

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TGF-B DA RAIZ DA AORTA EM MODELO  
MURINO DE MPS I TRATADOS COM LOSARTAN E PROPRANOLOL**

Giuseppe Ávila Testa

Porto Alegre  
2019

Giuseppe Ávila Testa

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TGF-B DA RAIZ DA AORTA EM MODELO  
MURINO DE MPS I TRATADOS COM LOSARTAN E PROPRANOLOL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

Coorientador: Me. Esteban Alberto Gonzalez

Porto Alegre

2019

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

### CIP - Catalogação na Publicação

Testa, Giuseppe  
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS VIAS DE TGF-B DO ARCO  
AÓRTICO EM MODELO MURINO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I  
POR PCR EM TEMPO REAL / Giuseppe Testa. -- 2019.  
55 f.  
Orientadora: Ursula Matte.

Coorientadora: Esteban Alberto Gonzalez.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Mucopolissacaridose. 2. raiz aórtica. 3. TGF  
beta. 4. PCR em tempo real. 5. AT1R. I. Matte, Ursula,  
orient. II. Alberto Gonzalez, Esteban, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Giuseppe Ávila Testa

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TGF- $\beta$  DA RAIZ DA AORTA EM MODELO  
MURINO DE MPS I TRATADOS COM LOSARTAN E PROPRANOLOL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 05 de dezembro de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

Gabriela Pasqualim- FURG

Santiago Alonso Tobar - UFRGS

Ursula da Silveira Matte - UFRGS (orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço meus pais, Giovanni e Goreti, e minha irmã, Swami, por todo apoio e amor que me foi dado durante todo o longo período em que estive na faculdade, assim como durante toda minha vida.

Agradeço à minha orientadora Ursula pela orientação durante esta etapa e pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao meu coorientador Esteban por me aceitar no Centro de Terapia Gênica e sempre estar disposto a me ajudar durante o período de confecção deste trabalho.

Gostaria de agradecer também à minha namorada Bruna Reis e ao Santhiago por sempre estarem ao meu lado durante todos os momentos.

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Eureka!” (I found it!) but “That’s funny ...”

- Isaac Asimov

## RESUMO

Mucopolissacaridose tipo I é uma doença de depósito lisossomal, onde há deficiência na expressão da enzima alfa-L-iduronidase, responsável pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) dermatan e heparan sulfato. Tal acúmulo é responsável por diversas alterações fisiopatológicas multisistêmicas, sendo manifestações cardíacas e vasculares as principais responsáveis pela redução da expectativa de vida e morte de indivíduos afetados por esta mutação. O fator de transformação beta (TGF- $\beta$ ), quando ativo pela via independente de Smad, é responsável por alterações patogênicas em diversos tecidos, sendo possivelmente o responsável pela dilatação da raiz aórtica em animais knockout para o gene IDUA. Animais MPS I foram tratados dos 2 aos 6 meses com losartana potássica, um inibidor de AT1R e o bloqueador beta adrenérgico propranolol. Análises realizadas por PCR em tempo real nos animais controle, MPS I não tratados (n=2), animais tratados com Losartan (n=3) e propranolol (n=2) não apresentaram alterações significativas na expressão de TGF- $\beta$  no tecido aórtico.

Palavras-chave: Mucopolissacaridose. Raiz aórtica. TGF-beta. PCR em tempo real. AT1R.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I is a lysosomal deposit disease, in which there is deficiency in the alpha-L-iduronidase enzyme expression, responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs) dermatan and heparan sulfate. This buildup is responsible for various multisystem pathophysiological alterations, being cardiac and vascular manifestations the main ones responsible for the life and death expectancy reduction in the individuals affected by this mutation. The beta transformation factor (TGF- $\beta$ ) is responsible for pathogenic alterations in several tissues, possibly being the one responsible for the aortic root dilation in knockout animals for the IDUA gene. MPS I animals were treated from 2 to 6 months with potassium losartan, an AT1R inhibitor, and a beta-adrenergic blocker, propranolol. Real-time PCR analyzes on untreated control, MPS I (n=2), Losartan (n=3) and propranolol (n=2) treated animals showed no significant changes in TGF- $\beta$  expression in the aortic tissue.

Keywords: Mucopolysaccharidosis. Aortic root. TGF-beta. Real time PCR. AT1R.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fisiopatologia geral dos erros inatos do metabolismo.....	12
<b>Figura 2</b> - Vias de sinalização dependente e não dependente de Smad.....	17
<b>Figura 3</b> - Resultado da quantificação relativa da expressão de TGF- $\beta$ .....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação das mucopolissacarídeos.....	14
<b>Tabela 2</b> – Ciclagem utilizada durante ensaio por PCR em tempo real.....	26
<b>Tabela 3</b> – Primers utilizados para PCR quantitativo.....	26
<b>Tabela 4</b> – Resultados da quantificação de RNA por NanoDrop.....	27
<b>Tabela 5</b> – Valores médio das duplicatas, obtidos à partir do ensaio realizado por PCR em tempo real.....	28
<b>Tabela 6</b> - Resultado da expressão de TGF- $\beta$ em relação à expressão em animais controle...	29

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**DDL** – Distúrbio de depósito lisossomal

**EIM** – Erros inatos do metabolismo

**GAGs** – Glicosaminoglicanos

**IDUA** –  $\alpha$ -L-iduronidase

**MPS** – Mucopolissacaridoses

**MPS I** – Mucopolissacaridose tipo I

**HS** – Heparan Sulfato

**DS** – Dermatan Sulfato

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 LISSOSSOMOS E ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	11
1.2 DISTÚRBIOS DE DEPÓSITO LISSOSSOMAL .....	12
1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES .....	13
1.4 MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO I .....	14
1.4.1 MANIFESTAÇÕES CARDIOVASCULARES .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
4. TRABALHO EXPERIMENTAL EM FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO .....	20
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	34
REFERÊNCIAS .....	35
ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CARDIOVASCULAR RESEARCH .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

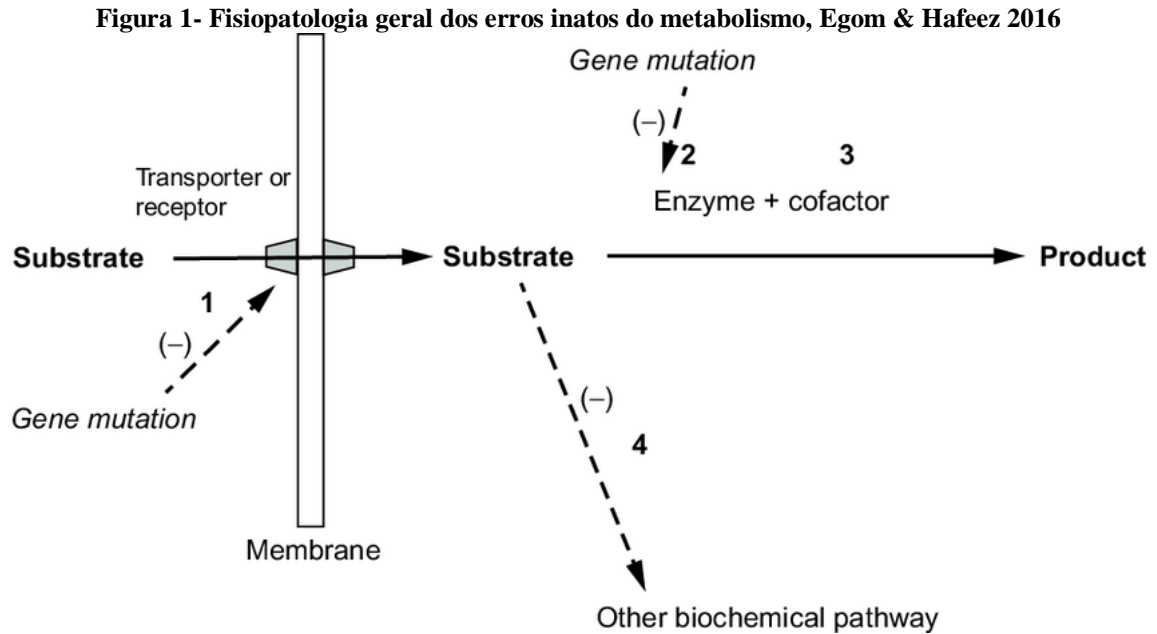
### 1.1 LISOSSOMOS E ERROS INATOS DO METABOLISMO

Lisossomos são organelas intracelulares revestidas por membrana, os quais contêm um conjunto de enzimas responsáveis pelo catabolismo de diversos tipos de polímeros biológicos, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. Os lisossomos atuam como um sistema de digestão celular, degradando os componentes celulares e partículas extracelulares internalizadas.

Todas as enzimas lisossomais são hidrolases, atuando em um pH ácido, diferente de grande maioria das demais enzimas celulares, onde estas atuam em um pH de 7,2. Esta diferença de pH é formada a partir da ação de uma bomba vacuolar de prótons presente na membrana lisossomal, fazendo com que prótons sejam bombeados para o lúmen do lisossomo, formando um gradiente de pH (ISHIDA, Y. et al. 2013). A diferença entre o pH ótimo de atividade das enzimas lisossomais e o pH citosol atua como forma de proteção, impedindo que ocorra degradação das demais organelas citoplasmáticas, uma vez que tais enzimas não apresentariam atividade no pH celular.

Genes responsáveis pela codificação de proteínas lisossomais, assim como diversos outros genes, podem ser afetados por mutações que alteram a expressão ou funcionamento protéico, alterando a função ou expressão de uma determinada proteína. Tais mutações podem ser decorrentes de diversos fatores, como exposições virais e fatores ambientais, causando alterações do genoma, podendo resultar em uma doença hereditária (Genetic Alliance, 2009).

Modificações estruturais ou de expressão decorrentes de uma alteração no genoma podem resultar na diminuição ou perda de atividade enzimática, causando um acúmulo crônico de um determinado substrato, causando também o bloqueio de uma via catabólica, impedindo a formação dos substratos das enzimas subsequentes (Figura 1).



