 1 (Gpc1)	estrutural/membrana	2,77	0,0552
golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2, mRNA (cDNA clone MGC:86177 IMAGE:30356060)	tráfego/reciclagem	-7,43	0,0886
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3 subunit (Gng3)	sinalização/proteína G	-2,09	0,0261
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 subunit (Gng5)	sinalização/proteína G	2,67	0,0441
guanine nucleotide binding protein, alpha 14 (Gna14)	sinalização/proteína G	2,06	0,0536
heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (Hs6st1)	metabolismo/lipídeos	2,73	0,0564
Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (human) (Hps3)	tráfego/biogênese de lisossomos	2,21	0,0588
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein methyltransferase-like 3 (S cerevisiae) (Hrmt113)	metabolismo/purina	2,80	0,0195
hexokinase 1 (Hk1)	metabolismo/glicólise	3,88	0,0318
histocompatibility 2, class II antigen E beta (H2-Eb1)	sinalização/resposta imune	2,23	0,0447
histone deacetylase 5 (Hdac5)	transcrição/remodelamento da cromatina	2,38	0,0342
histone gene complex 2, full insert sequence	estrutural/cromatina	4,73	0,0387
HLA-B associated transcript 8 (Bat8), transcript variant long	transcrição	2,48	0,0952
homeo box A11 (Hoxa11)	transcrição/biogênese	2,30	0,0864
homeo box D9 (Hoxd9)	transcrição/biogênese	2,89	0,0917
hyaluronidase 1 (Hyal1) and Fus 2 (Fus2) bicistronic mRNA, transcript variant 4, partial cds; alternatively spliced	metabolismo/degradação de glicanas	5,33	0,0786
hypothetical C-type lectin domain containing protein, full insert sequence	estrutural/adesão celular	2,82	0,0478
hypothetical Cysteine-rich region containing protein, full insert sequence	desconhecido	2,04	0,0544
hypothetical Cysteine-rich region/Immunoglobulin and major histocompatibility complex domain containing protein, full insert sequence	sinalização/resposta imune	-2,84	0,0828
hypothetical Double-stranded RNA binding (DsRBD) domain/Adenosine-deaminase (editase) domain containing protein, full insert sequence	transcrição/processamento	2,54	0,0826
hypothetical Fibronectin type III domain/Fibronectin type III repeat containing protein, full insert sequence	estrutural/matriz	10,28	0,0854
hypothetical INTEGRIN CD47 PRECURSOR SIGNAL GLYCOPROTEIN ANTIGEN INTEGRIN-ASSOCIATED SURFACE DETERMINANT containing protein, full insert sequence	sinalização/integrina	-2,24	0,0883

hypothetical Lysine-rich region containing protein, full insert sequence	desconhecido	2,18	0,0644
hypothetical Mitochondrial energy transfer proteins (carrier protein) containing protein, full insert sequence	transporte	2,40	0,0969
hypothetical PA-phosphatase related phosphoesterase containing protein, full insert sequence	desconhecido	3,10	0,0929
Ig rearranged kappa-chain mRNA, clone AN08K	sinalização/resposta imune	-3,97	0,0047
immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28), full insert sequence	sinalização/resposta imune	-2,78	0,0852
influenza virus NS1A binding protein (Ivns1abp)	desconhecido	2,72	0,0851
inhibitor of DNA binding 1 (Idb1)	transcrição/angiogênese	2,00	0,0913
inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1 (Impdh1)	metabolismo/purinas	2,65	0,0915
intercellular adhesion molecule 4, Landsteiner-Wiener blood group (Icam4)	estrutural/adesão celular	5,08	0,0074
interferon gamma induced GTPase (Igtp)	sinalização/resposta imune	2,27	0,019
interleukin 31 receptor A (Il31ra)	sinalização/receptor	2,15	0,0542
interleukin 8 receptor, beta (Il8rb)	sinalização/receptor	2,21	0,03
isolate SB2-28a T-cell receptor Va4/Ja37 alpha chain mRNA	sinalização/receptor	4,10	0,0995
kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum) (Klk7)	proteólise	-2,57	0,0965
kaptin (Kptn)	estrutural/citoesqueleto	3,30	0,0218
karyopherin (importin) alpha 3 (Kpna3)	transporte/núcleo	2,27	0,0821
keratin complex 1, acidic, gene 24 (Krt1-24)	estrutural/citoesqueleto	-2,13	0,0967
keratin complex 2, basic, gene 6b (Krt2-6b)	estrutural/citoesqueleto	-4,93	0,0221
killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 1 (Klra1)	sinalização/receptor	-2,47	0,0883
killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 17 (Klra17)	sinalização/receptor	-2,49	0,0442
Kinesin superfamily protein 2B, full insert sequence	estrutural/microtúbulo	2,25	0,0933
Kruppel-like factor 3 (basic) (Klf3)	transcrição	2,67	0,047
lactoperoxidase (Lpo)	metabolismo/peroxidase	-3,04	0,0409
leukotriene A4 hydrolase (Lta4h)	metabolismo/lípídeos	2,76	0,0684
LIM and senescent cell antigen-like domains 1 (Lims1)	estrutural/adesão celular	-2,36	0,0753
lumican (Lum)	estrutural/matriz	3,07	0,088
lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D (Ly6g6d)	sinalização/resposta imune	2,00	0,0937
lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2)	sinalização/resposta imune	2,23	0,0786
lymphoid nuclear protein related to AF4-like (Laf4l)	sinalização/resposta imune	2,18	0,0893
lysosomal membrane glycoprotein 1 (Lamp1)	estrutural/membrana	2,62	0,0343
makorin, ring finger protein, 2 (Mkrn2)	proteólise/ubiquitinação	2,07	0,0978
male sterility domain containing 1 (Mlst1) (FAR2)	metabolismo/lípídeos	2,12	0,0828
MAP kinase-activated protein kinase 5 (Mapkapk5)	sinalização/transdução	2,41	0,092
MARVEL (membrane-associating) domain containing 3 (Mrvlc3), transcript variant 1	estrutural/membrana	2,63	0,0713

matrin 3 (Matr3)	estrutural/matriz perinuclear	4,20	0,035
membrane cofactor protein (Mcp)	estrutural/membrana	2,55	0,0416
membrane progesterin receptor alpha (Mpra) (PAQR7)	sinalização/receptor	2,50	0,064
membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4) (Mpp4)	estrutural/membrana	2,38	0,0362
methionine adenosyltransferase I, alpha (Mat1a)	metabolismo/purinas	-3,12	0,0188
methyl-CpG binding domain protein 2 (Mbd2)	transcrição/epigenética	2,04	0,0714
MHC I - like leukocyte 2 (Mill2)	sinalização/resposta imune	2,29	0,0659
mitochondrial ribosomal protein L45 (Mrpl45)	tradução	2,81	0,0251
mitogen activated protein kinase 8 (Mapk8)	sinalização/transdução	-2,38	0,0685
mitotic arrest deficient 1-like 1 (Mad111)	ciclo celular/divisão	2,60	0,0237
mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 (Madcam1)	estrutural/adesão celular	4,01	0,0631
myocilin (Myoc)	estrutural/matriz	3,55	0,0503
N-ACETYLLACTOSAMINIDE ALPHA-1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE (EC 24.1.1.151) (GALACTOSYLTRANSFERASE) (UDP-GALACTOSE:BETA-D-GALACTOSYL-1,4-N-AC ...	tradução/modificação	2,12	0,0218
neccin-like 2 (Ndnl2)	transcrição	2,39	0,0967
NEDL1 mRNA for HECT type E3 ubiquitin ligase	proteólise/ubiquitinação	2,60	0,0373
Netrin-G1d	estrutural/reconhecimento	2,58	0,044
neurobeachin, full insert sequence	Tráfego/família de proteínas de ancoragem da ptn kinase A	5,68	0,0674
neurogenin 2 (Neurog2)	transcrição	3,28	0,0357
neuronal pentraxin 2 (Nptx2)	estrutural/adesão celular	3,47	0,0195
neurotrimin (Hnt)	estrutural/adesão celular	-4,83	0,0389
neutrophil cytosolic factor 1 (Ncf1)	metabolismo/leucotrienos	2,65	0,0361
nischarin (Nisch)	sinalização/receptor	2,35	0,07
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100 (Nfkb2)	transcrição/sinalização	2,03	0,0637
nuclear receptor coactivator 6 (Ncoa6)	transcrição/ativação	3,84	0,0336
nucleoporin 210 (Nup210)	transporte/porina	-4,03	0,0941
nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12 (Nudt12)	transcrição	2,57	0,017
olfactomedin 3 (Olfm3), transcript variant B	estrutural/adesão celular	-8,29	0,0011
oogenesis 1 (Oog1)	ciclo celular/biogênese	2,34	0,0786
origin recognition complex, subunit 5-like (S cerevisiae) (Orc5l)	ciclo celular/replicação	2,36	0,0833
oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (Ogdh)	metabolismo/glicólise	2,48	0,0825
palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated (Plunc)	metabolismo/lipídeos	-3,26	0,0073
pancreatic lipase (Pnlip)	metabolismo/lipídeos	2,42	0,0155
paraoxonase 2 (Pon2)	metabolismo/lipídeos	2,41	0,0271

parkin (Park2)	proteólise	-2,05	0,0384
peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1 (Ppil1)	transporte/neurotransmissores	2,73	0,0429
peroxin 2 (Pex2)	sinalização/fator	-2,40	0,0966
peter pan homolog (Drosophila) (Ppan)	ciclo celular	3,19	0,0496
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 gamma (Pip5k1c)	sinalização/biogênese	-3,55	0,0751
phospholipase A2, activating protein (Plaa)	sinalização/fosfolipase	4,46	0,0187
phospholipase C, zeta 1 (Plcz1)	sinalização/fosfolipase	4,11	0,0897
phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole, succinocarboxamide synthetase (Paics)	metabolismo/purina	2,42	0,0762
piccolo (presynaptic cytomatrix protein) (Pclo)	tráfego/excitose	-6,69	0,0308
placental growth factor (Pgf)	sinalização/fator	2,81	0,0699
plasminogen activator, urokinase (Plau)	proteólise	2,19	0,0414
pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 3 (Pscd3)	sinalização/atividade GEF	2,26	0,0699
plectin 1 (Plec1), transcript variant 1	estrutural/filamentos intermediarios	3,06	0,0814
polyglutamine binding protein 1 (Pqbp1)	transcrição	2,07	0,0649
potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 (Kcnma1)	transporte/potássio	-2,12	0,0777
pre-B-cell colony-enhancing factor 1 (Pbef1)	sinalização/adipocitocinas (visfatina)	4,36	0,0096
preferentially expressed antigen in melanoma-like 1 (Pram1)	desconhecido	-4,03	0,073
premature ovarian failure 1B (Pof1b)	ciclo celular/divisão	2,17	0,0977
procollagen, type IV, alpha 2 (Col4a2)	estrutural/adesão celular	4,32	0,0553
procollagen, type V, alpha 1 (Col5a1)	estrutural/adesão celular	2,81	0,0741
programmed cell death 6 interacting protein (Pdc6ip)	sinalização/apoptose	4,23	0,0025
prolactin like protein C delta (Plpcd)	sinalização/fator	2,72	0,0894
proline-rich Gla (G-carboxyglutamic acid) polypeptide 2 (Prrg2)	sinalização/fator	2,34	0,0398
protease, serine, 21 (Prss21)	proteólise	7,45	0,0173
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3 (Pacsin3)	tráfego/reciclagem	2,25	0,0737
protein kinase inhibitor, gamma (Pkig)	sinalização/transdução	2,88	0,0672
protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit (Prkab1)	metabolismo/lipídeos	2,43	0,0625
protein kinase, lysine deficient 4 (Prkwnk4)	sinalização/transdução	5,90	0,0108
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Ptpn11) SHP2	sinalização/transdução	-2,31	0,0562
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (Ptpn13) PTP-BL	sinalização/transdução	2,80	0,0768

PROTEIN-TYROSINE-PHOSPHATASE (EC 3.1.3.48), full insert sequence	sinalização/transdução	3,16	0,0891
protocadherin 8 (Pcdh8)	estrutural/biogênese	2,02	0,0554
purine rich element binding protein B (Purb)	transcrição	-2,37	0,0536
puromycin-sensitive aminopeptidase (Psa)	proteólise	-2,09	0,0953
putative homeodomain transcription factor 2 (Phtf2)	transcrição	2,35	0,0803
RAB3D, member RAS oncogene family (Rab3d)	tráfego/reciclagem	3,14	0,0231
rabphilin 3A (Rph3a)	tráfego/reciclagem	2,63	0,0334
Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6 (Arhgef6)	sinalização/GEF	2,72	0,0197
Rad51 homolog c (S cerevisiae) (Rad51c)	ciclo celular/reparo de DNA	-2,02	0,078
regulator of G-protein signaling 19 interacting protein 1 (Rgs19ip1)	sinalização/fator	2,85	0,0671
resistin (Retn)	sinalização/fator	-2,98	0,0543
retinol dehydrogenase 6 (Rdh6)	metabolismo/lipídeos	2,85	0,0729
retinoschisis 1 homolog (human) (Rs1h)	estrutural/adesão celular	-5,66	0,0952
ribophorin I (Rpn1)	tradução/modificação, glicosilação	3,01	0,0724
ribosomal protein S27a (Rps27a)	tradução	-2,24	0,0588
ring finger protein 103 (Rnf103)	transcrição	2,58	0,0376
ring finger protein 17 (Rnf17)	proteólise/ubiquitinação	3,96	0,0721
roundabout homolog 1 (Drosophila) (Robo1)	sinalização/receptor	2,18	0,0309
roundabout homolog 4 (Drosophila) (Robo4)	sinalização/receptor	2,14	0,0364
sal-like 4 (Drosophila) (Sall4), transcript variant a	transcrição	2,79	0,045
sarcoglycan, alpha (dystrophin-associated glycoprotein) (Sgca)	estrutural/membrana	2,28	0,0671
sarcoglycan, gamma (dystrophin-associated glycoprotein) (Sgcg)	estrutural/membrana	3,75	0,0689
schlafen 1 (Sifn1)	ciclo celular/divisão	2,09	0,0438
SECIS-BINDING PROTEIN 2 homolog [Rattus norvegicus], full insert sequence	tradução	2,40	0,0832
secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin) (Scgb1a1)	sinalização/responsivo a esteróides	-2,29	0,0715
seminal vesicle antigen-like 1 (Sval1)	desconhecido	5,02	0,0381
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 11 (Serp11)	proteólise	-2,38	0,022
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2 (Serp12)	proteólise	3,80	0,0438
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1 (Serp1f1)	proteólise	2,44	0,0843
seven in absentia 1B (Siah1b)	proteólise/ubiquitinação	-5,22	0,0638
signal transducer and activator of transcription 2 (Stat2)	sinalização/transcrição	2,05	0,0654