Fonte: EGOM, E.; HAFEEZ, H. Biochemistry of Statins, 2016

Os erros metabólicos (EIM) são classificados de diversos modos, entretanto a mais utilizada, por apresentar uma melhor didática e maior aplicação clínica, é a classificação criada por Saudubray e Charpentier (SAUDUBRAY J.M, CHARPENTIER C, 1995). Esta divide os EIM em duas categorias, onde a segunda apresenta 3 grupos, por estes possuírem uma maior variabilidade em suas características fisiopatológicas e quadro clínico (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação clínica dos erros inatos do metabolismo

Categoria 1	Envolvendo o sistema funcional
Categoria 2	Afetando rotas metabólicas comuns
Grupo 1	Defeitos na síntese e catabolismo de moléculas complexas
Grupo 2	Defeitos do metabolismo intermediário
Grupo 3	Deficiência na produção ou utilização de energia

## 1.2 DISTÚRBIOS DE DEPÓSITO LISOSSOMAL

Os distúrbios de depósito lisossomal (DDL) são um grupo de doenças de grande heterogeneidade, estes distúrbios são causados por defeitos que comprometem a função lisossomal. Grande maioria das DDL ocorrem pela deficiência de hidrolases lisossomais, entretanto estas também podem ocorrer devido à deficiência em proteínas transportadoras na membrana lisossomal ou de outra proteína sem atividade enzimática (PLATT, F. M. et al.

2012). Tais doenças fazem parte de um grupo de mais de 50 alterações genéticas que são herdadas de forma autossômica recessiva ou ligada ao X (RIGANTE, D. et al. 2017).

As alterações nos genes codificantes de proteínas lisossomais são responsáveis pelos DDL. A mutação em tais genes causa uma metabolização e degradação anormal dos substratos dessas enzimas, prejudicando o transporte de lipídeos e metabólitos, causando um acúmulo progressivo de moléculas não degradadas no interior dos lisossomos.

A natureza bioquímica das moléculas acumuladas no interior lisossomal afetam de forma diferente o estado celular, pois estas possuem uma função distinta nos processos celulares. Tais características são em grande parte as responsáveis pelas diferentes apresentações clínicas das DDL. A severidade de cada DDL irá variar de acordo o grau de alteração proteica resultante da alteração genética e quais são os tecidos afetados. Tais alterações resultam, de modo geral, em neurodegeneração, cardiomiopatias e hepatoesplenomegalia (STARETZ-CHACHAM et al. 2009).

### 1.3 MUCOPOLISSACARIDOSES

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças de depósito lisossomal causadas pela deficiência total ou parcial de enzimas responsáveis pela degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). A degradação incompleta destes polissacarídeos causa um acúmulo progressivo nos lisossomos, sendo responsável por causar danos celulares, comprometimento de diversos órgão e uma redução na expectativa de vida (COUTINHO, M. F. et al. 2012). A deficiência enzimática em uma determinada MPS é caracterizada pelo aumento dos níveis de GAGs na urina, sangue e líquido cefalorraquidiano (KHAN, S.A. et al, 2017).

Atualmente as MPS são classificadas de acordo com a enzima afetada e o tipo específico de GAGs acumulados (Tabela 1), sendo a MPS I a mais estudada até o momento. Com exceção da MPS II, todas MPS são distúrbios herdados de forma autossômica recessiva, afetando de forma equivalente ambos os sexos.

**Tabela 1 - Classificação das mucopolissacaridoses, Adaptado de Neufeld e Muenzer (2001).**

<b>Tipo</b>	<b>Nome</b>	<b>Enzima afetada</b>	<b>GAG afetado</b>
MPS IH	Hurler	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan sulfato, Heparan sulfato
MPS IS	Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan sulfato, Heparan sulfato
MPS IH/S	Hurler-Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan sulfato, Heparan sulfato
MPS II (GRAVE)	Hunter (grave)	Iduronato sulfatase	Dermatan sulfato, Heparan sulfato
MPS II (LEVE)	Hunter (leve)	Iduronato sulfatase	Dermatan sulfato, Heparan sulfato
MPS IIIA	Sanfilippo A	Heparan N-sulfatase	Heparan sulfato
MPS IIIB	Sanfilippo B	$\alpha$ -N-Acetyl-glucosaminidase	Heparan sulfato
MPS IIIC	Sanfilippo C	Heparan- $\alpha$ -glucosaminidase N-acetiltransferase	Heparan sulfato
MPS IIID	Sanfilippo D	N-acetilglucosamina 6-sulfatase	Heparan sulfato
MPS IVA	Morquio A	Galactose 6-sulfatase	Keratan sulfato, condroitina-6-sulfato
MPS IVB	Morquio B	$\beta$ -Galactosidase	Keratan sulfato
MPS VI	Moroteaux-Lamy	N-Acetylgalactosamine 4-sulfatase	Dermatan sulfato
MPS VII	Sly	$\beta$ -Glucuronidase	Dermatan sulfato, heparan sulfato, condroitina-4,6- sulfato
MPS IX	-	Hialuronidase	Ácido hialurônico

#### 1.4 MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO I

A MPS I é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene *Idua*, localizado no cromossomo 4p16.3 (UTTARILLI, A. et al. 2016), onde a alteração mais comum é a mutação non-sense p.Trp402Ter, possuindo uma frequência de 1.47 a cada 100.000 nascidos vivos, para MPS I. Esta mutação é uma das mais de 200 responsáveis pela alteração da expressão *IDUA* (POLETTI, E. et al. 2018), uma hidrolase lisossomal responsável pela degradação dos GAGs sulfato de dermatan (DS) e sulfato de heparan (HS). A deficiência na expressão de *IDUA* leva a um acúmulo crônico destes substratos, gerando um quadro patológico multissistêmico e progressivo.

A MPS I possui um amplo espectro clínico, sendo classificada de acordo com a apresentação clínica em três principais síndromes. Este amplo espectro ocorre graças à variabilidade na expressão de *IDUA* causado devido ao grande número de mutações genéticas responsáveis pela alteração na expressão deste gene. s a proteínas G como o Na forma grave da doença, conhecida como Síndrome de Hurler, pessoas afetadas apresentam manifestações



durante o primeiro ano de vida, como hérnia umbilical e infecções do trato respiratório superior, apresentando manifestações clínicas específicas após 1 ano de idade. O quadro clínico geralmente apresenta deformidades na região inferior da coluna, alterações ósseas (PARINI, R. et al, 2017), estenose das artérias coronárias e aórtica, hepatoesplenomegalia e comprometimento do sistema nervoso central, geralmente causando a morte na primeira década de vida.

A síndrome de Scheie é a forma atenuada da MPS I. Os pacientes com Síndrome de Scheie geralmente possuem uma expectativa de vida normal e não apresentam alterações neurocognitivas. Já os indivíduos com Síndrome de Hurler-Scheie apresentam um fenótipo intermediário entre as síndromes de Hurler e Scheie (BRAUNLIN, E. et al. 2011).

Entretanto, o gene responsável pela IDUA possui um grande número de mutações alélicas, onde cada combinação atua de forma diferente na expressão protéica. Isso faz com que a doença apresente um espectro clínico contínuo, fazendo com que haja indivíduos que não se encaixem em uma determinada síndrome (CHKIOUA, L. et al. 2011).

Os diferentes fenótipos são indistinguíveis bioquimicamente por exames de rotina, pois todos apresentam um aumento nos níveis de sulfato de dermatan e heparan sulfato na urina e diminuição ou ausência da atividade de IDUA. (CLARKE L.A., 2016). Por não ser aparente durante o primeiro ano de vida e pela grande heterogeneidade de sintomas a MPS I geralmente não é diagnosticada de forma precoce, isso faz com que ocorra uma redução da eficácia dos tratamentos disponíveis.

Os tratamentos atuais incluem a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). O tratamento por TRE é realizado com o uso intravenoso de IDUA, expressa de forma recombinante à partir de células de hamster chinês, onde é realizada reposição periódica. Esta forma de terapia foi aprovada em 2005 no Brasil, sendo esta a terapia de escolha para pacientes que apresentam uma fenótipo atenuado (GIUGLIANI, R. et al. 2010). Entretanto há estudos que buscam outras alternativas, como a microencapsulação de células recombinantes superexpressando, onde há uma redução significativa no acúmulo de GAGs tecidual(LIZZI LAGRANHA, V. et al. 2017).

O tratamento por TCTH é realizado em pacientes mais graves nas quais geralmente há uma maior comprometimento neurológico. A taxa de sucesso depende de diversos fatores, como idade de adesão ao tratamento e comprometimento cardiopulmonar no momento do transplante. O TCTH aumenta a expectativa de vida, reduz o declínio cognitivo e hepatoesplenomegalia. Contudo o TCTH necessita de um doador compatível, podendo ocorrer

complicações graves de compatibilidade após o transplante, aumentando em 20% o risco de mortalidade (COX-BRINKMAN, J. et al. 2006).

Apesar dos tratamentos por TRE e TCTH apresentarem uma melhora significativa em sintomas como hepatoesplenomegalia e infecções da via respiratória superior, não há regressão ou queda na progressão de alguns dos sintomas cardiovasculares, ósseos e cerebrais (ALDENHOVEN, M. 2008)

#### 1.4.1 Manifestações cardiovasculares

Indivíduos com MPS apresentam alterações multisistêmicas, entretanto alterações cardiovasculares em pessoas com MPS I, especialmente em casos de Síndrome de Hurler, apresentam modificações fisiopatológicas que contribuem para um aumento significativo na morbidade e mortalidade. Alterações cardiovasculares como espessamento dos folhetos e músculos papilares da válvula mitral, regurgitação da válvula aórtica, hipertrofia cardíaca (PALPANT, N. et al. 2011), dilatação da raiz aórtica (POSWAR, F. et al. 2019) e estenose da artéria coronária (BRAUNLIN, E. et al. 2011) pelo depósito de GAGs na túnica íntima são comuns.

#### 1.5 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E TGF-B

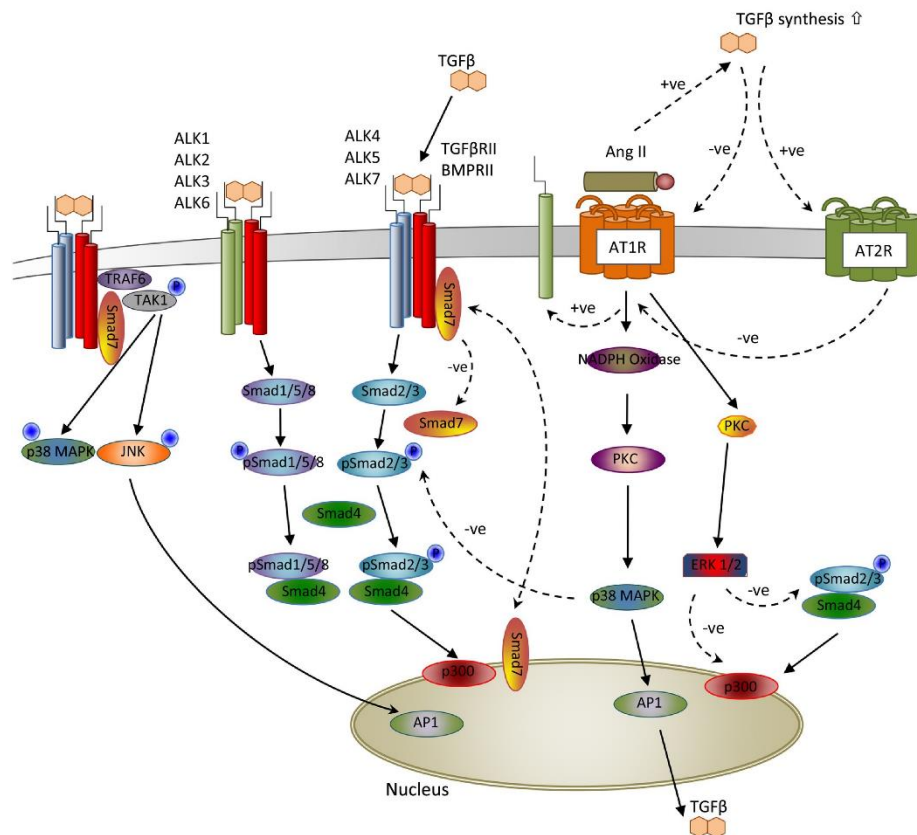
O sistema renina-angiotensina (RAS) é responsável pela regulação da pressão sanguínea. A angiotensina II atua principalmente através da interação com os receptores associados a proteínas G, como o receptor angiotensina tipo I (AT1R) (HABASHI, J.P. et al. 2011). Nesse cenário, a ativação de AT1R é responsável pela ativação de diversas vias envolvidas na secreção de citocinas e no aumento da expressão de metaloproteinase de matriz (NAGASAWA, A. et al. 2013) e na contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos periféricos, aumentando a pressão arterial. Acredita-se que o aumento da atividade de RAS pode estar relacionado com o aumento da expressão de TGF- no coração e arco aórtico, sendo a responsável pela dilatação do miocárdio, raiz aórtica e espessamento das válvulas cardíacas (FIELITZ, J. et al. 2001).

O TGF- $\beta$  faz parte de uma família de citocinas envolvidas no desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual e o desenvolvimento de características patofisiológicas,

como alteração na proliferação e diferenciação celular, apoptose, apoptose e remodelamento da matriz extracelular (ZHANG, Y. et al. 2017).

A ativação de TGF- $\beta$  pode ser realizado por sua canônica (clássica) ou pela via não canônica (alternativa). A ativação da via clássica ocorre pela ligação de TGF- $\beta$  com os receptores de TGF 1 e 2, formando um heterodímero. Este é o responsável pela formação de um complexo entre a Smad 1, 2 e 4, causando fosforilação dos fatores de transcrição Smad, responsáveis pela regulação da expressão gênica após sua translocação para o núcleo, sendo estas responsáveis pela transdução do sinal para os receptores do fator de ativação de transcrição (ATF2) e elementos obrigatórios de Smad (SBE). A via independente de Smad, não canônica, ocorre pela ativação direta de cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), sendo um de seus alvos a TGF- $\beta$  ativada por cinase (TAK1) (figura 2), tendo esta, possivelmente, um papel no desenvolvimento das características patológicas do músculo cardíaco (WATKINS, S. J. et al. 2012).

**Figura 2 – Vias de sinalização dependente e não dependente de Smad.**



Fonte: adaptado de YU, C.; JEREMY, R. W. Angiotensin, transforming growth factor  $\beta$  and aortic dilatation in Marfan syndrome: Of mice and humans, 2018.

Losartan, um pró- fármaco metabolizado pelo fígado, gera dois metabólitos, EXP3174 e EXP3179, sendo o primeiro destes o responsável pelo bloqueio do receptor AT1, sendo o responsável pela atividade anti-hipertensiva deste fármaco. Trabalhos prévios tem demonstrado que o tratamento com Losartan, é responsável pela melhora da função cardíaca e redução da dilatação da raiz aórtica no modelo animal de MPS I (GONZALEZ, E.A. et al.2017; OSBORN. M.J. et al. 2017). Enquanto o tratamento com propranolol apresentou melhora da função cardíaca, não reduzindo a dilatação aórtica (GONZALEZ, E.A. et al. 2017).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os problemas cardiovasculares são comuns em pacientes com MPS. No entanto, as alterações cardiovasculares observadas na MPS I mostram, de uma forma geral, maior morbidade em relação com os demais tipos de MPS (BRAUNLIN, E. et al, 2011). A autópsia de portadores de MPS I que morreram devido complicações cardiovasculares mostrou que há alterações fisiopatológicas significativas das válvulas cardíacas e arteriais (YANO, S. et al, 2013).

Além das alterações patológicas no músculo cardíaco, os pacientes com MPS I apresentam uma dilatação significativa da raiz aórtica causada geralmente pela degeneração e migração de células da túnica média para a túnica íntima e pelo rompimento das fibras elásticas, presentes principalmente na túnica média, podendo resultar na formação de um aneurisma (MA, X. et al. 2008).

Embora os mecanismos responsáveis pelas alterações cardiovasculares em MPS I ainda não tenham sido totalmente elucidados, sabe-se que diferentes fatores neuro-hormonais, como a angiotensina II e  $\beta$ -arrestina estão envolvidos na ativação e dessensibilização dos receptores de membrana acoplado à proteína G, sendo estes responsáveis pelo remodelamento cardíaco patológico (XU, J. et al. 2010).

O músculo cardíaco de pacientes portadores de MPS tem mostrado um aumento significativo na expressão da via de TFG- $\beta$ , podendo ser este um dos responsáveis pelas alterações cardiovasculares o que resulta no aumento da morbidade e mortalidade de tais indivíduos (BRAUNLIN, E. et al. 2011). Entretanto, ainda não se sabe se há alteração na expressão gênica de TFG- $\beta$  no tecido aórtico, onde há também mudanças fisiopatológicas relacionadas a morbidade e mortalidade de indivíduos com MPS I.

Estudos realizados com animais modelo para MPS-I tratados com Losartan mostraram uma redução significativa do diâmetro do arco aórtico em relação a animais não tratados e uma melhora da função cardíaca em relação aos animais controle (GONZALEZ, E.A. 2017).

Este estudo pretende avaliar se há alteração na expressão de TGF- $\beta$  em animais *knockout* para *Idua* e se há redução da ativação de TGF- $\beta$  em animais MPS I tratados com Losartan e propranolol.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar se há alteração na expressão de TGF- $\beta$  na raiz da aorta de animais MPS I tratados e não tratados com Losartan® e propranolol.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Tratar animais MPS I com Losartan e Propranolol dos 2 até os 6 meses de idade.
- Análisar a expressão de TGF- $\beta$  na aorta de animais normais, MPS I não tratados e MPS I tratados com Losartan e Propranolol.

#### **4. TRABALHO EXPERIMENTAL EM FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO**

**Título:** Análise da expressão de  $\text{tgf-}\beta$  da raiz da aorta em modelo murino de MPS I tratados com losartan e propranolol

**Periódico:** Cardiovascular Research, normas disponíveis em Anexo I

## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TGF-B DA RAIZ DA AORTA EM MODELO MURINO DE MPS I TRATADOS COM LOSARTAN E PROPRANOLOL**

Giuseppe Ávila Testa<sup>1,2\*</sup>, Esteban Alberto Gonzales<sup>1,3</sup>, Ursula da Silveira Matte<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Terapia Gênica, Hospital de Clínicas, Brasil.

<sup>2</sup>Aluno de Graduação em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup> Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\* Autor correspondente: Giuseppe Ávila Testa, Centro de Terapia Gênica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350. Tel.: +55 (51) 3359.8838. E-mail: giuseppeavilatesta@hotmail.com

## Resumo

Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença de depósito lisossomal, onde há o acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) dermatan e heparan sulfato devido a mutações no gene *Idua*, que codifica a enzima lisossômica alfa-L-iduronidase (IDUA). Indivíduos com MPS I apresentam alterações cardíacas e vasculares, sendo estas as principais responsáveis pela redução da expectativa de vida dos pacientes afetados. O TGF- $\beta$ , quando ativo pela via independente de Smad, é responsável por modificações patológicas em diversos tecidos, sendo possivelmente o responsável pela alteração no diâmetro aórtico em animais *knockout* para o gene *Idua*. Neste estudo, animais MPS I foram tratados dos 2 aos 6 meses utilizando-se losartana potássica, um inibidor do receptor AT1R, e propranolol, um bloqueador beta-adrenérgico. Análises realizadas por PCR em tempo real nos animais controle, MPS I não tratados (n=2), animais tratados com Losartan (n=3) e propranolol (n=2) não apresentaram alterações significativas na expressão de TGF- $\beta$  no tecido aórtico.

## 1. Introdução

A MPS I é uma doença de depósito lisossomal causada pela deficiência da enzima IDUA, o que leva a um acúmulo intracelular de heparan sulfato (HS) e dermatan sulfato (DS) parcialmente degradados [5]. Pacientes com essa doença apresentam problemas cardiovasculares com alterações fisiopatológicas como hipertrofia cardíaca, espessamento das válvulas cardíacas e dilatação da raiz aórtica. Os mecanismos responsáveis por essas alterações ainda não está completamente esclarecido, entretanto se sabe que há um aumento na expressão de TGF- $\beta$  no coração de pacientes portadores de MPS I [13].