signal transducer and activator of transcription 3, full insert sequence	sinalização/transcrição	2,23	0,0479
similar to CYSTATIN A (HUMAN);.	proteólise/inibição	2,59	0,0655
similar to D45850 Mouse mRNA for estradiol 17-beta-dehydrogenase (17 HSD)	metabolismo/lipídeos esteróides	-9,36	0,0025
similar to DJ551D24 (SYNAPTONEMAL COMPLEX PROTEIN 2) (FRAGMENT) [Homo sapiens], full insert sequence	ciclo celular	-2,30	0,0542
similar to gb:M28382 Mouse REX-1 mRNA, complete cds (MOUSE);.	transcrição/regulação redox	-8,09	0,027
similar to gb:M60273 Mouse testosterone 16a-hydroxylase, type a gene (MOUSE) (Cytochrome P450 2D9)	metabolismo/lipídeos esteróides	-6,03	0,033
similar to gb:M76131 Mouse elongation factor 2 (MOUSE); EIF2	tradução	2,16	0,07
similar to gb:M86609 TRANS-1,2-DIHYDROBENZENE-1,2-DIOL DEHYDROGENASE (HUMAN);. 3 HSD	metabolismo	2,68	0,0147
similar to gb:U25844 Mus musculus serine proteinase inhibitor (MOUSE);.	proteólise	-2,03	0,07
similar to gb:V00714 Mouse gene for alpha-globin (MOUSE);.	transporte/oxigênio	-2,42	0,0384
similar to Mouse normal c-myc gene and translocated homologue from (MOUSE);.	transcrição	2,66	0,0776
Similar to pogo transposable element with ZNF domain, clone IMAGE:5345892	transcrição	-2,19	0,094
similar to SW:G49B_MOUSE Q64281 MAST CELL SURFACE GLYCOPROTEIN GP49B PRECURSOR. [1] ;.	estrutural/membrana	-2,21	0,0973
similar to SW:N121_RAT P52591 NUCLEAR ENVELOPE PORE MEMBRANE PROTEIN POM 121 ;	estrutural/poro nuclear	-6,62	0,0485
similar to SW:TES2_MOUSE P47226 TESTIN 2 ;.	proteólise	-6,13	0,0989
similar to TR:O01686 O01686 SIMILAR TO OXYSTEROL-BINDING PROTEINS: PARTIAL CDS ;.	metabolismo/lipídeos esteróides	-2,00	0,0934
similar to WP:C16C10.11 CE01491 HYPOTHETICAL 15.4 KD PROTEIN C16C10.11 IN CHROMOSOME III ;.	ciclo celular	3,42	0,0787
similar to Z38118 Mmusculus mRNA for synaptonemal complex protein 1.	ciclo celular	-8,89	0,0285
similar to ZINC FINGER PROTEIN 125 (FRAGMENT) [Mus musculus], full insert sequence	transcrição	-4,38	0,0046
single stranded DNA binding protein 4 (Ssbp4)	ciclo celular/replicação	2,03	0,0979
sirtuin 3 (silent mating type information regulation 2, homolog) 3 (S cerevisiae) (Sirt3)	ciclo celular/cromatina	3,38	0,0184
slit homolog 1 (Drosophila) (Slit1)	ciclo celular/biogênese	5,35	0,0817
small nuclear RNA activating complex, polypeptide 2 (Snape2)	transcrição	3,19	0,0503

smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog (C elegans) (Smu1)	transcrição/processamento	2,81	0,0223
sodium channel, voltage-gated, type III, alpha polypeptide (Scn3a)	transporte	7,11	0,0107
sodium channel, voltage-gated, type V, alpha polypeptide (Scn5a)	transporte	-3,85	0,0304
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1 (Slc17a1)	transporte	2,61	0,0567
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (Slc2a4)	transporte/GLUT4	3,02	0,0708
solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 19 (Slc22a19)	transporte	2,22	0,0897
solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 13 (Slc22a13)	transporte	2,28	0,0692
solute carrier family 26, member 6 (Slc26a6)	transporte/cloreto,bicarbonato	2,15	0,0949
solute carrier family 31, member 2 (Slc31a2)	transporte	2,31	0,0789
solute carrier family 35, member A4 (Slc35a4)	transporte	3,51	0,0413
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14 (Slc6a14)	transporte	2,08	0,0472
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (Slc6a8)	transporte	3,93	0,0078
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 12 (Slc7a12)	transporte	6,19	0,0994
solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 2 (Slc9a3r2)	transporte/sódio,hidrogênio	2,48	0,0984
sorting nexin 11 (Snx11)	tráfego/reciclagem	2,15	0,0567
sorting nexin 5 (Snx5)	tráfego/reciclagem	2,45	0,0685
sperm motility kinase 2 (Smok2(+Balb) gene) strain Balb/c	sinalização/transdução	8,70	0,0347
spindlin (Spin)	ciclo celular/divisão	3,00	0,0343
SPOCK PROTEIN PRECURSOR (TESTICAN) homolog [Mus musculus], full insert sequence	estrutural/adesão celular	3,37	0,0437
squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 2 (Sart2)	estrutural/reconhecimento	2,42	0,0929
stomatin (Epb72)-like 3 (Stoml3)	sinalização/fator	2,30	0,0338
strain C3H/HeN mRNA preferentially expressed in LPS-normoresponsive macrophages	desconhecido	-2,41	0,0739
sulfotransferase family 1B, member 1 (Sult1b1)	metabolismo/lipídeos	2,58	0,0554
superkiller viralicidic activity 2-like (S cerevisiae) (Skiv2l)	tradução	2,60	0,051
suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila), full insert sequence	ciclocelular/separação cromossomos	9,73	0,0019
synaptotagmin-like 1 (Sytl1)	transporte/hidrogênio	2,49	0,0876
T cell receptor antibody gene sequence	sinalização/receptor	3,26	0,0283

TBP-related factor 3 (Trf3)	transcrição	2,36	0,0633
T-cell receptor alpha chain precursor V-J region (TA72) (fragment) homolog [Mus musculus], full insert sequence	sinalização/receptor	2,83	0,0276
T-cell receptor alpha-chain precursor, mRNA	sinalização/receptor	2,32	0,0399
t-complex protein 10a, full insert sequence	desconhecido	2,18	0,0402
t-complex-associated testis expressed 2 (Tcte2)	desconhecido	2,07	0,0346
telomeric repeat binding factor 2 (Terf2)	ciclo celular/cromatina	2,47	0,0711
testis expressed gene 11 (Tex11)	desconhecido	5,79	0,0526
testis expressed gene 12 (Tex12)	desconhecido	-16,21	1,00E-04
thimet oligopeptidase 1 (Thop1)	proteólise	4,00	0,0547
thioredoxin domain containing 5 (Txndc5)	transporte/elétrons	2,26	0,075
thyroid hormone receptor associated protein 4 (Thrap4)	sinalização/fator	2,76	0,062
thyroid hormone receptor associated protein 6 (Thrap6)	sinalização/fator	2,16	0,0952
TRAF family member-associated Nf-kappa B activator, full insert sequence	sinalização/transdução	-6,13	0,0147
transcription elongation factor A (SII)-like 1 (Tceal1)	tradução	2,36	0,0567
transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box (Tcf7l2)	transcrição	-2,64	0,0682
transmembrane 4 superfamily member 5 (Tm4sf5)	estrutural/membrana	2,55	0,087
transmembrane 4 superfamily member 7 (Tm4sf7)	estrutural/membrana	2,56	0,0765
triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (Trem1)	sinalização/receptor	6,81	0,0051
tripartite motif protein 11 (Trim11)	proteólise/ubiquitinação	2,28	0,0818
tripartite motif protein 21 (Trim21)	proteólise/ubiquitinação	2,38	0,0324
tripartite motif protein 23 (Trim23)	proteólise/ubiquitinação	2,29	0,0697
tripartite motif protein 6, full insert sequence	proteólise/ubiquitinação	2,00	0,0424
TSGA10 mRNA	estrutural/mobilidade	-3,76	0,0846
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (Tnfrsf21)	sinalização/receptor	-2,51	0,0297
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8 (Tnfaip8)	sinalização/fator	-3,08	0,0957
tyrosine kinase, non-receptor, 2 (Tnk2)	sinalização/transdução	2,70	0,0846
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 1, related sequence 1 (U2af1-rs1)	transcrição	-2,85	0,0399
U6 small nuclear RNA, full insert sequence	transcrição	-5,03	0,0274
ubiquilin 2 (Ubqln2)	proteólise/ubiquitinação	4,91	0,0241
ubiquitin-activating enzyme E1-like (Ube1l), mRNA	proteólise/ubiquitinação	2,13	0,0796
UDP-glucuronosyltransferase 8 (Ugt8)	metabolismo/lipídeos	2,19	0,0341
UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast), mRNA (cDNA clone IMAGE:5358431)	tradução	-7,93	0,0885
upstream binding transcription factor, RNA polymerase I (Ubtf)	transcrição	2,37	0,09
WD repeat domain 17 (Wdr17)	sinalização	-3,17	0,0303

WEAKLY SIMILAR TO MAJOR SURFACE-LABELED TROPHOZOITE ANTIGEN PRECURSOR homolog [Homo sapiens], full inser	desconhecido	2,57	0,0915
weakly similar to UNCHARACTERIZED HYPOTHALAMUS PROTEIN HT007 [Homo sapiens], full insert sequence	desconhecido	-5,29	0,0975
zinc finger protein 1, Y linked (Zfy1)	transcrição	-3,32	0,0919
zinc finger, DHHC domain containing 5 (Zdhhc5)	transcrição	2,10	0,0791

B- Genes conhecidos diferencialmente expressos 48 horas após a administração do composto quinazolínico

Gene (símbolo)	Categorias	Varição da expressão	p.value
2'-5' oligoadenylate synthetase 1F (Oas1f)	metabolismo/resposta imune	-2,81	0,0049
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A (Htr1a)	sinalização/receptor	-7,76	0,0542
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A (Htr3a)	sinalização/receptor	2,48	0,1000
a disintegrin and metalloprotease domain 25 (testase 2) (Adam25)	proteólise	2,93	0,0558
adrenergic receptor, beta 1 (Adrb1)	sinalização/receptor	-2,60	0,0739
alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 (Agxt211)	metabolismo/aminoácidos	-7,03	0,0317
aldo-keto reductase family 1, member C18 (Akr1c18) (20 HSD)	metabolismo/esteróides	4,54	0,0026
amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin), mRNA (cDNA clone IMAGE:5119213)	transporte	2,28	0,0396
amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 homolog(human) (Als2cr3)	sinalização/transdução	2,79	0,0036
angiogenin, ribonuclease A family, member 3 (Ang3)	sinalização/fator	-2,02	0,0481
anti-polycation monoclonal antibody, Ig light chain variable region mRNA	sinalização/resposta imune	3,19	0,0545
apoptotic protease activating factor 1 (Apaf1)	sinalização	-2,27	0,0049
atonal homolog 1 (Drosophila) (Atoh1)	transcrição	4,18	0,0240
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2 (Atp2b2)	transporte	-2,55	0,0528
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 (Abcc1)	transporte	-2,58	0,0202
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 3 (Abcg3)	transporte	-2,17	0,0590
B lymphoid kinase (Blk)	sinalização/transdução	-2,11	0,0038
brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (Bai1)	sinalização/receptor	-3,82	0,0137
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B (Baz1b)	transcrição/cromatina	-2,41	0,0677
brush border myosin-I (BBM-I) mRNA	proteólise	-2,23	0,0648
C61A-like (C6.1AL)	proteólise	-2,88	0,0884
cadherin 3 (Cdh3)	estrutural/adesão celular	2,56	0,0644
camello-like 5 (Cml5)	estrutural/adesão celular	-3,74	0,0513
carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 3 (Chst3)	estrutural/membrana	3,56	0,0487
Casitas B-lineage lymphoma (Cbl)	proteólise	3,20	0,0630
CEA-related cell adhesion molecule 13 (Ceacam13)	estrutural/adesão celular	3,37	0,0004
chemokine (C-C motif) ligand 28 (Ccl28)	sinalização/fator	4,05	0,0156

chemokine (C-C motif) receptor 6 (Ccr6)	sinalização/receptor	-3,71	0,0576
chemokine-like factor super family 2A (Cklfsf2a)	sinalização/fator	2,36	0,0730
cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal) (Chrn2)	sinalização/receptor	2,27	0,0060
cle, skeletal, receptor tyrosine kinase (Musk)	sinalização/transdução	-2,11	0,0338
Coenzyme A synthase (Coasy)	metabolismo	-3,39	0,0904
complement component 9 (C9)	ciclo celular/citólise	3,06	0,0968
complement component factor i (Cfi)	proteólise	-2,61	0,0575
cystathionine beta-synthase (Cbs), transcript variant 1	metabolismo/aminoácidos	-3,20	0,0729
cysteine proteinase inhibitor (MS2) mRNA sequence	proteólise	-2,08	0,0195
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 39 (Cyp2c39)	metabolismo/xenobióticos	-2,15	0,0937
deiodinase, iodothyronine type III (Dio3)	sinalização/inativação hormônio da tireóide	2,16	0,0910
diaphanous homolog 3 (Drosophila) (Diap3)	transcrição	2,73	0,0369
DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1 (Diras1)	sinalização/GMP	2,48	0,0255
DJ511B243 (KIAA0395 (PROBABLE HOMEBOX PROTEIN)) homolog [Homo sapiens], full insert sequence	transcrição	2,90	0,0607
DNA (cytosine-5)-methyltransferase (Dnmt1) mRNA	transcrição/metilação DNA	-2,20	0,0774
DNA binding protein with his-thr domain (Dbpht1)	transporte/núcleo	6,73	0,0695
DNA segment, Chr 17, ERATO Doi 488, expressed (D17Erd488e)	transcrição	4,00	0,0037
doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1 (Dmrta1)	transcrição	2,00	0,0717
dual specificity phosphatase 13 (Dusp13)	sinalização/transdução	2,82	0,0387
dual specificity phosphatase 9 (Dusp9)	sinalização/transdução	-2,71	0,0694
E74-like factor 5 (Elf5)	transcrição	4,64	0,0430
EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 4 (Emr4)	sinalização/receptor	3,93	0,0406
elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3 (Elov13)	metabolismo/lipídeos	-2,37	0,0579
EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 1A (EIF-1A) homolog (EIF-4C) [Mus musculus], full insert sequence	tradução	-2,34	0,0908
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (Ercc2)	ciclo celular/reparo	2,41	0,0061
experimental autoimmune prostatitis antigen 2 (Eapa2)	sinalização/resposta imune	3,10	0,0077
fibrinogen, B beta polypeptide (Fgb)	sinalização/fator	2,13	0,0669
fibroblast growth factor 23 (Fgf23)	sinalização/fator	2,31	0,0928
fibroblast growth factor 4 (Fgf4)	sinalização/fator	2,38	0,0025