Esse aumento da expressão de TGF- $\beta$  pode estar relacionada à dilatação da raiz aórtica em indivíduos com MPS I devido a uma alteração da sinalização por Angiotensina II (AT2). Esta sinalização na parede dos vasos sanguíneos é responsável pelo estímulo proliferativo das células do músculo liso vascular e fibrose da parede vascular [9], o que nos indivíduos com MPS pode gerar uma diferente resposta celular, com maior presença de células derivadas da crista neural e do mesoderma, gerando uma predisposição à dilatação da raiz aórtica [8]. Losartan atua como um antagonista do receptor AT1R, um dos receptores do sistema renina-



angiotensina. A ativação deste receptor causa o aumento da expressão de metaloproteinases de matriz e secreção de citocinas [7]. O uso deste antagonista em animais *knockout* para *Idua* mostrou uma melhora das funções cardíacas [12] e uma redução significativa do diâmetro do arco aórtico em relação aos animais não tratados [6]. Porém o tratamento com propranolol, um anti-hipertensivo competitivo que atua como um bloqueador beta-adrenérgico, também levou a uma melhora da função cardíaca, contudo sem reduzir a dilatação aórtica [6]

Já que apenas Losartan teve efeito sobre o diâmetro da aorta, as vias bloqueadas por estes fármacos devem ser diferentes. AT1 ativa TGF- $\beta$ , portanto o bloqueio de AT1 com Losartan reduziria TGF- $\beta$ . Assim, a análise da expressão de TGF- $\beta$  em animais tratados com um anti-hipertensivo que não atue através do bloqueio de AT1, como propranolol, pode auxiliar a desvendar os mecanismos associados a seus efeitos sobre a função cardíaca de pacientes com MPS I, uma vez que ambos atuam através do bloqueio de receptores de membrana acoplados à proteína G [4].

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Animais

Os camundongos normais (*Idua*<sup>+/+</sup>) e MPS I (*Idua*<sup>-/-</sup>) foram doados pela Dr Elizabeth Neufeld, UCLA. Após o genotipagem os animais foram divididos em grupos a seguir:

- 1) Grupo Normal: Camundongos *Idua*<sup>+/+</sup> machos em tratamento (n=6).
- 2) Grupo MPS I: Camundongos *Idua*<sup>-/-</sup> machos sem tratamento (n=6).
- 3) Grupo MPS I + Losartan: Camundongos *Idua*<sup>-/-</sup> machos tratados com o Losartan 0,6g/L na água de beber a partir dos 2 meses de idade (n=5).
- 4) Grupo MPS I + Propranolol: Camundongos *Idua*<sup>-/-</sup> machos tratados com o propranolol 0,5g/L na água de beber a partir dos 2 meses de idade (n=4).

### 2.2 Tratamento

O tratamento com Losartana potássica (50mg/comprimido) foi realizado a partir da dissolução dos comprimidos à uma concentração de 0,6 g/L em água de beber dos animais, tendo início quando os animais apresentavam dois meses de idade. Tratamento com propranolol

(40mg/comprimido) foi realizado em uma concentração de 0,5 g/L em água de beber dos animais, tendo início aos dois meses.

O uso de animais neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, projeto 17-0590, utilizando-se o seguinte número de animais machos para o estudo: 6 animais controle, 6 animais MPS I, 5 animais para tratamento com Losartan, 4 animais para tratamento com propranolol.

### 2.3 Coleta do tecido da raiz aórtica

Eutanásia foi realizada aos 6 meses em todos os animais, a partir da administração de uma sobredose do anestésico inalatório isoflurano.

A coleta do tecido foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais, sendo realizado com o auxílio de uma lupacom subsequente armazenamento dos tecidos em freezer-80 °C.

### 2.4 Extração de RNA

#### 2.4.1 Preparo da amostra

Todos tecidos foram previamente pesados, apresentando peso entre 0,1 e 4,5 mg. As amostras foram homogeneizadas em gelo, utilizando-se 250 µL de TRIzol™, um reagente disponibilizado pela Thermo Fisher Scientific®, usado para isolamento de DNA, RNA e proteínas.

As amostras foram maceradas com auxílio de um homogeneizador manual para microtubos, sendo posteriormente encubados em temperatura ambiente por um período de 5 minutos.

Após este período foram adicionados 50 µL de clorofórmio, facilitando a separação de fases pela desnaturação proteica, e incubada por dois minutos a temperatura ambiente. A amostra foi então centrifugada por 15 minutos à 12.000 g, formando uma mistura trifásica.

#### 2.4.2 Isolamento do RNA

A precipitação do RNA foi feita à partir da transferência da fração superficial da mistura para um novo microtubo, adicionando-se 0,125 mL de isopropanol e incubando-se à temperatura ambiente por 10 minutos.

A amostra foi, então, centrifugada por 10 minutos a 12.000 g, formando um pellet de aspecto gelatinoso, sobrenadante foi removido com o uso de uma pipeta, removendo o líquido a partir da face oposta ao pellet. O pellet contendo RNA foi ressuspenso em etanol 75 %, foi adicionado 1 µL de glicogênio visando aumentar a quantidade de RNA precipitado, após ressusensão foi realizada centrifugação por 15 minutos à 12.000 RPM, utilizando-se uma pipeta, o álcool foi removido e seco durante 10 minutos. O RNA foi ressuspenso em água livre de nucleases armazenado em -80 ° C.

Para confirmação da integridade do RNA isolado, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1.5% utilizando-se Sybr Gold™ (Thermo Fisher Scientific®), 1 µL de RNA foi homogeneizado com 1 µL de Syber, eletroforese foi realizada durante um período de 20 minutos a 20 Volts.

Para verificação da concentração e pureza do RNA extraído do tecido aórtico foi realizada uma análise com NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific®), amostras de alta pureza possuem uma razão A260/A280 de aproximadamente 2.0.

#### 2.4.3 Conversão a cDNA

Após o isolamento do RNA, as amostras foram tratadas com DNase I (Thermo Fisher Scientific®), remover uma possível contaminação das amostras com DNA. O tratamento foi realizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para transcrição reversa de RNA em cDNA foi utilizado High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific®), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas no volume final de 20 µL, utilizando-se as soluções e instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando o termociclador Veriti™ (Thermo Fisher Scientific®).

#### 2.4 PCR em tempo real

Ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, utilizando-se PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando-se a ciclagem descrita na tabela 2 e primers descritos na tabela 3. A reação foi preparada com 5 µL 2x SYBR Green Master Mix, 1 µL 200 µM de cada primer e 3 µL de amostra ou água ultrapura tratada com

DEPC, sendo realizadas em duplicatas no equipamento QuantStudio 3™ (Thermo Fisher Scientific®), para temperatura de anelamento acima de 60 °C, de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 2 - Ciclagem utilizada durante ensáio por PCR em tempo real**

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclo
Ativação de UDG	50°C	2 minutos	Manter
Dual-Lock™ DNA polimerase	95 °C	2 minutos	Manter
Desnaturação	95 °C	15 segundos	40
Anelamento/Extensão	60 °C	1 minuto	

A eficiência dos primers se apresentou em aproximadamente 95%, o teste foi realizado a partir da diluição seriada de uma amostra de cDNA de coração de um animal controle, onde foram realizadas diluições seriadas da amostra, com intuito de determinar a eficiência de amplificação dos primers utilizados.

**Tabela 3 - Primers utilizados para PCR quantitativo**

Primers	Sequência
Gapdh forward	5`-CCCATCACCATCTTCCAGG-3`
Gapdh reverse	5`-GAGATGATGACCCTTTTGGC-3`
TGF-β forward	5`-GGACCTGGGTTGGAAGTGGAT-3`
TGF-β reverse	5`-TGTGTCCAGGCTCCAAATATAGG-3`

A quantificação relativa foi obtida a partir de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde foi utilizada a média entre os diferentes grupos, sendo calculado conforme as equações a seguir.

$$Média Ct = \frac{\sum Ct grupo}{N grupo}$$

$$\Delta Ct grupos = Média duplicata Ct tgfb - Média duplicata Ct gapdh$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct tratamentos - \Delta Ct controle$$

$$Fold Change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 2.5 Análises estatísticas

Os resultados de *fold-change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) foram analisados utilizando-se Anova com teste de Tukey, para  $p \geq 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1 Eletroforese

Eletroforese mostrou que amostras com um menor peso tecidual ou que apresentaram menores valores durante a quantificação por NanoDrop™ apresentaram bandas menos evidentes quando comparadas com amostras que apresentaram com uma maior quantidade de tecido e concentração de RNA, houveram também amostras que apresentaram degradação de RNA.

### 3.2 Quantificação de RNA por NanoDrop™.

Os dados obtidos à partir da quantificação de RNA foram utilizados para realizar conversão de RNA em cDNA, as amostras foram diluídas em um volume final de 10  $\mu$ L, utilizando-se 1 ng de RNA para normalização da conversão de cDNA.

Diversas amostras apresentaram uma razão 260/280 inferior à 2, indicando que a presença de proteínas ou outros contaminantes que possuam uma absorvância próxima à 280 nm. Os valores de 260/230 também se apresentaram baixos, indicando a presença de contaminantes que possuem um absorvância próxima à 230. O reagente TRIzol™, assim como glicogênio utilizados durante a extração e purificação de RNA apresentam absorvância próximas de 230, podendo ser contaminantes.

**Tabela 4 - Resultados da quantificação de RNA por NanoDrop™.**

Normais	ng RNA /ul	260/280	260/230
---------	------------	---------	---------

	37,05	1,85	1,23
	29,38	1,77	1,38
	39,28	2,04	0,17
	11,43	1,71	0,12
	33,39	1,58	1,42
	40,34	1,8	1,09
	127,99	1,97	0,49
	91,45	2,03	0,28
MPS I	154,57	2,01	0,47
	126,18	1,73	0,7
	39,5	1,92	0,21
	198,97	1,78	1,31
	25,83	1,71	1,09
	130,83	1,9	1,85
Losartan	115,91	1,79	1,55
	91,47	1,73	0,94
	72,27	1,67	0,82
	54,45	1,68	0,49
	169,72	1,83	1,18
Propranolol	66,06	1,69	0,62
	21,4	1,69	0,12

### 3.3 Análise da expressão de TGF- $\beta$ por PCR em tempo real.

Os valores de  $\Delta Ct$  (tabela 5) foram calculados à partir das médias das duplicatas dos valores de Ct para TGF- $\beta$  obtidas durante a quantificação por PCR em tempo real, normalizando a expressão de TGF- $\beta$  em relação ao gene housekeeping GAPDH, entretanto duas amostras do grupo MPS I não apresentaram amplificação.

**Tabela 5 - Valores médio das duplicatas, obtidos à partir do ensaio realizado por PCR em tempo real**

Grupo	Média Ct - TGFB	Média Ct - GAPDH	$\Delta Ct$
Controle	28,6181	20,5571	8,0610
	28,1473	21,1380	7,0093
	27,6089	21,0460	6,5628
	30,8331	25,4564	5,3766
	29,5565	23,1310	6,4255

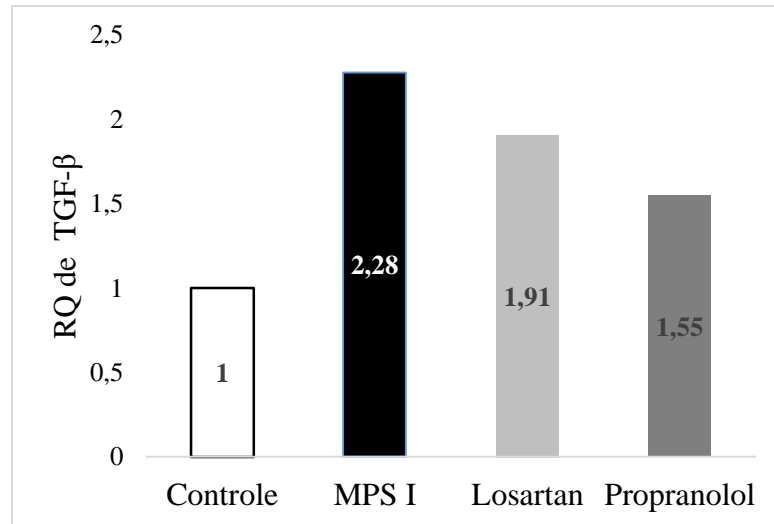
	33,6167	35,6520	-2,0353
MPS I	28,8381	27,4264	1,4117
	27,1171	21,7781	5,3389
	29,9331	30,0033	-0,0702
	25,6380	19,7681	5,8699
	32,9505	-	-
	31,9467	-	-
Losartan	27,3827	21,0749	6,3078
	25,9306	19,6071	6,3235
	30,0884	25,2677	4,8208
	28,5491	29,2780	-0,7288
	30,5403	30,3053	0,2350
Propranolol	32,4490	32,0941	0,3549
	25,5479	19,7132	5,8347
	30,3067	28,9284	1,3783
	31,8137	25,3788	6,4349

Foi realizada a exclusão das amostras que apresentavam valores médios de GAPDH acima de 25,5. Isto foi feito para evitar análises de amostras onde haveria possíveis ampliações inespecíficas e formação de dímeros de primers. Reduzindo o número de amostras de animais controle (n=5), MPS I (n=2), tratados com Losartan (n=3) e propranolol (n=2).

**Tabela 6 - Resultado da expressão de TGF- $\beta$  em relação à expressão em animais controle.**

Grupos	Controle	MPS I	Losartan	Propranolol
GAPDH	22,26	20,8	22	22,55
TGF- $\beta$	29	26,35	27,8	28,65
$\Delta$ Ct	6,74	5,55	5,8	6,1
$\Delta\Delta$ Ct	1	-1,19	-0,94	-0,64
$2^{-\Delta\Delta}$ Ct	1	2,28	1,91	1,55

**Figura 3: Resultado da quantificação relativa da expressão de TGF- $\beta$**



Após análise estatística de anova com teste de tukey ( $p \geq 0,05$ ), resultados obtidos do tecido da raiz aórtica indica que não há diferença estatística entre nenhum dos grupos.

## 5. Discussão

Assim como grande maioria dos EIM, MPS I apresenta uma grande variabilidade na apresentação e progressão de seu quadro clínico, onde a severidade pode estar relacionada com os alelos apresentados em cada indivíduo e conseqüentemente responsável pela alteração na expressão de IDUA.

Indivíduos com MPS apresentam diversas alterações cardiovasculares responsáveis pela redução da qualidade e expectativa de vida [3]. MPS I tem sido alvo de diversos estudos que buscam alternativas para o tratamento das alterações fisiopatológicas relacionadas ao sistema cardiovascular. Além das alterações cardíacas, pessoas com MPS I apresentam hepatoesplenomegalia, alterações no tecido cartilaginoso, ósseo, cerebrais e dilatação no tecido aórtico, levando ao aumento da mortalidade em indivíduos afetados [2]. Os tratamentos disponíveis atualmente, apesar de impedirem a progressão de alguns aspectos clínicos não apresentam uma melhora nas alterações cardiovasculares [1].

O aumento da expressão de TGF- $\beta$  pode estar relacionado com tal alteração, sendo responsável pela degeneração e migração de células para a túnica média e rompimento de fibras de elastina [11], causando uma predisposição à dilatação aórtica [8].

A análise da expressão de TGF- $\beta$  foi realizada a partir da quantificação relativa, onde é avaliado a relação do Ct obtido a partir da amplificação de *TGF- $\beta$*  em relação à amplificação do gene *GAPDH*, responsável pela síntese de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma



enzima essencial para o metabolismo da glicose. GAPDH é comumente utilizado como gene housekeeping para normalização da análise de expressão gênica, pois é expressa de forma constitutiva [10]

Os resultados obtidos à partir da análise mostraram que a expressão de TGF- $\beta$  não apresentou alterações significativas entre os os animais MPS I, tratados com Losartan e propranolol, em relação aos animais do grupo controle

O receptor AT1 é responsável pela regulação da expressão de ligantes, receptores e ativadores de TGF- $\beta$  [8]. O bloqueio deste receptor com faz com que haja o bloqueio da expressão de TGF- $\beta$  pela via dependente de AT1R em animais MPS I tratados. O uso de Losartan se mostrou capaz de melhorar a função cardíaca e reduzir a dilatação do arco aórtico em animais tratados [6], entretanto a expressão de TGF- $\beta$  não apresentou alterações significativas no tecido aórtico de animais MPS I, tratados com Losartan e propranolol, indicando TGF- $\beta$  não é responsável pelas alterações fisiopatológicas no tecido aórtico de animais MPS I.

Entretanto, durante o desenvolvimento deste estudo algumas das análises de amostras de tecido aórtico de animais MPS I e MPS I tratados com Losartan ou propranolol tiveram que ser excluídas dos resultados, pois apresentaram valores de Ct acima de 25,5, o que pode indicar uma má qualidade do RNA. A variação dos valores de  $\Delta$ Ct de GAPDH apresentaram uma grande variação, isto pode ter sido causado pela utilização de uma baixa quantidade inicial de RNA, devido o pequeno peso inicial das amostras coletadas para análise. Também foi observado através de eletroforese que houveram amostras que apresentavam baixa fluorescência e uma possível degradação de RNA, interferindo na análise da expressão gênica de TGF- $\beta$ . Isto fez com que o número final de animais por grupo fosse reduzido, podendo afetar a análise comparativa da expressão gênica de TGF- $\beta$ .

## Referências

- [1] ALDENHOVEN, M.; BOELENS, J.; DE KONING, T. J. The Clinical Outcome of Hurler Syndrome after Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, n. 5, p. **485-498**, 2008.
- [2] BALDO, G.; LORENZINI, D. M.; SANTOS, D. S.; MAYER, F. Q. et al. Shotgun proteomics reveals possible mechanisms for cognitive impairment in Mucopolysaccharidosis I mice. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114, n. 2, p. **138-145**, 2015/02/01/ 2015.
- [3] BRAUNLIN, E. A.; HARMATZ, P. R.; SCARPA, M.; FURLANETTO, B. et al. Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis*, 34, n. 6, p. **1183-1197**, Dec 2011.
- [4] DE ARAUJO, L. J. T.; NAGAOKA, M. R.; BORGES, D. R.; KOUYOUMDJIAN, M. Participation of hepatic  $\alpha^2$ -adrenoceptors and AT1 receptors in glucose release and portal hypertensive response induced by adrenaline or angiotensin II. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51, 2018.
- [5] GIUGLIANI, R.; FEDERHEN, A.; ROJAS, M. V.; VIEIRA, T. et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol*, 33, n. 4, p. **589-604**, Oct 2010.
- [6] GONZALEZ, E. A.; TAVARES, A. M.; POLETTO, E.; GIUGLIANI, R. et al. Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis*, 40, n. 3, p. **311-312**, May 2017.
- [7] GUO, Y.-S.; WU, Z.-G.; YANG, J.-K.; CHEN, X.-J. Impact of losartan and angiotensin II on the expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat vascular smooth muscle cells. *Molecular medicine reports*, 11, n. 3, p. **1587-1594**, 2015.
- [8] HABASHI, J. P.; JUDGE, D. P.; HOLM, T. M.; COHN, R. D. et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* (New York, N.Y.), 312, n. 5770, p. **117-121**, 2006.
- [9] BASHI, N.; DANNER, T.; ZAIMAN, A. L.; PINTO, Y. M. et al. Pivotal role of cardiomyocyte TGF- $\beta$  signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. *J Clin Invest*, 121, n. 6, p. **2301-2312**, Jun 2011

[10] KOUADJO, K. E.; NISHIDA, Y.; CADRIN-GIRARD, J. F.; YOSHIOKA, M. et al. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC genomics*, 8, p. **127-127**, 2007.