FMS-like tyrosine kinase 1 (Flt1)	sinalização/transdução	-2,78	0,0422
folliculin (Fst)	sinalização/fator	2,06	0,0080
G protein-coupled receptor 61 (Gpr61)	sinalização/receptor	11,22	0,0034
G protein-coupled receptor 73 (Gpr73)	sinalização/receptor	-2,15	0,0819
Gag polyprotein {Mus musculus}, full insert sequence	estrutural/membrana	-2,09	0,0069
gastrulation brain homeobox 1 (Gbx1)	transcrição	2,52	0,0780
gene model 316, (NCBI) (Gm316)	unknown	-2,31	0,0491
gene rich cluster, C9 gene (Grcc9)	sinalização/transdução	-2,03	0,0039
glycine decarboxylase (Gldc)	metabolismo/aminoácidos	-2,35	0,0476
granule cell antiserum positive 8, full insert sequence	sinalização/resposta imune	2,81	0,0678
granzyme F (Gzmf)	proteólise	3,32	0,0030
HEAT SHOCK PROTEIN HSP 90-BETA	sinalização/indução NO síntese	2,30	0,0209
Hedgehog-interacting protein (Hhip)	sinalização	-3,03	0,0847
hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex (Hba-x)	transporte/oxigênio	3,75	0,0018
histamine receptor H 1 (Hrh1)	sinalização/receptor	-2,16	0,0559
HIV-1 tat interactive protein, homolog (human) (Htatip)	transcrição	-2,52	0,0249
homeo box A10 (Hoxa10)	transcrição	2,09	0,0672
homogentisate 1, 2-dioxygenase (Hgd)	metabolismo/tirosina	2,35	0,0065
hybridoma 8D12 anti-DNA immunoglobulin heavy chain variable region mRNA	sinalização/resposta imune	2,28	0,0855
hypothetical 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily containing protein, full insert sequence	ciclo celular/reparo	2,70	0,0628
hypothetical AMP-dependent synthetase and ligase containing protein, full insert sequence	metabolismo	3,00	0,0314
hypothetical Fibronectin type III domain containing protein, full insert sequence	estrutural/matriz	3,07	0,0383
hypothetical Initiation factor IF2/eIF5b, domain 3 structure containing protein, full insert sequence	tradução	3,14	0,0023
hypothetical Integral membrane protein, DUF6 containing protein, full insert sequence	estrutural/membrana	2,01	0,0676
hypothetical Major histocompatibility complex protein, Class I containing protein, full insert sequence	sinalização/resposta imune	-2,86	0,0844
hypothetical Metallo-dependent hydrolases structure containing protein, full insert sequence	desconhecido	2,26	0,0263
hypothetical Serine-rich region containing protein, full insert sequence	desconhecido	-2,02	0,0509
hypothetical Tetratricopeptide repeat (TPR) structure containing protein, full insert sequence	desconhecido	-2,19	0,0298

Ig unproductively rearranged kappa-chain VJ5C mRNA from plasmacytoma S107C	sinalização/resposta imune	3,61	0,0928
inducible T-cell co-stimulator (Icos)	sinalização/resposta imune	-2,63	0,0351
interleukin 17 (Il17)	sinalização/resposta imune	-2,62	0,0048
interleukin 2 (Il2)	sinalização/resposta imune	3,12	0,0621
interleukin 9 (Il9)	sinalização/resposta imune	-2,36	0,0198
kallikrein 11 (Klk11)	proteólise	2,52	0,0274
keratin complex 2, basic, gene 6b (Krt2-6b)	estrutural/citoesqueleto	2,07	0,0687
keratin complex-1, acidic, gene C29 (Krt1-c29)	estrutural/citoesqueleto	-2,05	0,0190
KERATIN-ASSOCIATED PROTEIN 163 homolog [Mus musculus], full insert sequence	estrutural/matriz	2,01	0,0586
killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 15 (Klra15)	sinalização/resposta imune	3,45	0,0084
killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 19 (Klra19)	sinalização/resposta imune	2,18	0,0993
KINASE-LIKE DOMAIN CONTAINING SOLUBLE GUANYLYL CYCLASE (EC 46.1.2) (48 KDA CHAIN) (KSGC) homolog [Rattus norvegicus], full insert sequence	sinalização/GMP	-2,27	0,0756
leucine zipper protein 1 (Luzp1)	desconhecido	2,63	0,0928
low density lipoprotein receptor (Ldlr)	sinalização/receptor	-4,11	0,0312
matrix metalloproteinase 1b (interstitial collagenase) (Mmp1b)	proteólise	-2,97	0,0560
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (Ms4a3)	sinalização/receptor	-2,13	0,0404
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 5 (Ms4a5)	sinalização/receptor	4,10	0,0158
metal response element binding transcription factor 1 (Mtf1)	transcrição	-2,28	0,0445
mitogen activated protein kinase binding protein 1 (Mapkbp1)	sinalização/transdução	2,05	0,0689
mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2 (Mapk8ip2)	sinalização/transdução	-2,66	0,0085
Mmusculus mRNA for mouse hair acidic 3	estrutural/citoesqueleto	2,27	0,0115
Moloney sarcoma oncogene (Mos)	ciclo celular	-4,02	0,0587
Mouse mRNA for ubiquitin (MOUSE);.	Proteólise	2,03	0,0155
mRNA similar to ADP-ribosylation-like 4 (cDNA clone MGC:5774 IMAGE:3599701)	tráfego	-2,65	0,0975
mRNA similar to tripartite motif-containing 15 (cDNA clone MGC:28593 IMAGE:4215801)	proteólise	4,76	0,0800
mucin glycoprotein MUC3 mRNA	estrutural/matriz	2,11	0,0296

myeloperoxidase (Mpo)	metabolismo/peroxidase	2,15	0,0679
N-acetylglutamate synthase (Nags)	sinalização/receptor	4,66	0,0221
neurexophilin 1 (Nxph1)	sinalização/fator	2,38	0,0531
neurexophilin 3 (Nxph3)	sinalização/fator	-2,03	0,0283
neuromedin U receptor 2 (Nmur2)	sinalização/receptor	2,22	0,0296
neuronal pentraxin 2 (Nptx2)	estrutural/adesão celular	2,02	0,0572
nicastrin (Ncstn)	tradução/modificação	-2,56	0,0617
N-myc (and STAT) interactor (Nmi)	transcrição	-2,44	0,0301
non-selective cation channel 1 (Nscn1)	transporte/cátions	2,26	0,0639
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1)	sinalização/receptor	-2,00	0,0979
one cut domain, family member 1 (Onecut1)	transcrição	2,59	0,0191
ornithine transcarbamylase (Otc)	metabolismo/aminoácidos	3,09	0,0306
outer dense fiber of sperm tails 4 (Odf4)	estrutural/citoesqueleto	3,27	0,0577
pancreatitis-associated protein (Pap)	estrutural/adesão celular	-3,20	0,0611
phosphodiesterase 5A, cGMP-specific (Pde5a)	sinalização/GMP	-3,07	0,0875
phospholipase C, zeta 1 (Plcz1)	sinalização/transdução	2,34	0,0125
polyamine modulated factor 1 binding protein 1 (Pmfbp1)	ciclo celular/divisão	-2,32	0,0804
polymeric immunoglobulin receptor (Pigr)	sinalização/receptor	-2,18	0,0322
potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3 (Kcna3)	transporte	-2,10	0,0213
POU domain, class 4, transcription factor 3 (Pou4f3)	transcrição	2,48	0,0599
prestin (motor protein) (Pres)	estrutural/citoesqueleto	2,24	0,0256
product:10-FORMYLTETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE (EC 15.1.6) (10-FTHFDH) (FBP-CI) homolog [Rattus norvegicus], full insert sequence	metabolismo	2,24	0,0932
protamine 3 (Prm3)	sinalização/fator	-2,57	0,0244
PUTATIVE NUCLEAR PROTEIN homolog [Mus caroli], full insert sequence	transcrição	-2,60	0,0825
regenerating islet-derived 1 (Reg1)	estrutural/adesão celular	2,95	0,0820
regulated endocrine-specific protein 18 (Resp18)	sinalização/fator	5,20	0,0077
ring finger protein 35 (Rnf35)	proteólise	2,18	0,0743
SAM pointed domain containing ets transcription factor (Spdef)	transcrição	2,48	0,0935
SEC14-like 2 (S cerevisiae) (Sec14l2)	transcrição	2,29	0,0050
seminal vesicle secretion 3 (Svs3)	sinalização/fator	-2,29	0,0260
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10 (Serpinb10)	proteólise	2,27	0,0503
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 3c (serpinb3c)	proteólise	3,40	0,0149

serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 9e (Serpib9e)	proteólise	3,06	0,0553
sialidase 4 (Neu4-pending), mRNA	estrutural/membrana	2,79	0,0135
similar to 90 KDA HEAT-SHOCK PROTEIN (FRAGMENT) [Scylliorhinus torazame]	sinalização/indução NO sintase	2,56	0,0023
similar to ALPHA-AMYLASE, PANCREATIC PRECURSOR ;,	metabolismo/carboidratos	-2,19	0,0294
similar to CARBOXYPEPTIDASE, VITELLOGENIC-LIKE [Homo sapiens], full insert sequence	proteólise	7,95	0,0044
similar to CELLULAR NUCLEIC ACID BINDING PROTEIN (CNBP) [Mus musculus], full insert sequence	transcrição	2,34	0,0270
similar to DJ885L79.1 (DEATH ASSOCIATED TRANSCRIPTION FACTOR 1 (CONTAINS KIAA0333), ISOFORM 1) (FRAGMENT) [Homo sapiens], full insert sequence	transcrição	-3,00	0,0833
similar to DNA-BINDING PROTEIN [Rattus norvegicus], full insert sequence	transcrição	2,62	0,0250
similar to gb:K02054 GASTRIN-RELEASING PEPTIDE II PRECURSOR (HUMAN);,	sinalização/fator	-4,20	0,0481
similar to gb:M33226 Mus musculus cryptdin-related (MOUSE);,	metabolismo/xenobióticos	2,08	0,0154
similar to gb:M60273 Mouse testosterone 16a-hydroxylase, type a gene (Cytochrome P450 2D9)	metabolismo/lipídeos	2,18	0,0483
similar to gb:U07425 Mus musculus BALB/c heparin cofactor II precursor (MOUSE);,	estrutural/membrana	3,04	0,0659
similar to gb:X90829 M.musculus mRNA for transcription factor, Lbx1 (MOUSE);,	transcrição	2,22	0,0985
similar to gb:Z46757 M.musculus mRNA for high mobility group 2 protein (MOUSE);,	ciclo celular/replicação	-2,42	0,0367
similar to HYPOTHETICAL 559 KDA PROTEIN EEED8.6 IN CHROMOSOME II [Caenorhabditis elegans]	desconhecido	2,18	0,0133
similar to NM_009145 Mus musculus stromal cell derived factor receptor 1 (Sdfr1)	sinalização/receptor	3,90	0,0179
similar to RH37427P [Drosophila melanogaster], full insert sequence	tráfego	2,16	0,0705
similar to SW:ARLX_RAT P51646 ADP-RIBOSYLATION FACTOR-LIKE PROTEIN 5. Arf15	tráfego	3,65	0,0149
similar to SW:FRIH_CHICK P08267 FERRITIN HEAVY CHAIN	transporte	3,68	0,0096
similar to SW:TES2_MOUSE P47226 TESTIN 2 ;,	proteólise	2,06	0,0891

similar to SW:TVA2_MOUSE P01739 T-CELL RECEPTOR ALPHA CHAIN V REGION 2B4 PRECURSOR. ;.	sinalização/receptor	-2,57	0,0289
similar to TR:O88860 O88860 CHLORIDE CHANNEL CACC.	transporte	2,74	0,0547
similar to TR:O93342 O93342 MATRIX METALLOPROTEINASE	proteólise	2,13	0,0658
similar to U1 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN C (U1-C) [Mus musculus], full insert sequence	transcrição	2,01	0,0321
similar to ZINC FINGER PROTEIN 11 (FRAGMENT) [Rattus norvegicus], full insert sequence	transcrição	-2,45	0,0069
SLIT and NTRK-like family, member 3 (Slitrk3)	ciclo celular	2,22	0,0208
small optic lobes homolog (Drosophila), full insert sequence	proteólise	-4,85	0,0573
small proline rich-like 10 (Sprr110)	estrutural/citoesqueleto	-2,97	0,0356
solute carrier family 12, member 1 (Slc12a1), transcript variant 1	transporte	2,58	0,0269
solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2 (Slc13a2)	transporte/oxigênio	4,91	0,0690
solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4 (Slc22a4)	transporte	-3,51	0,0836
solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4 (Slc4a4)	transporte	-2,17	0,0278
solute carrier organic anion transporter family, member 1a1 (Slco1a1)	transporte	2,31	0,0193
spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 3 (Speer3)	desconhecido	3,45	0,0288
SRY-box containing gene 2 (Sox2)	transcrição	-2,69	0,0410
SSXB6 protein (Ssxb6) mRNA	transcrição	-2,13	0,0520
START domain containing 7 (Stard7)	transporte/lipídeos	3,59	0,0759
stem cell growth factor (Scgf)	sinalização/fator	2,43	0,0451
stromal cell derived factor receptor 2, full insert sequence	sinalização/receptor	-2,30	0,0237
stromal interaction molecule 1 (Stim1)	estrutural/adesão celular	-2,20	0,0716
subcommissural organ spondin (Scospondin)	estrutural/adesão celular	-3,67	0,0653
sulfotransferase family 4A, member 1 (Sult4a1)	metabolismo	2,68	0,0297
suppressor of fused homolog (Drosophila) (Sufu)	sinalização/via hedgehog	2,12	0,0357
survivor of motor neuron protein interacting protein 1, full insert sequence	transcrição/splicing	-3,14	0,0931
taube nuss (Tbn)	ciclo celular/adipócitos	-3,57	0,0041
TBC1 domain family, member 4 (Tbc1d4)	sinalização/transdução	-2,30	0,0727

T-cell receptor alpha chain precursor V-J region (TA72) (fragment) homolog [Mus musculus], full insert sequence	sinalização/receptor	-2,51	0,0679
t-complex-associated testis expressed 2 (Tcte2)	desconhecido	2,41	0,0244
tessp-1 mRNA for testis serine protease-1	proteólise	-4,34	0,0213
testis serine protease 2 (Tessp2)	proteólise	-2,12	0,0360
TRANSCRIPTION FACTOR NRF homolog [Homo sapiens], full insert sequence	transcrição	-3,80	0,0613
transglutaminase 3, E polypeptide (Tgm3)	metabolismo	-2,04	0,0320
trophinin (Tro)	estrutural/adesão celular	-2,15	0,0058
tubulointerstitial nephritis antigen (Tinag)	proteólise	-3,56	0,0236
tyrosinase-related protein 1 (Tyrp1), mRNA	metabolismo/tirosina	2,43	0,0569
UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide A1 (Ugt2a1)	metabolismo/lipídeos	2,14	0,0544
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5 (B3galt5)	tradução/modificação, glicosilação	2,96	0,0109
UDP-GALNAC: POLYPEPTIDE N-ACETYLGLACTOSAMINYLTRANSFERASE homolog [Homo sapiens], full insert sequence	tráfego	-2,37	0,0767
UDP-glucuronosyltransferase 8 (Ugt8)	metabolismo/lipídeos	2,89	0,0807
urocortin II mRNA	sinalização/fator	2,32	0,0166
xylosyltransferase 1 (Xylt1)	metabolismo/biossíntese de proteoglicanas	2,12	0,0561
zinc finger protein 354C (Zfp354c)	transcrição	-2,25	0,0465
zonadhesin (Zan)	estrutural/adesão celular	-2,52	0,0607

A- Lista das ESTs (Expressed Sequence Tags) diferencialmente expressas 24 horas após a administração do composto quinazolínico

Expressão: classificação das ESTs entre aquelas reprimidas (redução de sua expressão) e induzidas (aumento de sua expressão) após o tratamento pela quinazolina DMA. Variação da expressão: valores representativos da amplitude da variação (valores positivos, indução gênica; valores negativos, repressão gênica). P.value: significância estatística (corte em $p < 0.1$). Identificação: a nomenclatura das ESTs informa o tecido utilizado para a confecção das bibliotecas de cDNA. Os resultados estão classificados em função dos principais sistemas fisiológicos de mamíferos a que pertencem os tecidos a partir dos quais as ESTs foram originalmente identificadas.

Expressão	Variação da expressão	p.value	Identificação
Tecido Adiposo			
Reprimido	-2,02	0,086	RIKEN 4 days neonate male adipose cDNA clone B430105K04 3'
Sistema Cardiovascular			
Reprimido	-5,85	0,027	vw70b07x1 Stratagene mouse heart (#937316) cDNA clone IMAGE:1260277 3'.
	-3,25	0,024	RIKEN 16 days neonate heart cDNA clone D830013J02 3'
	-2,00	0,060	adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530027112 product:unknown EST, full insert sequence
Induzido	2,65	0,042	adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530021N07 product:hypothetical protein, full insert sequence
	3,48	0,039	adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530080O08 product:unclassifiable, full insert sequence
Sistema Digestivo			
Reprimido	-3,87	0,028	vo29f01r1 Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 cDNA clone IMAGE:1051321 5'.
Induzido	2,65	0,033	RIKEN adult male colon cDNA clone 9030008E09 3'
	2,80	0,081	vt37d07x1 Barstead mouse proximal colon MPLRB6 cDNA clone IMAGE:1165261 3'.
	2,93	0,060	uc72a10x1 Sugano mouse liver mlia cDNA clone IMAGE:1431162 3'.

Tecidos Embrionários			
Reprimido	-9,07	0,006	vt04e09r1 Barstead mouse myotubes MPLRB5 cDNA clone IMAGE:1162120 5'.
	-5,85	0,049	10 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:2610027F03 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-5,62	0,056	12 days embryo spinal ganglion cDNA, RIKEN clone:D130017C21 product:unclassifiable, full insert sequence
	-5,29	0,098	18-day embryo whole body cDNA, RIKEN clone:1110001A23 product:weakly similar to UNCHARACTERIZED HYPOTHALAMUS PROTEIN HT007 [Homo sapiens], full insert sequence
	-4,99	0,056	RIKEN 7 days embryo cDNA clone C430002N04 3'
	-4,69	0,037	RIKEN 145 days embryo RP+/+ Rathke's pouches cDNA clone K720034J06 3'
	-4,64	0,039	12 days embryo spinal ganglion cDNA, RIKEN clone:D130062H10 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,11	0,029	vd02a10x1 Knowles Solter mouse 2 cell cDNA clone IMAGE:791322 3'.
	-3,97	0,029	12 days embryo body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN clone:9430010H01 product:unknown EST, full insert sequence
	-3,91	0,066	RIKEN 145 days embryo RP+/+ Rathke's pouches cDNA clone K720013F05 5'
	-3,90	0,098	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130093J22 3'
	-3,15	0,036	RIKEN 17 days pregnant adult female amnion cDNA clone I920066M09 3'
	-3,13	0,029	A0229A06-5 NIA Mouse Embryonic Germ Cell cDNA Library (Long, subtracted) cDNA clone NIA:A0229A06 IMAGE:30731141 5'
	-2,87	0,050	sixteen-cell-embryo cDNA cDNA clone J0937E01 3'
	-2,77	0,033	RIKEN 2 cells egg cDNA clone B020009O17 3'
	-2,73	0,072	RIKEN 8 cells embryo cDNA clone E860036F21 3'
	-2,64	0,052	13 days embryo lung cDNA, RIKEN clone:D430021L16 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,57	0,066	C88050 Mouse fertilized one-cell-embryo cDNA cDNA clone J0255H06 3'
	-2,41	0,064	15 days embryo head cDNA, RIKEN clone:D930050A07 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,28	0,029	B0649C04-5 NIA Mouse Blastocyst cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0649C04 IMAGE:30452955 5'
	-2,28	0,038	RIKEN 12 days embryo spinal ganglion cDNA clone D130067G08 3'
	-2,27	0,085	A0244H09-5 NIA Mouse Embryonic Germ Cell cDNA Library (Long, subtracted) cDNA clone NIA:A0244H09 IMAGE:30732668 5'
	-2,27	0,092	12 days embryo female mullerian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN clone:6820434L06 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,25	0,089	RIKEN 8 cells embryo cDNA clone E860127J16 3'
-2,17	0,064	11 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:2700007P21 product:DJ299F111 (SIMILAR TO D.MELANOGASTER PROTEIN (CG14464)) (FRAGMENT) homolog [Homo sapiens], full insert sequence	

	-2,15	0,077	B0195C06-5N NIA Mouse Neural Stem Cell (Differentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0195C06 IMAGE:30102941 5'
	-2,13	0,064	RIKEN 13 days embryo male testis cDNA clone 6030455D22 3'
	-2,11	0,057	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:5730588L14 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,07	0,039	RIKEN 12 days embryo spinal ganglion cDNA clone D130051J19 3'
	-2,06	0,061	RIKEN blastocyst cDNA clone IIC0009C06 5'
	-2,06	0,036	RIKEN 12 days embryo spinal cord cDNA clone C530014E14 3'
	-2,05	0,079	RIKEN 12 days embryo spinal cord cDNA clone C530029J10 5'
	-2,02	0,099	RIKEN 13 days embryo forelimb cDNA clone 5930422O12 3'
	-2,01	0,099	C88019 C88019 Mouse fertilized one-cell-embryo cDNA cDNA clone J0255E03 3'
	-2,01	0,100	C79684 C79684 Mouse 3.5-dpc blastocyst cDNA cDNA clone J0070E01 3'
Induzido	2,01	0,083	RIKEN 1 cell embryo cDNA clone I0C0026H18 3'
	2,02	0,063	95 days embryo parthenogenote cDNA, RIKEN clone:B130063M24 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,02	0,078	16 days embryo head cDNA, RIKEN clone:C130061L11 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,08	0,076	11 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:2700046A07 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,11	0,092	RIKEN 13 days embryo stomach cDNA clone D530007F08 3'
	2,12	0,090	RIKEN 8 days embryo cDNA clone 5730590K13 3'
	2,17	0,031	RIKEN 13 days embryo stomach cDNA clone D530032E21 3'
	2,17	0,082	13 days embryo forelimb cDNA, RIKEN clone:5930427J20 product:unknown EST, full insert sequence
	2,19	0,029	B0185F05-3N NIA Mouse Neural Stem Cell (Differentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0185F05 IMAGE:30102016 3'
	2,23	0,075	adult retina cDNA, RIKEN clone:A930009L07 product:unknown EST, full insert sequence
	2,23	0,088	12 days embryo spinal cord cDNA, RIKEN clone:C530050P18 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,26	0,053	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130097D13 3'
	2,26	0,029	B0728A04-5 NIA Mouse Embryonic Germ Cell cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0728A04 IMAGE:30460515 5'
	2,26	0,092	me46f09y1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 cDNA clone IMAGE:390569 5'.
	2,33	0,083	12 days embryo spinal ganglion cDNA, RIKEN clone:D130006C04 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,39	0,060	RIKEN 12 days embryo whole body cDNA clone E970019M16 3'
	2,43	0,059	RIKEN 10, 11 days embryo whole body cDNA clone 2810017D21 5'

2,54	0,038	RIKEN 15 days embryo male testis cDNA clone 8030451I23 3'
2,54	0,054	C0807B09-3 NIA Mouse Blastocyst cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:C0807B09 IMAGE:30025652 3'
2,56	0,028	C78853 Mouse 35-dpc blastocyst cDNA cDNA clone J0056D05 3'.
2,56	0,029	RIKEN 13 days embryo stomach cDNA clone D530032D18 3'
2,60	0,049	vh80h04.r1 Knowles Solter mouse E6 5d whole embryo cDNA clone IMAGE:893335 3'
2,61	0,029	RIKEN 15 days embryo head cDNA clone 4022418K01 3'
2,61	0,044	RIKEN 7 days embryo cDNA clone C430009D15 3'
2,63	0,053	RIKEN blastocyst cDNA clone IIC0003A13 3'
2,66	0,056	B0693D06-5 NIA Mouse Blastocyst cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0693D06 IMAGE:30457193 5'
2,66	0,061	vr23b02y1 Barstead mouse myotubes MPLRB5 cDNA clone IMAGE:1121451 5'.
2,69	0,084	RIKEN 13 days embryo forelimb cDNA clone 5930404P18 3'
2,69	0,083	16 days embryo head cDNA, RIKEN clone:C130075O13 product:unclassifiable, full insert sequence
2,70	0,064	16 days embryo head cDNA, RIKEN clone:C130023C23 product:unknown EST, full insert sequence
2,72	0,024	13 days embryo stomach cDNA, RIKEN clone:D530006J06 product:unknown EST, full insert sequence
2,72	0,075	RIKEN in vitro fertilized eggs cDNA clone 7420450I12 5'
2,80	0,028	12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN clone:D230035J18 product:unknown EST, full insert sequence
2,87	0,055	vk84a10x1 Knowles Solter mouse 2 cell cDNA clone IMAGE:961338 3'.
2,96	0,015	C0837D03-5N NIA Mouse Blastocyst cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:C0837D03 IMAGE:30028550 5'
2,99	0,085	vc88h03x1 Ko mouse embryo 11 5dpc cDNA clone IMAGE:790133 3'.
3,14	0,076	vj85h02x1 Knowles Solter mouse 2 cell cDNA clone IMAGE:943923 3' similar to TR:Q24283 Q24283 CRN MRNA. ;.
3,21	0,077	RIKEN 8 cells embryo cDNA clone E860039G06 3'
3,33	0,046	18-day embryo whole body cDNA, RIKEN clone:1110003O08 product:hypothetical protein, full insert sequence
3,39	0,030	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130058F07 3'
3,40	0,094	17 days embryo head cDNA, RIKEN clone:3321401G04 product:hypothetical protein, full insert sequence
3,54	0,019	RIKEN 12 days embryo male wolffian duct cDNA clone 6720469B08 3'
3,61	0,019	vm68c10s1 Knowles Solter mouse 2 cell cDNA clone IMAGE:1003410 5' similar to TR:Q13483 Q13483 HYPOTHETICAL PROTEIN ;.
3,73	0,023	C0807C06-5N NIA Mouse Blastocyst cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:C0807C06 IMAGE:30025661 5'

	3,99	0,042	RIKEN 13 days embryo heart cDNA clone D330039J17 5'
	4,01	0,035	RIKEN 2 cells egg cDNA clone B020032O13 5'
	5,68	0,067	16 days embryo head cDNA, RIKEN clone:C130038A22 product:neurobeachin, full insert sequence
	5,80	0,080	C0111C11-3 NIA Mouse E7.5 Extraembryonic Portion cDNA Library cDNA clone C0111C11 3'
	8,39	0,001	RIKEN 12 days embryo head cDNA clone 3022402B16 3'
	9,97	0,036	RIKEN 13 days embryo heart cDNA clone D330012I04 3' similar to M55512 Mouse Wilms' tumor mRNA
Sistema Endócrino			
Reprimido	-2,93	0,086	adult male adrenal gland cDNA, RIKEN clone:B330012G18 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,81	0,092	vw28d03r1 Soares_mammary_gland_NbMMG cDNA clone IMAGE:1245125 5'.
	-2,24	0,091	602117575T1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:3468691 3'
Induzido	2,06	0,075	RIKEN mammary gland RCB-0527 Jyg-MC(B) cDNA cDNA clone G930017J04 5'
	2,37	0,082	RIKEN mammary gland RCB-0526 Jyg-MC(A) cDNA cDNA clone G830024L14 3'
	2,62	0,067	10 day old male pancreas cDNA, RIKEN clone:1810006J02 product:unknown EST, full insert sequence
	2,88	0,078	Soares_mammary_gland_NbMMG cDNA clone IMAGp998N192637 ; IMAGE:1055058
	3,05	0,025	uf85c05y1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:1528904 5'.
	3,26	0,041	602117256F2 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:3468540 5'
	3,42	0,079	uf80b11x1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:1528413 3' similar to WP:C16C10.11 CE01491 HYPOTHETICAL 15.4 KD PROTEIN C16C10.11 IN CHROMOSOME III ;.
Sistema Excretor			
Reprimido	-3,63	0,042	0 day neonate kidney cDNA, RIKEN clone:D630038F08 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,64	0,073	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN clone:9530075L08 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,58	0,094	ui14g08.r1 Soares mouse urogenital ridge NMUR cDNA clone IMAGE:1851326 5'
	-2,43	0,091	uc90c10x1 Sugano mouse kidney mkia cDNA clone IMAGE:1432914 3' similar to TR:Q63742 Q63742 P34 PROTEIN. ;.
	-2,34	0,064	RIKEN kidney CCL-142 RAG cDNA cDNA clone G431001B06 3'
	-2,28	0,020	L0909E11-3 NIA Mouse Newborn Kidney cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:L0909E11 IMAGE:30000922 3'