[11] MA, X.; TITTIGER, M.; KNUTSEN, R. H.; KOVACS, A. et al. Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab*, 94, n. 3, p. **298-304**, Jul 2008

[12] OSBORN, M. J.; WEBBER, B. R.; MCELMURRY, R. T.; RUDSER, K. D. et al. Angiotensin receptor blockade mediated amelioration of mucopolysaccharidosis type I cardiac and craniofacial pathology. *J Inherit Metab Dis*, 40, n. 2, p. **281-289**, Mar 2017.

[13] YANO, S.; LI, C.; PAVLOVA, Z. The transforming growth factor-Beta signaling pathway involvement in cardiovascular lesions in mucopolysaccharidosis-I. *J Inherit Metab Dis Rep*, 7, p. **55-58**, 2013.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diante do exposto, após a realização das análises de quantificação relativa da expressão de TGF- $\beta$  no tecido aórtico de animais MPS I, tratados com Losartan e propranolol observou-se que não há alterações significativas na expressão de TGF- $\beta$  entre os grupos. Assim é possível inferir que o TGF- $\beta$  não está diretamente relacionado com o aumento do diâmetro da raiz aórtica em animais MPS I. Entretanto, devido à redução do número de amostras durante a análise da expressão de gênica de TGF- $\beta$ , estudos com um número amostral maior deverão ser realizados para confirmar estes resultados.

## Referências

BOUSTANY, R. M. Lysosomal storage diseases--the horizon expands. **Nat Rev Neurol**, 9, n. 10, p. 583-598, Oct 2013.

BRAUNLIN, E. A.; HARMATZ, P. R.; SCARPA, M.; FURLANETTO, B. et al. Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. **J Inherit Metab Dis**, 34, n. 6, p. 1183-1197, Dec 2011.

CHKIOUA, L.; KHEDHIRI, S.; BEN TURKIA, H.; CHAHED, H. et al. Hurler disease (mucopolysaccharidosis type IH): clinical features and consanguinity in Tunisian population. **Diagn Pathol**, 6, p. 113, Nov 10 2011.

CLARKE, L. A. Mucopolysaccharidosis Type I. In: ADAM, M. P.;ARDINGER, H. H., et al (Ed.). GeneReviews((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle. **Clin. Genet.** (2016)

COUTINHO, M. F.; LACERDA, L.; ALVES, S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. **Biochem Res Int**, 2012, p. 471325, 2012.

COX-BRINKMAN, J.; BOELENS, J. J.; WRAITH, J. E.; O'MEARA, A. et al. Haematopoietic cell transplantation (HCT) in combination with enzyme replacement therapy (ERT) in patients with Hurler syndrome. **Bone Marrow Transplant**, 38, n. 1, p. 17-21, Jul 2006.

DE ARAUJO, L. J. T.; NAGAOKA, M. R.; BORGES, D. R.; KOUYOUMDJIAN, M. Participation of hepatic  $\alpha$ / $\beta$ -adrenoceptors and AT1 receptors in glucose release and portal hypertensive response induced by adrenaline or angiotensin II. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 51, 2018.

EGOM, E.; HAFEEZ, H. Biochemistry of Statins. **Advances in clinical chemistry**, 73, p. 127-168, 2016.

FEDERHEN, ANDRESSA; PASQUALIM, GABRIELA; DE FREITAS, TALITA; GONZALEZ, ESTEBAN et al. Estimated birth prevalence of Mucopolysaccharidoses in Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, no prelo 2020.

FIELITZ, J.; HEIN, S.; MITROVIC, V.; PREGLA, R. et al. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. **Journal of the American College of Cardiology**, 37, n. 5, p. 1443-1449, 2001/04/01/ 2001.

GENETIC ALLIANCE; The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals. Washington (DC): **Genetic Alliance**; 2009 Jul 8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK115563/>

GIUGLIANI, R.; FEDERHEN, A.; MUÑOZ ROJAS, M. V.; VIEIRA, T. A. et al. Terapia de reposição enzimática para as mucopolissacaridoses I, II e VI: recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 56, p. 271-277, 2010.

GIUGLIANI, R.; FEDERHEN, A.; ROJAS, M. V.; VIEIRA, T. et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genet Mol Biol**, 33, n. 4, p. 589-604, Oct 2010.

GONZALEZ, E. A.; TAVARES, A. M.; POLETTO, E.; GIUGLIANI, R. et al. Losartan improves aortic dilatation and cardiovascular disease in mucopolysaccharidosis I. **J Inherit Metab Dis**, 40, n. 3, p. 311-312, May 2017.

GUO, Y.-S.; WU, Z.-G.; YANG, J.-K.; CHEN, X.-J. Impact of losartan and angiotensin II on the expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat vascular smooth muscle cells. **Molecular medicine reports**, 11, n. 3, p. 1587-1594, 2015.

HABASHI, J. P.; DOYLE, J. J.; HOLM, T. M.; AZIZ, H. et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. **Science**, 332, n. 6027, p. 361-365, Apr 15 2011.

ISHIDA, Y.; NAYAK, S.; MINDELL, J. A.; GRABE, M. A model of lysosomal pH regulation. **J Gen Physiol**, 141, n. 6, p. 705-720, Jun 2013.

KHAN, S. A.; PERACHA, H.; BALLHAUSEN, D.; WIESBAUER, A. et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. **Mol Genet Metab**, 121, n. 3, p. 227-240, Jul 2017.

KOITABASHI, N.; DANNER, T.; ZAIMAN, A. L.; PINTO, Y. M. et al. Pivotal role of cardiomyocyte TGF- $\beta$  signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. **J Clin Invest**, 121, n. 6, p. 2301-2312, Jun 2011

LIZZI LAGRANHA, V.; ZAMBIASI MARTINELLI, B.; BALDO, G.; AVILA TESTA, G. et al. Subcutaneous implantation of microencapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase for mucopolysaccharidosis type I treatment. **J Mater Sci Mater Med**, 28, n. 3, p. 43, Mar 2017.

MA, X.; TITTIGER, M.; KNUTSEN, R. H.; KOVACS, A. et al. Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. **Mol Genet Metab**, 94, n. 3, p. 298-304, Jul 2008.

NAGASAWA, A.; YOSHIMURA, K.; SUZUKI, R.; MIKAMO, A. et al. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. **J Surg Res**, 183, n. 1, p. 472-477, Jul 2013.

OSBORN, M. J.; WEBBER, B. R.; MCELMURRY, R. T.; RUDSER, K. D. et al. Angiotensin receptor blockade mediated amelioration of mucopolysaccharidosis type I cardiac and craniofacial pathology. **J Inherit Metab Dis**, 40, n. 2, p. 281-289, Mar 2017.

PALPANT, N. J.; BEDADA, F. B.; PEACOCK, B.; BLAZAR, B. R. et al. Cardiac disease in mucopolysaccharidosis type I attributed to catecholaminergic and hemodynamic deficiencies. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 300, n. 1, p. H356-H365, 2011.

PARINI, R.; DEODATO, F.; DI ROCCO, M.; LANINO, E. et al. Open issues in Mucopolysaccharidosis type I-Hurler. **Orphanet J Rare Dis**, 12, n. 1, p. 112, Jun 15 2017.

PLATT, F. M.; BOLAND, B.; VAN DER SPOEL, A. C. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. **The Journal of cell biology**, 199, n. 5, p. 723-734, 2012.

POLETTI, E.; PASQUALIM, G.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U. et al. Worldwide distribution of common IDUA pathogenic variants. **Clinical Genetics**, 94, n. 1, p. 95-102, 2018.

POSWAR, F. d. O.; DE SOUZA, C. F. M.; GIUGLIANI, R.; BALDO, G. Aortic root dilatation in patients with mucopolysaccharidoses and the impact of enzyme replacement therapy. **Heart and Vessels**, 34, n. 2, p. 290-295, 2019/02/01 2019.

RIGANTE, D.; CIPOLLA, C.; BASILE, U.; GULLI, F. et al. Overview of immune abnormalities in lysosomal storage disorders. **Immunol Lett**, 188, p. 79-85, Aug 2017.

SAUDUBRAY JM, CHARPENTIER C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS, Valle D. **The metabolic and molecular bases of Inherited Disease**. 7th ed. New York: McGraw-Hill Inc; 1995. p.327-400

MARTINS AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. Sao Paulo Med J/Rev Paul Med 1999; 117(6):251-65. University of Washington, Seattle. **GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle**. All rights reserved.1993.

SCOTT, H. S.; ANSON, D. S.; ORSBORN, A. M.; NELSON, P. V. et al. Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88, n. 21, p. 9695-9699, Nov 1 1991.

STARETZ-CHACHAM, O.; LANG, T. C.; LAMARCA, M. E.; KRASNEWICH, D. et al. Lysosomal storage disorders in the newborn. **Pediatrics**, 123, n. 4, p. 1191-1207, Apr 2009.

UTTARILLI, A.; RANGANATH, P.; MATTA, D.; MD NURUL JAIN, J. et al. Identification and characterization of 20 novel pathogenic variants in 60 unrelated Indian patients with mucopolysaccharidoses type I and type II. **Clinical Genetics**, 90, n. 6, p. 496-508, 2016.

WATKINS, S. J.; BORTHWICK, G. M.; OAKENFULL, R.; ROBSON, A. et al. Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro is TAK1-dependent and Smad2/3-independent. **Hypertens Res**, 35, n. 4, p. 393-398, Apr 2012.

XU, J.; CARRETERO, O. A.; LIAO, T. D.; PENG, H. et al. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 299, n. 5, p. H1328-1338, Nov 2010.

YANO, S.; LI, C.; PAVLOVA, Z. The transforming growth factor-Beta signaling pathway involvement in cardiovascular lesions in mucopolysaccharidosis-I. **J. I. Metabolic Disorders Rep**, 7, p. 55-58, 2013.

YU, C.; JEREMY, R. W. Angiotensin, transforming growth factor  $\beta$  and aortic dilatation in Marfan syndrome: Of mice and humans. **IJC Heart & Vasculature**, 18, p. 71-80, 2018.



ZHANG, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell Res**, 19, n. 1, p. 128-139, Jan 2009.

ZHANG, Y.; ALEXANDER, P. B.; WANG, X. F. TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 9, n. 4, Apr 3 2017.