Induzido	2,00	0,070	uk54h10x1 Sugano mouse kidney mkia cDNA clone IMAGE:1972867 3'.
	2,85	0,048	um06h07x1 Sugano mouse kidney mkia cDNA clone IMAGE:2182333 3'.
	3,28	0,034	va27b11y1 GuayWoodford Beier mouse kidney day 7 cDNA clone IMAGE:732573 5'.
	3,39	0,055	RIKEN 0 day neonate kidney cDNA clone D630050G19 3'
	3,92	0,056	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN clone:9530056H10 product:unclassifiable, full insert sequence
	4,27	0,067	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN clone:9530047P18 product:unclassifiable, full insert sequence
	8,52	0,045	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN clone:9530050B10 product:unknown EST, full insert sequence
Hematopoiесе			
Reprimido	-8,21	0,042	K0530C10-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0530C10 IMAGE:30066753 5'
	-4,28	0,043	K0507A03-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0507A03 IMAGE:30064514 3'
	-3,06	0,049	K0131D05-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1-) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0131D05 IMAGE:30042376 3'
	-2,56	0,066	K0732C02-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit-/Sca-1-) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0732C02 IMAGE:30076633 5'
	-2,12	0,032	vb98d05y1 Soares mouse lymph node NbMLN cDNA clone IMAGE:765033 5'.
	-2,11	0,084	K0508H03-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0508H03 IMAGE:30064694 3'
Induzido	2,08	0,032	K0543D11-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0543D11 IMAGE:30068014 3'
	2,11	0,052	K0545G10-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0545G10 IMAGE:30068241 5'
	2,15	0,036	LL2in14345T7 Hematopoietic Stem Cell Subtracted Library Mus musculus cDNA 5'
	2,25	0,044	K0542A06-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0542A06 IMAGE:30067877 5'
	2,54	0,036	K0749B07-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit-/Sca-1-) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0749B07 IMAGE:30078258 5'
	2,75	0,072	K0932B09-5N NIA Mouse Neural Stem Cell (Undifferentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0932B09 IMAGE:30087284 5'
	2,79	0,042	RIKEN bone marrow macrophage cDNA clone I830167H14 3'
	2,85	0,029	K0741E06-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit-/Sca-1-) cDNA Library (Long) cDNA clone K0741E06 3'
	2,96	0,072	mu71a10y1 Soares mouse lymph node NbMLN cDNA clone IMAGE:644826 5'.
	3,04	0,064	K0605C04-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit-/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0605C04 IMAGE:30069243 5'

	3,08	0,096	K0951E11-5N NIA Mouse Neural Stem Cell (Undifferentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0951E11 IMAGE:30089146 5'
	4,43	0,053	K0634E04-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit-/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0634E04 IMAGE:30072051 3'
	5,15	0,054	RIKEN bone marrow macrophage cDNA clone I830004A06 5'
	5,79	0,085	K0515G06-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0515G06 IMAGE:30065357 5'
Sistema imune			
Reprimido	-9,42	0,045	RIKEN 0 day neonate thymus cDNA clone A430062F16 5'
	-7,70	0,037	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630079M18 product:unknown EST, full insert sequence
	-6,24	0,019	RIKEN adult male thymus cDNA clone 5830450M14 5'
	-6,09	0,075	RIKEN B6-derived CD11 +ve dendritic cells cDNA clone F730111K15 3'
	-4,02	0,043	vz51e10r1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:1330026 5'.
	-3,13	0,026	2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN clone:E430026C01 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,98	0,089	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130022E21 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,78	0,012	RIKEN activated spleen cDNA clone F830119O06 3'
	-2,56	0,038	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130029O08 3'
	-2,36	0,015	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130093P22 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,36	0,095	RIKEN B6-derived CD11 +ve dendritic cells cDNA clone F730031I12 5'
	-2,32	0,062	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130081B05 3'
	-2,30	0,091	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130013F22 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,20	0,084	RIKEN 3 days neonate thymus cDNA clone A630054I15 3'
	-2,19	0,058	vm50h11y1 Stratagene mouse Tcell 937311 cDNA clone IMAGE:1001733 5'.
	-2,15	0,039	activated spleen cDNA, RIKEN clone:F830004A15 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,09	0,034	RIKEN NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA clone F630016F01 5'
	-2,07	0,081	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630080J18 product:unknown EST, full insert sequence
-2,03	0,062	RIKEN activated spleen cDNA clone F830017O19 5'	
-2,01	0,029	v122f09x1 Stratagene mouse Tcell 937311 cDNA clone IMAGE:973001 3'.	

Induzido	2,00	0,062	activated spleen cDNA, RIKEN clone:F830009C11 product:unknown EST, full insert sequence
	2,07	0,051	2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN clone:E430016M24 product:unknown EST, full insert sequence
	2,15	0,063	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130048F23 product:unknown EST, full insert sequence
	2,20	0,071	RIKEN thymus lymphocyte cDNA clone I6C0021A09 3'
	2,28	0,083	mq60e07x1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:583140 3'.
	2,29	0,046	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A430080G17 product:unknown EST, full insert sequence
	2,29	0,026	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A430077D06 product:unknown EST, full insert sequence
	2,33	0,039	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A430105J06 product:unknown EST, full insert sequence
	2,35	0,066	RIKEN 2 days neonate thymus thymic cells cDNA clone C920007C03 5'
	2,59	0,035	RIKEN 3 days neonate thymus cDNA clone A630058O09 3'
	2,63	0,031	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130012M23 product:unknown EST, full insert sequence
	2,63	0,053	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630064P09 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,68	0,054	RIKEN 3 days neonate thymus cDNA clone A630073M21 5'
	2,83	0,028	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130088N11 product:T-cell receptor alpha chain precursor V-J region (TA72) (fragment) homolog [Mus musculus], full insert sequence
	2,90	0,065	ub41d12r1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:1380311 5'.
	2,91	0,051	RIKEN B6-derived CD11 +ve dendritic cells cDNA clone F730040C13 3'
	2,93	0,015	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130077L17 product:unknown EST, full insert sequence
	2,97	0,013	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130050C04 3'
	3,01	0,045	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630033C13 product:unclassifiable, full insert sequence
	3,03	0,033	adult male thymus cDNA, RIKEN clone:5830471O09 product:unclassifiable, full insert sequence
	3,03	0,071	RIKEN 3 days neonate thymus cDNA clone A630038P11 3'
	3,14	0,055	RIKEN activated spleen cDNA clone F830224B04 3'
	3,20	0,010	2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN clone:E430002N23 product:unknown EST, full insert sequence
	3,33	0,013	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130073O17 3'
3,80	0,026	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130085J22 product:unknown EST, full insert sequence	
4,08	0,090	RIKEN 0 day neonate thymus cDNA clone A430081H12 3'	

	5,16	0,040	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630014F13 product:unknown EST, full insert sequence
	5,16	0,085	L0701E09-3 NIA Mouse Germinal Center B Cell cDNA Library cDNA clone L0701E09 3'
	5,26	0,015	2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN clone:E430020L16 product:unknown EST, full insert sequence
	6,94	0,008	RIKEN 3 days neonate thymus cDNA clone A630089K11 3'
Tecidos nervosos			
Reprimido	-6,30	0,015	adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone:C630045F22 product:unclassifiable, full insert sequence
	-5,13	0,023	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730010G01 product:unclassifiable, full insert sequence
	-5,10	0,073	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330172G08 product:unknown EST, full insert sequence
	-5,09	0,022	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN clone:A830060F16 product:unclassifiable, full insert sequence
	-5,03	0,027	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:B930023K05 product:U6 small nuclear RNA, full insert sequence
	-4,85	0,004	RIKEN 2 days neonate sympathetic ganglion cDNA clone 7120483N17 5'
	-4,54	0,024	adult male corpus striatum cDNA, RIKEN clone:C030008K18 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,24	0,070	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN clone:A830032M11 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,22	0,067	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:C230050D12 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,19	0,063	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:C230067O04 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,12	0,047	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430408I07 product:unclassifiable, full insert sequence
	-3,40	0,088	RIKEN adult male cerebellum cDNA clone 6530401I12 3'
	-3,21	0,041	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230075C18 3'
	-2,98	0,060	RIKEN adult male corpora quadrigemina cDNA clone B230309H22 3'
	-2,97	0,010	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330159M15 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,89	0,049	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230340D10 product:unknown EST, full insert sequence
-2,84	0,083	adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN clone:6330541F16 product:hypothetical Cysteine-rich region/Immunoglobulin and major histocompatibility complex domain containing protein, full insert sequence	
-2,71	0,080	adult male pituitary gland cDNA, RIKEN clone:5330401L02 product:unknown EST, full insert sequence	

	-2,70	0,045	RIKEN adult male medulla oblongata cDNA clone 6330556M22 3'
	-2,67	0,012	L0814E06-3 NIA Mouse Newborn Brain cDNA Library cDNA clone L0814E06 3'
	-2,59	0,072	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:B930048L16 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,55	0,093	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230047M02 3'
	-2,55	0,087	RIKEN 2 days neonate sympathetic ganglion cDNA clone 7120455B21 3'
	-2,51	0,090	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230327I23 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,50	0,047	RIKEN 10 days neonate cortex cDNA clone A830054P04 3'
	-2,40	0,079	RIKEN adult male corpora quadrigemina cDNA clone B230342J21 3'
	-2,33	0,028	RIKEN visual cortex cDNA clone K430324P14 3'
	-2,28	0,085	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630034M03 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,27	0,049	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330132O05 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,16	0,053	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN clone:A830096N22 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,16	0,088	RIKEN adult male olfactory bulb cDNA clone 6430512C20 3'
	-2,13	0,053	RIKEN adult male medulla oblongata cDNA clone 6330419B13 3'
	-2,04	0,034	RIKEN adult male hippocampus cDNA clone C630043A18 3'
	-2,03	0,095	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230107B10 3'
Induzido	2,01	0,068	adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone:C630001G18 product:unknown EST, full insert sequence
	2,06	0,053	RIKEN adult male spinal cord cDNA clone A330019I10 3'
	2,07	0,043	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230338A04 product:unknown EST, full insert sequence
	2,10	0,095	RIKEN 10 days neonate cerebellum cDNA clone B930074B15 3'
	2,11	0,043	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:B930076E19 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,11	0,100	adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone:C630013O05 product:unknown EST, full insert sequence
	2,13	0,049	RIKEN adult male pituitary gland cDNA clone 5330434E03 3'
	2,14	0,045	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230046O11 3'
	2,16	0,053	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:C230053D09 product:unknown EST, full insert sequence
	2,19	0,082	RIKEN adult male corpora quadrigemina cDNA clone B230312O19 3'
	2,20	0,032	RIKEN adult male spinal cord cDNA clone A330051P05 3'
	2,21	0,050	RIKEN 10 days neonate medulla oblongata cDNA clone B830008M02 3'

2,24	0,060	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630039A10 product:unclassifiable, full insert sequence
2,25	0,082	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230118I11 product:unknown EST, full insert sequence
2,25	0,033	21 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:G630009M09 product:unknown EST, full insert sequence
2,27	0,050	adult male spinal cord cDNA, RIKEN clone:A330068G13 product:unknown EST, full insert sequence
2,31	0,099	adult male spinal cord cDNA, RIKEN clone:A330050A06 product:unknown EST, full insert sequence
2,34	0,060	RIKEN 0 day neonate cerebellum cDNA clone C230027O20 3'
2,35	0,076	adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone:2900084O13 product:unknown EST, full insert sequence
2,37	0,069	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730075A08 product:hypothetical protein, full insert sequence
2,48	0,016	adult male spinal cord cDNA, RIKEN clone:A330024F20 product:unknown EST, full insert sequence
2,51	0,091	adult male cerebellum cDNA, RIKEN clone:1500004A13 product:unknown EST, full insert sequence
2,54	0,018	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330178L02 product:unknown EST, full insert sequence
2,58	0,044	adult male spinal cord cDNA, RIKEN clone:A330080M08 product:unclassifiable, full insert sequence
2,59	0,086	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730060K18 product:unknown EST, full insert sequence
2,60	0,027	RIKEN visual cortex cDNA clone K330304H15 3'
2,62	0,062	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430540A02 product:unknown EST, full insert sequence
2,70	0,036	RIKEN 10 days neonate cerebellum cDNA clone B930003D11 3'
2,76	0,030	adult male hypothalamus cDNA, RIKEN clone:A230065N10 product:hypothetical protein, full insert sequence
2,77	0,094	0 day neonate head cDNA, RIKEN clone:4833431M13 product:unknown EST, full insert sequence
2,94	0,049	RIKEN 10 days neonate cortex cDNA clone A830098H23 3'
3,00	0,100	adult male corpus striatum cDNA, RIKEN clone:C030010F05 product:unclassifiable, full insert sequence
3,01	0,095	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330153E02 product:hypothetical BTB/POZ domain containing protein, full insert sequence
3,04	0,069	adult male hypothalamus cDNA, RIKEN clone:A230053F13 product:unknown EST, full insert sequence

	3,05	0,030	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330152O10 product:unknown EST, full insert sequence
	3,08	0,051	adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone:2900074G08 product:unknown EST, full insert sequence
	3,15	0,006	RIKEN adult male olfactory bulb cDNA clone 6430578J12 3'
	3,18	0,097	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230092H19 3'
	3,25	0,096	0 day neonate head cDNA, RIKEN clone:4832420A03 product:unknown EST, full insert sequence
	3,27	0,021	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730095H02 product:unknown EST, full insert sequence
	3,34	0,055	RIKEN 10 days neonate cortex cDNA clone A830009M13 3'
	3,71	0,094	RIKEN adult male cerebellum cDNA clone 6530411F08 3'
	3,76	0,032	RIKEN adult male olfactory brain cDNA clone 6430408O03 5'
	4,22	0,050	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430573F06 product:unknown EST, full insert sequence
	5,42	0,066	RIKEN visual cortex cDNA clone K530023N21 3'
	5,66	0,016	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430514C12 product:unknown EST, full insert sequence
	5,76	0,092	RIKEN visual cortex cDNA clone K430042O13 5'
	6,69	0,002	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330199C07 product:unclassifiable, full insert sequence
Sistema Reprodutor			
Reprimido	-8,89	0,029	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4931400N11 3' similar to Z38118 Mmusculus mRNA for synaptonemal complex protein 1.
	-7,84	0,025	RIKEN adult male testis cDNA clone 4930558J22 5'
	-5,59	0,026	RIKEN 2 days pregnant adult female ovary cDNA clone E330013B11 5'
	-4,92	0,065	adult female vagina cDNA, RIKEN clone:9930031O22 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,68	0,043	2 days pregnant adult female ovary cDNA, RIKEN clone:E330038L21 product:selective hybridizing clone, full insert sequence
	-4,44	0,062	adult male vesicular gland cDNA, RIKEN clone:G630019C12 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-4,32	0,055	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930449C09 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,28	0,022	maj49f02y1 McCarrey Eddy 6 day primitive type A spermatogonia cDNA clone IMAGE: 5'
	-3,50	0,028	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4933429K08 3' similar to AB029026 Homo sapiens mRNA for KIAA1103 protein
	-3,49	0,083	2 days pregnant adult female oviduct cDNA, RIKEN clone:E230012P03 product:hypothetical protein, full insert sequence

	-3,47	0,041	2 days pregnant adult female ovary cDNA, RIKEN clone:E330034G19 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-3,42	0,024	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4933402D24 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-3,35	0,036	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930558M01 product:unclassifiable, full insert sequence
	-3,33	0,047	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930405H06 product:inferred: RIKEN cDNA 4930405H06 gene putative [Mus musculus], full insert sequence
	-3,25	0,048	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930449E01 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-3,14	0,092	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700022L20 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-3,10	0,100	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930511H11 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,83	0,035	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700049J03 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,76	0,097	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4921522E08 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,76	0,075	ml45g03y1 Stratagene mouse testis (#937308) cDNA clone IMAGE:514996 5'
	-2,73	0,031	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4933417C20 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,52	0,025	RIKEN adult male testis cDNA clone 4933438H20 5'
	-2,38	0,039	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4933433M23 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,35	0,041	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4932431H17 3'
	-2,27	0,081	RIKEN Leydig cells CRL-2065 MLTC-1 cDNA cDNA clone G430136C01 3'
	-2,24	0,037	RIKEN 2 days pregnant adult female ovary cDNA clone E330024C05 5'
	-2,23	0,090	L0006A06-3 NIA Mouse E12.5 Female Mesonephros and Gonads cDNA Library cDNA clone L0006A06 3'
	-2,11	0,055	RIKEN 13 days pregnant adult female placenta cDNA clone I530004I16 3'
Induzido	2,01	0,070	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930511N06 product:breast cancer anti-estrogen resistance 3, full insert sequence
	2,01	0,032	adult male epididymis cDNA, RIKEN clone:9230112D13 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,01	0,067	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700010B13 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,04	0,076	ml34h10y1 Stratagene mouse testis (#937308) cDNA clone IMAGE:513955 5'
	2,04	0,054	adult male epididymis cDNA, RIKEN clone:9230110I02 product:hypothetical Cysteine-rich region containing protein, full insert sequence
	2,10	0,051	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700007K09 product:hypothetical protein, full insert sequence

2,16	0,064	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930535M16 3'
2,17	0,063	mr69e05y1 Stratagene mouse testis (#937308) cDNA clone IMAGE:602720 5'.
2,17	0,044	C0937E01-3 NIA Mouse 125-dpc Male Genital Ridge/Mesonephros cDNA Library (Long) cDNA clone C0937E01 3'
2,17	0,092	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932415P20 product:hypothetical protein, full insert sequence
2,18	0,040	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4921535H07 product:t-complex protein 10a, full insert sequence
2,18	0,064	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930488P18 product:hypothetical Lysine-rich region containing protein, full insert sequence
2,21	0,051	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700057D03 product:unknown EST, full insert sequence
2,23	0,031	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930422D24 3'
2,23	0,034	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930571K23 product:unknown EST, full insert sequence
2,25	0,093	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4933413L02 product:Kinesin superfamily protein 2B, full insert sequence
2,25	0,029	RIKEN adult female vagina cDNA clone 9930027N21 3'
2,26	0,034	L0276D10-3 NIA Mouse Newborn Ovary cDNA Library cDNA clone L0276D10 3'
2,32	0,076	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700072I22 product:unknown EST, full insert sequence
2,36	0,049	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700034G24 product:unknown EST, full insert sequence
2,38	0,086	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4932422I21 3'
2,38	0,076	maj61g04y1 McCarrey Eddy 6 day primitive type A spermatogonia cDNA clone IMAGE: 5'
2,45	0,084	adult female placenta cDNA, RIKEN clone:1600025N01 product:pregnancy specific glycoprotein 23, full insert sequence
2,48	0,024	RIKEN adult male epididymis cDNA clone 9230019H11 5'
2,53	0,058	K0209D01-3 NIA Mouse Unfertilized Egg cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0209D01 IMAGE:30045540 3'
2,65	0,055	RIKEN adult male testis cDNA clone 1700073J18 5'
2,80	0,052	RIKEN adult male testis cDNA clone 4932438K17 5'
2,83	0,046	uh21f03r1 Barstead mouse testis MPLRB11 cDNA clone IMAGE:1746077 5'.
2,84	0,059	RIKEN 2 days pregnant adult female ovary cDNA clone E330028L15 3'
2,86	0,012	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700102J08 product:unclassifiable, full insert sequence
2,92	0,031	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930468I24 product:hypothetical protein, full insert sequence

	2,97	0,020	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930423B08 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,97	0,048	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930524G09 3'
	2,99	0,017	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700112H15 product:unclassifiable, full insert sequence
	3,01	0,023	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930423M02 product:unknown EST, full insert sequence
	3,17	0,034	B0977C02-5 NIA Mouse Unfertilized Egg cDNA Library (Long 1) cDNA clone NIA:B0977C02 IMAGE:30479641 5'
	3,47	0,011	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700054A03 product:unclassifiable, full insert sequence
	3,56	0,030	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700086D15 product:hypothetical protein, full insert sequence
	3,62	0,092	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930408C17 3'
	4,01	0,063	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700083E03 product:unclassifiable, full insert sequence
	4,07	0,080	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932418C03 product:unclassifiable, full insert sequence
	4,54	0,019	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4922502B01 product:hypothetical protein, full insert sequence
	4,73	0,039	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932439K17 product:histone gene complex 2, full insert sequence
	5,35	0,069	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930584N09 product:unknown EST, full insert sequence
	5,36	0,003	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4931408I19 3'
	7,26	0,009	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4933404M01 product:unknown EST, full insert sequence
	9,44	0,001	mah85f09y1 McCarrey Eddy 18 day leptotene and zygotene spermatocytes cDNA clone IMAGE:6367265 5'
	10,28	0,085	11 days pregnant adult female ovary and uterus cDNA, RIKEN clone:5031408O05 product:hypothetical Fibronectin type III domain/Fibronectin type III repeat containing protein, full insert sequence
Sistema Respiratório			
Reprimido	-3,78	0,030	0 day neonate lung cDNA, RIKEN clone:E030034B13 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,01	0,068	0 day neonate lung cDNA, RIKEN clone:E030047P09 product:unknown EST, full insert sequence
	3,45	0,097	RIKEN 0 day neonate lung cDNA clone E030031L17 3'
	3,84	0,021	vq01d06r1 Stratagene mouse diaphragm (#937303) cDNA clone IMAGE:1092971 5'.

Sistema Sensorial			
Reprimido	-6,24	0,009	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN clone:E130019F10 product:unclassifiable, full insert sequence
	-3,15	0,030	7064-50 Mouse E14.5 retina lambda ZAP II Library Mus musculus cDNA
	-2,87	0,038	4051-87 Mouse E145 retina lambda ZAP II Library Mus musculus cDNA
	-2,73	0,018	RIKEN adult retina cDNA clone A930014L09 3'
Induzido	2,17	0,065	M2PN-4028 MOUSE POST-NATAL DAY 2 EYE Mus musculus cDNA 5'
	2,20	0,092	M15E-4628 MOUSE EMBRYONIC DAY 155 EYE Mus musculus cDNA 5'
	2,91	0,073	RIKEN 0 day neonate eyeball cDNA clone E130008J03 5'
	2,98	0,048	RIKEN 0 day neonate eyeball cDNA clone E130114G05 5'
	4,21	0,016	adult retina cDNA, RIKEN clone:A930009A15 product:unknown EST, full insert sequence
Sistema Esquelético			
	2,64	0,026	adult male bone cDNA, RIKEN clone:9830138L07 product:unknown EST, full insert sequence
	5,81	0,025	RIKEN adult male bone cDNA clone 9830148H23 3'
Sistema Tegumentar			
Reprimido	-2,12	0,085	mm23e06y1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:522370 5'.
Induzido	2,00	0,095	vw95e12r1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:1262734 5'.
	2,65	0,058	vu93b06x1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:1209683 3'.
Tecidos Tumorais			
Induzido	2,01	0,035	RIKEN adult male liver tumor cDNA clone C730010N16 3'

B- Lista das ESTs (*Expressed Sequence Tags*) diferencialmente expressas 48 horas após a administração do composto quinazolínico.

Expressão	Fold change	p-value	EST ID
Tecido Adiposo			
Reprimido	-2,77	0,100	4 days neonate male adipose cDNA, RIKEN clone:B430001L01 product:unclassifiable, full insert sequence
Induzido	2,67	0,052	RIKEN 4 days neonate male adipose cDNA clone B430108C21 3'
Sistema Cardiovascular			
Reprimido	-5,77	0,093	adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530053D06 product:unknown EST, full insert sequence
	-3,18	0,064	adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530083M17 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,89	0,084	vn93d10r1 Stratagene mouse heart (#937316) cDNA clone IMAGE:1039507 5'.
	-2,10	0,067	mq91c08y1 Stratagene mouse heart (#937316) cDNA clone IMAGE:586094 5'.
Induzido	3,07	0,061	RIKEN adult male aorta and vein cDNA clone A530083D08 3'
	5,53	0,063	RIKEN adult male aorta and vein cDNA clone A530020G03 3'
Sistema Digestivo			
Reprimido	-3,44	0,005	RIKEN adult male liver cDNA clone K630070F01 3'
	-2,60	0,033	uj07h01x1 Sugano mouse liver mlia cDNA clone IMAGE:1891249 3' similar to gb:L27121 Mus musculus (MOUSE);.
	-2,07	0,077	lae23h06y3 Colon epithelia progenitors cDNA Mus musculus cDNA 5'
Induzido	2,04	0,045	adult male tongue cDNA, RIKEN clone:2310065F04 product:unknown EST, full insert sequence
	2,09	0,035	vq33d11r1 Barstead bowel MPLRB9 cDNA clone IMAGE:1096053 5'.
	2,29	0,072	lai93h01y1 Gastric Epithelial Progenitor 2 Mus musculus cDNA 5'
	2,58	0,003	tongue C57BL/6J adult cDNA clone 2310034I02
	3,22	0,054	vp43b01r1 Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 cDNA clone IMAGE:1079401 5'.
	3,55	0,035	lae74f04y1 Gastric Epithelial Progenitor Mus musculus cDNA 5'
Tecidos Embrionários			
Reprimido	-5,58	0,055	RIKEN 2 cells egg cDNA clone B020032O13 5'
	-5,33	0,008	vt04a11r1 Barstead mouse myotubes MPLRB5 cDNA clone IMAGE:1162076 5'.
	-4,62	0,048	RIKEN 145 days embryo df/df Rathke's pouches cDNA clone K820020G11 3'
	-4,44	0,040	RIKEN 13 days embryo head cDNA clone 3100002J05 5'
	-3,99	0,010	12 days embryo spinal ganglion cDNA, RIKEN clone:D130073P12 product:unknown EST, full insert sequence

-3,66	0,042	two-cell stage embryo cDNA cDNA clone J0735D10 3'
-3,50	0,042	12 days embryo body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN clone:9430092M24 product:unknown EST, full insert sequence
-3,48	0,088	sixteen-cell-embryo cDNA cDNA clone J0929A03 3'
-3,47	0,043	RIKEN 1 cell embryo cDNA clone I0C0026H18 3'
-3,26	0,023	mi67c03r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 cDNA clone IMAGE:468580 5'.
-3,10	0,092	RIKEN 8 days embryo cDNA clone 5730515M23 3'
-2,86	0,084	13 days embryo lung cDNA, RIKEN clone:D430040B02 product:hypothetical Major histocompatibility complex protein, Class I containing protein, full insert sequence
-2,85	0,073	12 days embryo spinal ganglion cDNA, RIKEN clone:D130027K15 product:unknown EST, full insert sequence
-2,81	0,028	RIKEN 95 days embryo parthenogenote cDNA clone B130065J17 3'.
-2,81	0,011	ui41b05y1 Sugano mouse embryo mewa cDNA clone IMAGE:1884945 5'.
-2,79	0,033	C79947 Mouse 35-dpc blastocyst cDNA cDNA clone J0074B11 3'.
-2,77	0,066	NISC_kp06d12q2 Baker mouse embryo e7.5 cDNA clone IMAGE:5408687
-2,72	0,081	me06b01r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 cDNA clone IMAGE:386665 5'.
-2,71	0,083	12 days embryo male wolffian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN clone:6720474J12 product:unclassifiable, full insert sequence
-2,63	0,033	mj14a08r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 cDNA clone IMAGE:476054 5' similar to WP:C16C10.11 CE01491 ;.
-2,58	0,056	K0985B05-3N NIA Mouse Neural Stem Cell (Undifferentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0985B05 IMAGE:30092368 3'
-2,58	0,026	RIKEN 175 days embryo whole body cDNA clone L930172A20 5'
-2,49	0,004	A0149G04-5 NIA Mouse Undifferentiated ES Cell cDNA Library (Long 1) cDNA clone NIA:A0149G04 IMAGE:30728331 5'
-2,49	0,032	RIKEN in vitro fertilized eggs cDNA clone 7420447M23 3'
-2,48	0,029	B0114A04-3N NIA Mouse Neural Stem Cell (Differentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0114A04 IMAGE:30095139 3'
-2,44	0,051	C0201F08-3 NIA Mouse 75-dpc Whole Embryo cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:C0201F08 IMAGE:30010723 3'
-2,43	0,046	RIKEN 1 cell embryo cDNA clone I0C0028D18 5'
-2,43	0,087	15 days embryo head cDNA, RIKEN clone:D930050J11 product:unknown EST, full insert sequence
-2,37	0,037	C80532 Mouse 35-dpc blastocyst cDNA cDNA clone J0083E10 3'.
-2,34	0,036	RIKEN 11 days embryo whole body cDNA clone 2700016D12 5'
-2,31	0,014	12 days embryo spinal cord cDNA, RIKEN clone:C530038A18 product:unknown EST, full insert sequence