## **ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CARDIOVASCULAR RESEARCH**

### 1. Why publish with Cardiovascular Research?

Publishing with Cardiovascular Research enables authors to align themselves and their work with the journal's strong scientific standing, and to benefit from:

Efficient, timely decisions on your paper. On average, authors received a first decision on their manuscript in 17 days in 2018

Swift production process and online publication. Articles are available on Advanced Access online in an average of ten days from sending to production

Rigorous, constructive reviews from editors and peers

No charges for colour figures

Global readership, with over 2 million downloads per year

Robust marketing strategy to boost your article's impact including promotion through OUP and ESC's combined social media following of 80,000 followers, the OUP Blog and press releases on selected manuscripts

Free access to Editor's Choice articles

All published Original Articles are considered for the "Top Cardiovascular Research Paper(s) of the Year" prize, awarded at the annual ESC Congress

Authors who have recently published their work in Cardiovascular Research have commented:

"My team likes to publish in Cardiovascular Research - the reviewers help us make our article better and the publication process is easy"

"Cardiovascular Research is one of the few journals who actually copyedit your manuscript and help you to catch typos- the production team is easy to work with"

"Production staff are excellent, made some very useful improvements to some of the figures and were very prompt with responses to email enquiries."

## 2. Journal policies

### 2.1 Scope and Aims

Cardiovascular Research is the international journal of the European Society of Cardiology for basic and translational research, across a broad range of disciplines and areas within the cardiovascular field. The Journal aims to enhance insight into cardiovascular disease mechanisms and the perspective for innovation. The Journal welcomes submission of papers at the molecular, sub-cellular, cellular, organ, and organism level, and of translational and clinical research.

Novelty and methodological robustness are essential criteria for submitting to the Journal.

### 2.2 Publication ethics and malpractice statement

Cardiovascular Research and Oxford University Press are members of the Committee on Publication Ethics (COPE). This journal follows the guidance provided in COPE's Core Practices. The journal also subscribes to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly work in Medical Journals. The Journal expects all parties involved in the publication of content in Cardiovascular Research (the publisher, editors, authors, and reviewers) to follow these guidelines on best practice and publication ethics. The ESC Journal Family Ethics Committee further supports the Editors.

### 2.3 Ethical reporting within the manuscript

For animal and human studies, the authors must declare in the Methods section:

Local approval granted by the institutional ethics review board or a regulatory authority and include the approval reference number.

All animal procedures performed must conform to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes or the current NIH guidelines.

If human subjects or tissues are used, the authors must state whether participants gave informed consent prior to the inclusion of people in the study and whether the investigation conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

For investigations involving procedures with animals or isolation of animal tissues, the Methods section must provide the generic name of the anaesthetic and analgesic agent(s) used; including the dosage, route and frequency of administration. Neuromuscular blocking or paralytic agents cannot be used without general anaesthesia. The author must describe the methods used for monitoring the adequacy of the anaesthesia. Likewise, the author must explicitly describe the method(s) used for euthanasia. Reference to previously reported papers only is not sufficient and it must be clear from the manuscript itself how anaesthesia, analgesia and euthanasia were performed.

Cardiovascular Research will not publish articles describing experimental procedures that have inflicted unnecessary pain or discomfort on animals. As of 2016, the following treatments are no longer acceptable for animal anaesthesia and euthanasia: diethyl ether, chloral hydrate, and low dose barbiturates. In addition, the use of tribromoethanol (Avertin) is limited to that which is scientifically necessary. Scientific justification must be provided for the inability to use alternative pharmaceutical-grade anaesthetics such as isoflurane or ketamine combinations.

It is essential authors carefully check compliance with these Guidelines, especially ensuring that there are enough replicates to enable robust statistical analysis.

## 2.4 Data reporting

The author must ensure that they report data in a sufficiently detailed manner, including raw data or primary measurements where possible.

### 2.4.1 Animal data

The Journal aims for detailed and high quality reporting of animal experiments and requires authors to follow the ARRIVE guidelines when preparing their manuscript.

### 2.4.2 Graphical data representation

Bar graphs with error bars do not allow direct evaluation of the distribution of the data. Continuous data must be presented in scatter/dot plots (especially in case of a limited number of observations), showing the individual data points together with the error bars, unless there are specific reasons not to use this type of presentation. These reasons must be explicitly justified by the author in the covering letter.

The author must present figures in a clear, self-explanatory fashion with a given title that summarises the content for the reader. The Y-axis must state the physical quantity measured and the units of measurements. In case of normalization, it must be clear from the Y-axis what the reference value was. Photomicrographs must contain a scale bar that represents a given length in the figure (e.g. 5  $\mu\text{m}$ ). Each immunoblot must have given kDa values associated with the bands shown. In a DNA ladder, the number of basepairs (bp). Echo images must have a time stamp and scale bar. This advice applies to the most common types of data represented in the journal; however, it is not exhaustive and the Editorial team will evaluate manuscripts on an individual basis.

Western blot quantification graphs must be accompanied by representative images.

#### 2.4.3 Image rendering

Authors must reduce post-acquisition processing of data to a minimum. Figures provided in the manuscript must reflect the original pictures. The journal does not allow authors to selectively remove, introduce or enhance specific features from an image, including backgrounds. Linear adjustment of contrast, brightness or colour are only acceptable if applied equally to the entire image. The Journal does not recommend splicing and pasting of gels; however, if necessary the authors must clearly indicate the boundary between the pieces using a dividing line. The author must show loading controls derived from the same blot. Authors must make sure that the representative bands shown in the figures all originate from the same experiment. To increase transparency, authors are encouraged to show the uncropped blots in the supplementary data. The Journal reserves the right to request unedited image files from the authors at any point in the manuscript handling process.

Authors should note that as part of the manuscript handling process, all western blots are scrutinised by a technical editor to identify misleading or fraudulent image rendering.

#### 2.4.4 Clinical trials and epidemiology studies

The Journal adheres to the CONSORT guidelines for reporting randomised clinical trials and STROBE guidelines for reporting observational studies, as outlined by the EQUATOR network.

All clinical trial manuscripts should include the relevant CONSORT or STROBE checklist and flow diagram as supplementary figures.

#### 2.4.5 Nomenclature

Authors should use approved gene nomenclature where this is available. Specific nomenclature guidelines can be found on the HGNC website.

Any manuscripts that feature a novel transcript must have their name approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) and this should be stated in the covering letter.

### 3. Review process

Upon submission, the Editorial Office checks every manuscript for compliance with the instructions to authors and for originality using anti-plagiarism software. The Journal encourages authors to print this document and read it carefully to avoid any delays in processing their manuscript. The Editorial Office will return manuscripts that do not adhere to journal policy to the author for revision.

Manuscripts that meet the journal specifications will undergo screening by Cardiovascular Research Senior Editors. The Editor-in-Chief and Deputy Editors will make an evaluation on suitability and priority based on the scope of the Journal, compliance with ethics, overall

quality, and the expected contribution to the field. The Journal will return manuscripts deemed unsuitable or of low priority within five working days.

A handling editor is selected from our international group of Cardiovascular Research Editors; based on expertise relevant to the manuscript. Normally, the handling editor chooses three reviewers to evaluate manuscripts. Reviewers have 12 days to give a detailed evaluation of the manuscript before the Editorial team makes the final decision.

#### 4. Manuscript submission

##### 4.1. Manuscript categories

The Journal openly welcomes submissions of Original Articles, Reviews and Research Letters. The Journal also publishes Editorials, Invited Brief and Full Reviews, Methodological Guidelines and a series of Spotlight Issues; these submissions are normally by invitation only.

Authors who wish to submit their manuscript to Cardiovascular Research should do so formally and following the guidelines detailed (herein). The Journal does not accept and will not respond to pre-submission inquiries.

Please name the category in which you wish your manuscript to be considered in your cover letter.

For detailed information on manuscript preparation, see Section 4.3

The Journal accepts manuscripts describing a novel method; however, it is expected that the authors will show an application of this method that adds novel insights to the field.

##### Original Articles

Word limit: 9,000 words, including the abstract, manuscript text, references, and figure legends.

Original Articles can include up to seven figures.

A Translational Perspective (100 words), which describes the value of the work from a clinical perspective, is required for Original Articles. This section should be included with the Abstract

#### Fast-track Original Articles

Word limit and format is the same as an Original Article described above; however, fast-track manuscripts must not exceed more than three A4 pages of supplementary data.

For Fast-track Original Articles, the handling editor will invite two expert reviewers from the Journal's fast-track database to review your manuscript in seven days. The reviewers will be requested to only give major comments relating to the to the necessary experimental proof that is required for the manuscript

Following the completion of the review process, the handling editor will indicate three to four essential revision requirements that must be addressed. A response to minor comments is optional.

If the number of major concerns exceeds this, the manuscript will be returned with a decision of “Reject”.

Authors are required to use their own judgement as to whether they would like a fast, direct review on balance of a higher likelihood of rejection. If you wish your manuscript to be considered as a Fast-track Original Article, please select “Fast-track Original Article”. Please note, fast-track articles are subject to our regular initial triage and will be included in this category only at the Editors' discretion.

#### Reviews

Most Review articles are by invitation; however, the Journal welcomes unsolicited review articles. The Editorial team will judge suitability of such manuscripts on timeliness and their value to the current field of knowledge, as well as the authors' original contributions to the field. The Editorial team particularly encourage the submission of systematic reviews and meta-analyses; these must adhere to the PRISMA guidelines.

Word limit: 12,000 words, including the abstract, manuscript text, references, and figure legends and can include up to seven figures.



Review articles must have a short, unstructured abstract (>250 words) and can include up to seven figures.

#### Research Letters

The Journal welcomes authors to submit original investigations of a focussed nature that are particularly novel as a Research Letter.

Word limit: 1000 words, including the manuscript text, references and figure legend

Research Letters do not contain an abstract or supplemental material and can include up to:

One figure (in no more than 2 panels) OR one table

Seven references.

#### 4.2 Services for our invited authors and working groups

The Journal offers professional illustration support, proofreading and language editing Free Of Charge for invited articles. Please let the Editorial Office know if you want to make use of these services.