	-2,28	0,084	12 days embryo body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN clone:9430096K17 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,23	0,003	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:5730403I07 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,18	0,092	vn74h03x1 Knowles Solter mouse blastocyst B1 cDNA clone IMAGE:1037717 3'.
	-2,17	0,008	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130003A21 3'
	-2,16	0,010	12 days embryo body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN clone:9430047F21 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,11	0,077	vm27d11x1 Knowles Solter mouse blastocyst B1 cDNA clone IMAGE:991413 3'.
	-2,02	0,033	RIKEN 8 days embryo cDNA clone 5730583A17 3'
	-2,02	0,051	13 days embryo heart cDNA, RIKEN clone:D330017K04 product:hypothetical Serine-rich region containing protein, full insert sequence
	-2,02	0,078	C88230 Mouse fertilized one-cell-embryo cDNA cDNA clone J0258H03 3'
	-2,01	0,057	C0619E08-3 NIA Mouse Trophoblast Stem Cell cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:C0619E08 IMAGE:30022039 3'
Induzido	2,01	0,045	RIKEN in vitro fertilized eggs cDNA clone 7420429L24 3'
	2,02	0,059	two-cell stage embryo cDNA cDNA clone J0711F07 3'
	2,03	0,015	vl61b04s1 Knowles Solter mouse 2 cell cDNA clone IMAGE:976687 5' similar to gb:M26880 UBIQUITIN (HUMAN); gb:X51703 Mouse mRNA for ubiquitin (MOUSE);.
	2,06	0,039	RIKEN 13 days embryo forelimb cDNA clone 5930417L10 3'
	2,07	0,098	RIKEN in vitro fertilized eggs cDNA clone 7420439N08 3'
	2,07	0,052	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130093J22 3'
	2,08	0,050	RIKEN 12 days embryo eyeball cDNA clone D230049B05 3'
	2,11	0,071	K0922B05-5N NIA Mouse Neural Stem Cell (Undifferentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0922B05 IMAGE:30086320 5'
	2,11	0,063	K0946H06-5N NIA Mouse Neural Stem Cell (Undifferentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0946H06 IMAGE:30088697 5'
	2,17	0,093	RIKEN 8 days embryo cDNA clone 5730583E07 3' similar to AB011369 Rattus norvegicus mRNA for RBCK2
	2,18	0,037	RIKEN 1 cell embryo cDNA clone I0C0048L09 3'
	2,22	0,006	RIKEN in vitro fertilized eggs cDNA clone 7420474D11 3'
	2,25	0,081	B0261A10-5 NIA Mouse Embryonic Germ Cell cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:B0261A10 IMAGE:30109257 5'
	2,26	0,054	12 days embryo female ovary cDNA, RIKEN clone:6620401J10 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,28	0,008	RIKEN in vitro fertilized eggs cDNA clone 7420407K03 3'
	2,29	0,036	RIKEN 2 cells egg cDNA clone B020010F16 5'

	2,29	0,016	12 days embryo spinal cord cDNA, RIKEN clone:C530028E13 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,32	0,077	RIKEN 145 days embryo df/df Rathke's pouches cDNA clone K820002H16 3'
	2,32	0,033	16 days embryo head cDNA, RIKEN clone:C130009A20 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,38	0,037	RIKEN 8 cells embryo cDNA clone E860101O16 3'
	2,44	0,012	RIKEN 15 days embryo head cDNA clone D930017P09 5'
	2,47	0,015	RIKEN 15 days embryo head cDNA clone D930017A18 3'
	2,47	0,024	12 days embryo male wolffian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN clone:6720452L19 product:unknown EST, full insert sequence
	2,53	0,075	ve32b03.x1 Ko mouse embryo 11 5dpc cDNA clone IMAGE:819821 3'
	2,58	0,039	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130072F22 5'
	2,58	0,023	A0241E02-5 NIA Mouse Embryonic Germ Cell cDNA Library (Long, subtracted) cDNA clone NIA:A0241E02 IMAGE:30732337 5'
	2,62	0,001	10 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:2610027F03 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,66	0,031	12 days embryo body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN clone:9430044K24 product:unknown EST, full insert sequence
	2,69	0,043	RIKEN 17 days pregnant adult female amnion cDNA clone I920029A10 5'
	2,94	0,035	RIKEN 12 days embryo eyeball cDNA clone D230033B12 3'
	2,98	0,077	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130034H07 3'
	2,98	0,002	RIKEN 13 days embryo male testis cDNA clone 6030446P15 3'
	3,09	0,039	RIKEN 1 cell embryo cDNA clone I0C0010N11 3'
	3,09	0,026	RIKEN 8 cells embryo cDNA clone E860015E03 3'
	3,10	0,053	RIKEN 12 days embryo eyeball cDNA clone D230010N01 5'
	3,16	0,035	RIKEN 16 days embryo kidney cDNA clone I920051N13 3'
	3,21	0,012	12 days embryo body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN clone:9430099J10 product:unknown EST, full insert sequence
	3,28	0,064	vm74h10s1 Knowles Solter mouse 2 cell cDNA clone IMAGE:1004035 5'.
	3,39	0,008	vd60e09y1 Knowles Solter mouse blastocyst B1 cDNA clone IMAGE:805000 5'.
	3,50	0,023	RIKEN 17 days pregnant adult female amnion cDNA clone I920096O21 3'
	3,70	0,021	RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130083B17 3'
	3,72	0,019	K0949E04-3N NIA Mouse Neural Stem Cell (Undifferentiated) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0949E04 IMAGE:30088947 3'
	3,80	0,004	RIKEN 17 days pregnant adult female amnion cDNA clone I920047E06 5'
	4,10	0,037	C0897F09-5N NIA Mouse Blastocyst cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:C0897F09 IMAGE:30034340 5'
	4,12	0,038	RIKEN 15 days embryo head cDNA clone D930039H12 5'
	4,75	0,082	C57BL/6J 8-day embryo cDNA clone 5730407C12

13 days embryo lung cDNA, RIKEN clone:D430021L16			
product:hypothetical protein, full insert sequence			
Sistema Endócrino			
Reprimido	-2,87	0,014	RIKEN mammary gland RCB-0527 Jyg-MC(B) cDNA cDNA clone G930118E01 3'
	-2,29	0,081	ub66h01x1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:1382737 3'.
	-2,17	0,016	ud41f06y1 Soares_mammary_gland_NbMMG cDNA clone IMAGE:1448483 5'.
	-2,16	0,019	ih39a11.y5 Melton Mouse E16 5 Pancreas Library 2 M16B2 cDNA clone IMAGE:5679285 5'
	-2,11	0,081	uu29e01x1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:3373368 3'.
	-2,10	0,098	RIKEN 10 day old male pancreas cDNA clone 1810012K16 5'
Induzido	2,16	0,071	10 days lactation, adult female mammary gland cDNA, RIKEN clone:D730032J17 product:weakly similar to RH37427P [Drosophila melanogaster], full insert sequence
	2,22	0,027	uu19d09x1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:3372401 3'.
	2,38	0,098	uc41f12x1 Soares_mammary_gland_NMLMG cDNA clone IMAGE:1400591 3'.
Sistema Excretor			
Reprimido	-2,50	0,069	uj32f08x1 Sugano mouse kidney mkia cDNA clone IMAGE:1921671 3'.
	-2,29	0,059	0 day neonate kidney cDNA, RIKEN clone:D630035H15 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,21	0,061	uc83c12x1 Sugano mouse kidney mkia cDNA clone IMAGE:1432246 3'.
	-2,19	0,041	RIKEN 0 day neonate kidney cDNA clone D630050G19 3'
Induzido	2,04	0,018	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN clone:9530056H10 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,14	0,074	um35h08x1 Sugano mouse kidney mkia cDNA clone IMAGE:2236575 3'.
	2,16	0,038	mv80a04x1 GuayWoodford Beier mouse kidney day 7 cDNA clone IMAGE:661326 3'.
	2,26	0,030	adult male urinary bladder cDNA, RIKEN clone:9530014B07 product:unknown EST, full insert sequence
	2,61	0,098	ui14g08.r1 Soares mouse urogenital ridge NMUR cDNA clone IMAGE:1851326 5'
	3,20	0,013	RIKEN adult male urinary bladder cDNA clone 9530090M17 5'
	5,03	0,089	RIKEN adult male urinary bladder cDNA clone 9530050I04 3'
	6,57	0,091	L0926E03-5 NIA Mouse Newborn Kidney cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:L0926E03 IMAGE:30002546 5'

Hematopoiese			
Reprimido	-11,10	0,008	LL2in14345T7 Hematopoietic Stem Cell Subtracted Library Mus musculus cDNA 5'
	-3,41	0,003	vb28c09y1 Soares mouse lymph node NbMLN cDNA clone IMAGE:750256 5'.
	-2,92	0,007	vb45a06y1 Soares mouse lymph node NbMLN cDNA clone IMAGE:751858 5'.
	-2,59	0,004	K0152H04-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1-) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0152H04 IMAGE:30044439 3'
	-2,48	0,087	K0504F10-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0504F10 IMAGE:30064293 3'
	-2,16	0,049	K0543H07-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0543H07 IMAGE:30068058 3'
Induzido	2,15	0,098	A0642E09-5 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long 1) cDNA clone NIA:A0642E09 IMAGE:30751640 5'
	2,34	0,028	K0524D10-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0524D10 IMAGE:30066189 3'
	2,43	0,019	va05b09.y1 Soares mouse lymph node NbMLN cDNA clone IMAGE:722009 5'
	2,68	0,019	K0507G03-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit+/Sca-1+) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0507G03 IMAGE:30064586 3'
	3,37	0,059	mt83g03x1 Soares mouse lymph node NbMLN cDNA clone IMAGE:636532 3'.
	6,53	0,042	K0734E09-3 NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell (Lin-/c-Kit-/Sca-1-) cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0734E09 IMAGE:30076856 3'
Sistema Imune			
Reprimido	-5,06	0,007	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130058I09 product:unknown EST, full insert sequence
	-4,49	0,001	RIKEN NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA clone F630050I06 5'
	-3,99	0,034	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630040M11 product:unknown EST, full insert sequence
	-3,30	0,084	adult male thymus cDNA, RIKEN clone:5832426L23 product:unclassifiable, full insert sequence
	-3,16	0,087	RIKEN 6 days neonate spleen cDNA clone F430106D06 3'
	-2,67	0,029	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130009M13 3'
	-2,59	0,034	RIKEN activated spleen cDNA clone F830115G09 3'
	-2,38	0,024	RIKEN activated spleen cDNA clone F830014N24 5'
	-2,37	0,035	adult male thymus cDNA, RIKEN clone:5830444F18 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,24	0,032	RIKEN adult male thymus cDNA clone 5830463F21 3'
	-2,21	0,100	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130018A01 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,19	0,006	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130028J20 product:unknown EST, full insert sequence

	-2,14	0,062	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130038L22 3'
	-2,11	0,061	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130023B02 3'
	-2,05	0,069	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A130091A19 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,05	0,095	vx91h07y1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:1282621 5'.
Induzido	2,05	0,035	RIKEN B6-derived CD11 +ve dendritic cells cDNA clone F730304B19 3'
	2,06	0,058	vx23b11r1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:1265277 5'.
	2,13	0,054	RIKEN activated spleen cDNA clone F830213N23 3'
	2,18	0,043	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130034G13 3'
	2,31	0,042	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A430080G17 product:unknown EST, full insert sequence
	2,31	0,027	RIKEN B6-derived CD11 +ve dendritic cells cDNA clone F730111K15 3'
	2,37	0,091	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630022A19 product:unknown EST, full insert sequence
	2,40	0,099	RIKEN activated spleen cDNA clone F830304L11 5'
	2,57	0,029	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130029G22 3'
	2,58	0,003	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130059B02 3'
	2,59	0,014	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A430034N16 product:unknown EST, full insert sequence
	2,66	0,042	vx02g01r1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:1263312 5'.
	2,70	0,008	RIKEN adult male thymus cDNA clone 5830401B09 3'
	2,74	0,087	RIKEN 16 days neonate thymus cDNA clone A130072H08 3'
	2,75	0,061	ux18h05y1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:3471897 5'.
	2,96	0,021	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A630066K17 product:hypothetical protein, full insert sequence
	3,24	0,057	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN clone:A430073O05 product:unknown EST, full insert sequence
	3,28	0,069	RIKEN activated spleen cDNA clone F830215F09 3'
	3,63	0,001	RIKEN activated spleen cDNA clone F830106N03 5'
	4,26	0,054	ut23h11y1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:3328773 5'.
5,32	0,007	activated spleen cDNA, RIKEN clone:F830031D20 product:hypothetical protein, full insert sequence	
Tecidos nervosos			
Reprimido	-4,28	0,055	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430401J08 product:unclassifiable, full insert sequence
	-3,80	0,033	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230323N14 product:unknown EST, full insert sequence
	-3,57	0,077	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330119M12 product:unclassifiable, full insert sequence
	-3,29	0,085	RIKEN adult male pituitary gland cDNA clone 5330438L16 3'

-3,12	0,071	RIKEN 16 days neonate cerebellum cDNA clone 9630054L22 3'
-3,01	0,070	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630012D08 product:unknown EST, full insert sequence
-2,91	0,072	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230210M17 product:unknown EST, full insert sequence
-2,88	0,023	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230314N06 product:unknown EST, full insert sequence
-2,81	0,059	RIKEN 7 days neonate cerebellum cDNA clone A730041D23 3'
-2,74	0,008	RIKEN adult inner ear cDNA clone F930111A03 3'
-2,70	0,053	adult male diencephalon cDNA, RIKEN clone:9330179O15 product:hypothetical protein, full insert sequence
-2,65	0,073	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730095H02 product:unknown EST, full insert sequence
-2,64	0,054	adult male corpus striatum cDNA, RIKEN clone:C030002C18 product:unknown EST, full insert sequence
-2,59	0,008	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230383C01 product:unclassifiable, full insert sequence
-2,50	0,054	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730081N18 product:unknown EST, full insert sequence
-2,44	0,050	RIKEN visual cortex cDNA clone K330009B06 3'
-2,41	0,081	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230099F11 3'
-2,41	0,011	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430573F06 product:unknown EST, full insert sequence
-2,39	0,061	RIKEN 12 days embryo spinal cord cDNA clone C530043P04 3'
-2,34	0,013	RIKEN adult male corpora quadrigemina cDNA clone B230327L12 3'
-2,32	0,015	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230340D10 product:unknown EST, full insert sequence
-2,32	0,055	RIKEN 2 days neonate sympathetic ganglion cDNA clone 7120495H06 3'
-2,30	0,054	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230308F15 product:unclassifiable, full insert sequence
-2,30	0,098	RIKEN adult male olfactory bulb cDNA clone 6430514P08 3'
-2,25	0,035	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630034M03 product:unknown EST, full insert sequence
-2,25	0,049	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230103K09 3'
-2,25	0,022	adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230112K06 product:unclassifiable, full insert sequence
-2,22	0,030	adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN clone:6330411D24 product:hypothetical protein, full insert sequence
-2,15	0,033	adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone:C630013E09 product:unknown EST, full insert sequence
-2,14	0,055	RIKEN 16 days neonate cerebellum cDNA clone 9630002F18 3'

	-2,13	0,086	RIKEN adult male corpora quadrigemina cDNA clone B230334G02 3'
	-2,09	0,067	RIKEN 10 days neonate cortex cDNA clone A830034P16 3'
	-2,06	0,047	adult male pituitary gland cDNA, RIKEN clone:5330401L02 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,06	0,046	RIKEN 10 days neonate cortex cDNA clone A830044L10 3'
Induzido	2,02	0,013	L0851A07-3 NIA Mouse Newborn Brain cDNA Library cDNA clone L0851A07 3'
	2,05	0,078	RIKEN 10 days neonate cortex cDNA clone A830098C04 3'
	2,09	0,014	RIKEN 0 day neonate head cDNA clone 4832401N10 5'
	2,11	0,054	adult male spinal cord cDNA, RIKEN clone:A330095G09 product:unknown EST, full insert sequence
	2,12	0,087	RIKEN 10 days neonate medulla oblongata cDNA clone B830045F07 3'
	2,13	0,086	adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN clone:6330570A01 product:unknown EST, full insert sequence
	2,18	0,004	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730008A20 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,22	0,078	RIKEN adult male corpora quadrigemina cDNA clone B230107J02 3'
	2,22	0,012	adult male pituitary gland cDNA, RIKEN clone:5330431C09 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,34	0,003	2 days neonate sympathetic ganglion cDNA, RIKEN clone:7120408P05 product:unknown EST, full insert sequence
	2,41	0,025	RIKEN adult male pituitary gland cDNA clone 5330412M05 3'
	2,42	0,041	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:C230033K16 product:unknown EST, full insert sequence
	2,44	0,010	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230041F08 3'
	2,48	0,051	adult male spinal cord cDNA, RIKEN clone:A330084J11 product:unknown EST, full insert sequence
	2,49	0,012	adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430514C12 product:unknown EST, full insert sequence
	2,55	0,037	adult male hypothalamus cDNA, RIKEN clone:A230009F23 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,57	0,090	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730065E01 product:unknown EST, full insert sequence
	2,60	0,054	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:A730074H22 product:unknown EST, full insert sequence
	2,62	0,095	RIKEN adult male diencephalon cDNA clone 9330159N21 3'
	2,69	0,023	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN clone:A830046P18 product:unclassifiable, full insert sequence
2,70	0,012	0 day neonate head cDNA, RIKEN clone:4833413E03 product:hypothetical protein, full insert sequence	

	2,95	0,008	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630047K07 product:unknown EST, full insert sequence
	3,01	0,003	RIKEN 2 days neonate sympathetic ganglion cDNA clone 7120483N17 5'
	3,18	0,077	RIKEN visual cortex cDNA clone K530015C21 3'
	3,25	0,093	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630010N22 product:unknown EST, full insert sequence
	3,40	0,076	RIKEN 16 days neonate cerebellum cDNA clone 9630058N12 3'
	3,53	0,002	RIKEN adult male hippocampus cDNA clone 2900036K24 5'
	3,91	0,077	RIKEN adult male medulla oblongata cDNA clone 6330509H20 3'
	4,01	0,078	RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230010K05 5'
	4,17	0,020	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:C230064B05 product:hypothetical protein, full insert sequence
	4,33	0,034	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:B930026J19 product:unknown EST, full insert sequence
	5,63	0,089	adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN clone:6330414F14 product:unclassifiable, full insert sequence
	5,63	0,007	RIKEN 16 days neonate cerebellum cDNA clone 9630011B11 3'
Sistema Reprodutor			
Reprimido	-4,03	0,040	RIKEN adult male testis cDNA clone 4930525K10 5'
	-3,51	0,010	RIKEN 11 days pregnant adult female ovary and uterus cDNA clone 5033418H16
	-3,29	0,076	L0266H07-3 NIA Mouse Newborn Ovary cDNA Library cDNA clone L0266H07 3'
	-3,03	0,047	RIKEN adult male testis cDNA clone 1700011M02 5'
	-3,03	0,049	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700015L13 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,97	0,070	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4921517P09 3'
	-2,82	0,092	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930579D07 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,65	0,087	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4931440M09 product:unclassifiable, full insert sequence
	-2,52	0,097	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930512B01 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,51	0,093	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932416M14 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,46	0,011	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4921509A18 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,43	0,054	m134h09x1 Stratagene mouse testis (#937308) cDNA clone IMAGE:513953 3'.
	-2,38	0,065	RIKEN adult male testis cDNA clone 4930528P14 5'

	-2,20	0,048	L0006A06-3 NIA Mouse E12.5 Female Mesonephros and Gonads cDNA Library cDNA clone L0006A06 3'
	-2,16	0,082	adult C57BL/6J testis cDNA clone 1700008C20
	-2,02	0,092	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700008H23 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,01	0,096	RIKEN adult male testis cDNA clone 4930466F19 5'
Induzido	2,01	0,056	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4933426E21 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,08	0,030	RIKEN adult male testis cDNA clone 4933422H20 5'
	2,08	0,071	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930517E14 3'
	2,18	0,003	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4921525O09 product:unknown EST, full insert sequence
	2,21	0,072	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930401M13 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,27	0,065	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930517K17 3'
	2,28	0,051	adult female vagina cDNA, RIKEN clone:9930007M10 product:unknown EST, full insert sequence
	2,29	0,081	K0225F08-3 NIA Mouse Unfertilized Egg cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:K0225F08 IMAGE:30047107 3'
	2,29	0,033	2 days pregnant adult female ovary cDNA, RIKEN clone:E330022G09 product:hypothetical protein, full insert sequence
	2,30	0,034	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4921520L01 product:hypothetical RNI-like structure containing protein, full insert sequence
	2,36	0,006	2 days pregnant adult female ovary cDNA, RIKEN clone:E330027H18 product:unknown EST, full insert sequence
	2,41	0,086	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4931433E14 3'
	2,44	0,006	L0252B09-3 NIA Mouse Newborn Ovary cDNA Library cDNA clone L0252B09 3'
	2,47	0,085	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4932430K12 3'
	2,48	0,089	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932411C10 product:unknown EST, full insert sequence
	2,53	0,065	adult male epididymis cDNA, RIKEN clone:9230112O09 product:unknown EST, full insert sequence
	2,60	0,005	RIKEN 2 days pregnant adult female oviduct cDNA clone E230031F21 5'
	2,86	0,032	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700089D09 product:unclassifiable, full insert sequence
	2,94	0,050	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700017G19 product:hypothetical protein, full insert sequence
3,09	0,001	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932413F04 product:unclassifiable, full insert sequence	

	3,21	0,015	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930455C13 product:unknown EST, full insert sequence
	3,27	0,057	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4921513D11 product:hypothetical protein, full insert sequence
	3,43	0,081	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700066J03 product:unknown EST, full insert sequence
	3,47	0,007	RIKEN adult male testis (DH10B) cDNA clone 4930422D11 3'
	3,57	0,034	RIKEN adult male testis cDNA clone 4930517I18 5'
	3,97	0,048	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700040F17 product:hypothetical Lysine-rich region containing protein, full insert sequence
	4,11	0,014	unfertilized egg cDNA cDNA clone J0416B05 3'
	4,11	0,011	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930558F10 product:unknown EST, full insert sequence
	4,77	0,014	adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930511A02 product:unknown EST, full insert sequence
	5,01	0,021	adult male testis cDNA, RIKEN clone:1700011I03 product:hypothetical protein, full insert sequence
	6,51	0,032	RIKEN 2 days pregnant adult female oviduct cDNA clone E230016O14 3'
	8,76	0,030	RIKEN adult male testis cDNA clone 4930547G14 5'
Sistema Respiratório			
Reprimido	-2,78	0,055	vj38a01x1 Stratagene mouse diaphragm (#937303) cDNA clone IMAGE:931272 3'.
	-2,63	0,048	0 day neonate lung cDNA, RIKEN clone:E030027L10 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,44	0,045	0 day neonate lung cDNA, RIKEN clone:E030001J20 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,39	0,016	0 day neonate lung cDNA, RIKEN clone:E030038G15 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,33	0,024	RIKEN 0 day neonate lung cDNA clone E030006J08 3'
Sistema Sensorial			
Reprimido	-4,57	0,041	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN clone:E130018M06 product:unknown EST, full insert sequence
	-3,61	0,093	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN clone:E130006E17 product:unknown EST, full insert sequence
	-3,05	0,036	adult retina cDNA, RIKEN clone:A930009A15 product:unknown EST, full insert sequence
	-2,93	0,002	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN clone:E130001F20 product:hypothetical protein, full insert sequence
	-2,48	0,004	2034-81 Mouse E145 retina lambda ZAP II Library Mus musculus cDNA
	-2,42	0,032	M2PN-3268 MOUSE POST-NATAL DAY 2 EYE Mus musculus cDNA 5'
	-2,39	0,037	RIKEN adult male eyeball cDNA clone 7530418N13 3'

	-2,27	0,053	mk22a10y1 Mouse retina, unamplified: mk/ml cDNA clone mk22a10 5'
	-2,09	0,088	gi88g09y1 Mouse Organ of Corti cDNA pBluescript cDNA clone gi88g09 5'
	-2,01	0,055	RIKEN 0 day neonate eyeball cDNA clone E130115F21 3'
Induzido	2,01	0,014	gi20b11y1 Mouse Organ of Corti cDNA pBluescript cDNA clone gi20b11 5'
	2,30	0,022	6093-12 Mouse E145 retina lambda ZAP II Library Mus musculus cDNA
	2,33	0,072	4101-89 Mouse E145 retina lambda ZAP II Library Mus musculus cDNA
	2,73	0,007	0232-38 Mouse E14.5 retina lambda ZAP II Library Mus musculus cDNA
	2,82	0,069	adult retina cDNA, RIKEN clone:A930029J01 product:unclassifiable, full insert sequence
	3,23	0,014	RIKEN 0 day neonate eyeball cDNA clone E130314A22 3'
	5,10	0,008	RIKEN adult retina cDNA clone A930003C13 3'
	7,38	0,030	adult retina cDNA, RIKEN clone:A930006D01 product:unclassifiable, full insert sequence
	Sistema Esquelético		
Reprimido	-3,47	0,030	A0445D01-5 NIA Mouse Osteoblast cDNA Library (Long 1) cDNA clone NIA:A0445D01 IMAGE:30742308 5'
	-2,65	0,079	RIKEN adult male bone cDNA clone 9830162J07 3'
	-2,27	0,018	RIKEN adult male bone cDNA clone 9830006J20 3'
Induzido	2,02	0,034	RIKEN whole joints cDNA clone L730006J08 5'
	2,16	0,026	RIKEN adult male bone cDNA clone 9830123H11 3'
Sistema Tegumentar			
Reprimido	-3,00	0,020	vv01c08x1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:1210382 3'.
	-2,45	0,065	RIKEN melanocyte cDNA clone G270021G24 3'
	-2,40	0,016	ms34a05x1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:608816 3'.
	-2,39	0,050	10 days neonate skin cDNA, RIKEN clone:4732462M03 product:unclassifiable, full insert sequence
Induzido	2,06	0,041	6 days neonate skin cDNA, RIKEN clone:A030001O10 product:unknown EST, full insert sequence
	2,20	0,038	0 day neonate skin cDNA, RIKEN clone:4632422L05 product:unknown EST, full insert sequence
	2,23	0,022	RIKEN melanocyte cDNA clone G270006P13 3'
	2,25	0,061	10 days neonate skin cDNA, RIKEN clone:4732496C06 product:unknown EST, full insert sequence
	2,33	0,025	RIKEN 10 day neonate skin cDNA clone 4732457O22 5'
	2,72	0,087	ms15h03y1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:607061 5'.
	2,77	0,077	vs75a09r1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:1152088 5'.
	3,38	0,065	10 days neonate skin cDNA, RIKEN clone:4732470F13 product:unclassifiable, full insert sequence
	3,62	0,047	10 days neonate skin cDNA, RIKEN clone:4732442L07 product:unclassifiable, full insert sequence

Tecidos Tumorais			
Reprimido	-2,57	0,091	mm45d08x1 Stratagene mouse melanoma (#937312) cDNA clone IMAGE:524463 3'.
	-2,39	0,095	mm79c02y1 Stratagene mouse embryonic carcinomaRA (#937318) cDNA clone IMAGE:534626 5'.
	-2,21	0,038	adult male liver tumor cDNA, RIKEN clone:C730014A19 product:unclassifiable, full insert sequence
Induzido	2,10	0,053	adult male liver tumor cDNA, RIKEN clone:C730040M18 product:unknown EST, full insert sequence