#### 4.3 Manuscript preparation

Authors must format their manuscript as such:

Line numbers

Page numbers

Numbered sub-headings

The authors must keep abbreviations to a minimum and they must not appear in the Abstract unless they are understood by non-expert readership.

(i) Cover Letter. This first page of the manuscript submission file must contain:

The manuscript title that must be informative, conveying a clear message on the major findings of the study and be no more than 120 characters in length including spaces.

A short title must also be provided that is no more than 50 characters

The names of all authors including first name, department where the work was performed, all authors' affiliations, name of corresponding author with address, telephone number, fax and e-mail. Current addresses of any authors who have moved since the work was finished must also be provided

The category of the manuscript

Total word count of the manuscript

During online submission, the submitting author must provide the contact information of all authors. The Editorial Office will notify all co-authors about the submission via email. On acceptance of the work, the corresponding author will sign a copyright form on behalf of all authors.

If there are more than 10 authors, a statement of the contribution of each to the study must be provided in the cover letter. The journal adheres to the principles for authorship according to ICMJE.

The ICMJE recommends that authorship be based on the following 4 criteria:

Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; and

Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and

Final approval of the version to be published; and

Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

(ii) Abstract.. The abstract must be 300 words or less and structured into the subsections "Aims," "Methods and Results" and "Conclusion(s)". Authors of Original and Review articles are required to submit a graphical abstract (schematic figure) as part of the article, in addition to the text abstract. The graphical abstract should clearly summarize the focus and findings of the article, and will be published as part of the article online and in PDF. The graphical abstract should be submitted for peer review as a separate file, selecting the appropriate file-type

designation in the journal's online submission system. The file should be clearly named, e.g. graphical\_abstract.tiff. See this page for guidance on appropriate file format and resolution for graphics. Please ensure graphical abstracts are in landscape format.

(iii) Introduction. This section must clearly position the study with regard to current knowledge, provide a rationale for the current work, and state its expected contribution to the field.

(iv) Methods. To reduce a lengthy methods section, experimental details (buffer compositions, primer sequences, etc.) may be included in a separate supplementary file for online publication. However, each method must be briefly described and appropriately referenced in the main article.

The correct ethical statements and a description of the statistical analysis and adherence to the Journal guidelines must be included in the main article.

(v) Results. For presentation of data, figures are preferred to tables. Extensive numerical data must appear in the legends to the figures rather than in the main body of text. The author must use SI units throughout.

(vi) Discussion. This section must summarize and highlight the novel findings and position them with regard to current knowledge and future studies. Limitations must be acknowledged here. The editorial team encourages authors to include a schematic drawing that illustrates the new mechanistic insights of the study. The conclusions must provide a clear perspective to the findings.

(vii) Funding. The author must give details of all funding sources for the work in question in a separate section entitled 'Funding'. The authors must follow these rules:

The sentence must begin: 'This work was supported by ...'

The full official funding agency name must be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 sub-institutions) or 'NCI at NIH' (full RIN-approved list of UK funding agencies). Grant numbers must be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'

Multiple grant numbers must be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'.

Agencies must be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency).

Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text must be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.]'

Note: Oxford University Press will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. Authors must clearly indicate that manuscripts are NIH-funded using the guidelines above.

Cross-ref Funding Data Registry: In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please [click here](#).

(viii) Acknowledgements. This section must describe all relevant contributions of persons who are not a co-author on the manuscript. The journal adheres to the principles for authorship as outlined by ICMJE.

(ix) Conflict of Interest. All authors must make a formal statement indicating any potential conflict of interest that might constitute an embarrassment to any of the authors if it were not to be declared and were to emerge after publication. Such conflicts might include, but are not limited to, shareholding in or receipt of a grant or consultancy fee from a company whose product features in the submitted manuscript or which manufactures a competing product.

If none of the authors has a conflict of interest, then the following must be stated: 'Conflict of Interest: none declared.'

(x) References. Authors must refer to the format as illustrated: journal names must be abbreviated and in italics, volume numbers in bold, and page numbers must be fully written out. All authors must be listed. In-text citations must be numerical and superscripted. The number of references must not exceed 50. If referring to manuscripts that have not yet been

published, either as in-press, or submitted elsewhere, a copy must be included for review by the Editors and the reviewers.

Regular papers:

Cheng YH, Zhu P, Yang JA, Liu XJ, Dong SM, Wang XB, Chun B., Zhuang J., Zhang C.. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res* 2010;87:431-439.

Books:

Aaronson PI, Ward JPT, Connolly MJ. *The Cardiovascular system at a glance*. Wiley-Blackwell, 4th ed.,2012.

Chapter in book:

Peppia M, Uribarri J, Vlassara H. Diabetes and advanced glycoxidation end-products. In: Johnstone MT, Veves A. *Diabetes and Cardiovascular Disease*. 2nd ed. New York: Humana Press, 2005:47-71.

Abstract:

As a regular paper, but add (Abstract) at end.

(xi) Figure Legends. Figure legends must start on a new page of the manuscript, but one page may contain legends to more than one figure. Figure legends must include for each graph the number of animals/cells/observations and the statistical test applied. It is preferable that authors provide the exact P-value in the figure legend; rather than,  $P < 0.05$ .

(xii) Figures/Tables. The journal allows a maximum of seven data figures on seven pages; an additional half-page figure highlighting in a schematic the major findings can be included. The data figures may have multiple panels but must be provided on a single page in portrait orientation at the expected print size. The author may upload additional figures within the supplement. Authors must attach figures must as a separate file(s) during the submission process and labelled (entitled "Figure 1", for example, in the box marked "Description" visible during submission). Electronically submitted figures must be of high resolution (300 dpi or greater) and in one of the following formats: tiff (.tif), bitmap (.bmp), jpeg (.jpg), portable data format (.pdf), or postscript (.ps or .eps). Any lettering in the figures must be large enough to

stand photographic reduction. Authors must prepare their figures for either one column width (84 mm) or the entire page width (175 mm). The maximum height is 240 mm. The Publisher will determine the degree of any reduction or enlargement required and in general, line drawings will be reduced to one column width if possible.

Tables can be included in the manuscript file in an editable format.

CVR does not charge for colour representation. Where colour is necessary for proper interpretation, such as for histology or immunostaining, authors must submit figures in colour. Authors are also encouraged to use colour in their graphs to improve the presentation of the data.

(xiii) Supplementary Data. Authors can submit supplementary material to support and enhance the manuscript. Supplementary files supplied will publish online alongside the electronic version of the article.

Authors must submit the material in electronic format together with the article through Editorial Manager. Authors must organise the supplement as follows:

Title page

Supplementary figures/tables

Supplementary methods

Supplementary figures and tables require a title and concise, descriptive legend as in the main text.

#### 4.3.1 Data deposition

Authors must submit all new DNA/RNA sequence data to one of the members of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC). Members are Genbank at NCBI, the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI and the DNA Databank of Japan. New protein sequences must be submitted to UniProtKB/Swiss-Prot. High throughput gene expression, microarray, protein array and next-generation sequencing data must be deposited in one of the public data repositories as ArrayExpress at the EBI (UK), GEO (Gene Expression Omnibus) at NCBI (US) or CIBEX (Center for Information Biology gene

EXpression database) at DDBJ (Japan). Authors are encouraged to submit their data MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) compliant. Submission to any data bank is sufficient to ensure entry in all.

After acceptance of the manuscript, authors are responsible for arranging data release without restriction from the date of publication. In addition to the deposition of data in public databases as detailed above, the editorial team encourages submission of additional information to the appropriate databases.

#### 4.4 Graphical Abstracts

Authors of Original and Review articles are required to submit a graphical abstract (schematic figure) as part of the article, in addition to the text abstract. The graphical abstract should clearly summarize the focus and findings of the article, and will be published as part of the article online and in PDF. The graphical abstract should be submitted for peer review as a separate file, selecting the appropriate file-type designation in the journal's online submission system. The file should be clearly named, e.g. graphical\_abstract.tiff. See this page for guidance on appropriate file format and resolution for graphics. Please ensure graphical abstracts are in landscape format.

### 5. Publisher information

#### 5.1. Language editing pre-submission

Cardiovascular Research publishes in the English (UK) language.

Details of pre-submission language editing services can be found on the Language Services page. These services are particularly useful if English is not your first language, and can be used to ensure the academic content of your paper is fully understood by the journal editors and reviewers.

Please note that edited manuscripts will still need to undergo peer review by the journal.

#### 5.2. Online copyright licence form

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication authors confirm that they are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain their email address for the purpose of communicating with them about the article. Please notify OUP immediately if the contact details change. If the article is accepted for publication OUP will contact the corresponding author using the email address that was used in the registration process.

The European Society of Cardiology may promote and make available to certain parties the finalised version of an article shortly prior to publication in the journal.

### 5.3 Proofs

Page proofs will be submitted to the corresponding author electronically. These should be checked thoroughly for any changes or typographic errors.

It is the publisher's intent to review and correct the proofs and publish the accepted work as soon as possible. To achieve this, it is mandatory that all corrections are returned to OUP within 3 days. Subsequent additional corrections will not be possible, hence please ensure that all amendments are marked up comprehensively in the proofs.

### 5.4 Publication embargos

If authors have embargos on papers, for example, if they are presenting their research results at a subsequent conference, publication can be delayed accordingly. Authors should include a note in the cover letter at submission, and also when returning proofs, about the embargo and the exact date and time the paper can be published.

### 5.5 Media Activity



In the event of manuscript acceptance, the authors may elect to issue a press release. In this case, please contact the publisher at the Cardiovascular Research Editorial Office

#### 5.6 Open access option for authors

Cardiovascular Research authors have the option to publish their paper under the Oxford Open initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After their manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process authors will be asked to indicate whether or not they wish to pay for open access. If they do not select the open access option, their paper will be published with standard subscription-based access and they will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences.

RCUK/Wellcome Trust funded authors publishing in NDT can use the Creative Commons Attribution licence (CC BY) for their articles.

All other authors may use the Creative Commons Attribution Non-Commercial licence (CC BY-NC).

Charges for CC-BY and CC-BY-NC: \$4332/ £2888/ €3696