



ANA HELENA MACEDO PEREIRA

**“AVALIAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DA  
SUPEREXPRESSÃO E DO SILENCIAMENTO DO  
FATOR DE TRANSCRIÇÃO MEF2C EM  
MIÓCITOS CARDÍACOS”**

Campinas

2013





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**ANA HELENA MACEDO PEREIRA**

**“AVALIAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DA  
SUPEREXPRESSÃO E DO SILENCIAMENTO DO  
FATOR DE TRANSCRIÇÃO MEF2C EM MIÓCITOS  
CARDÍACOS”**

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

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiopatologia Médica da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção  
de título de Doutora em Ciências.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA HELENA MACEDO PEREIRA  
E ORIENTADA PELO PROF.DR. KLEBER GOMES FRANCHINI**

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414a Pereira, Ana Helena Macedo, 1980-  
Avaliação molecular e fenotípica da superexpressão  
e do silenciamento de MEF2C em miócitos cardíacos /  
Ana Helena Macedo Pereira. -- Campinas, SP : [s.n.],  
2013.

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

1. Cardiomiopatia hipertrófica. 2. Diferenciação  
celular. 3. Miócitos cardíacos. 4. Expressão gênica. 5.  
Fatores de transcrição. I. Franchini, Kleber Gomes,  
1961-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Phenotypic and molecular evaluation of overexpression and silencing  
of MEF2C in cardiac myocytes

**Palavras-chave em inglês:**

Cardiomiopatia hipertrófica

Cell differentiation

Myocytes, Cardiac

Gene expression

Transcription factors

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Kleber Gomes Franchini [Orientador]

Erich Vinicius de Paula

Deborah Schechtman

Adriana Souza Torsoni

Daniela Baretto Barbosa Trivella

**Data da defesa:** 11-06-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**  
**ANA HELENA MACEDO PEREIRA**

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). KLEBER GOMES FRANCHINI

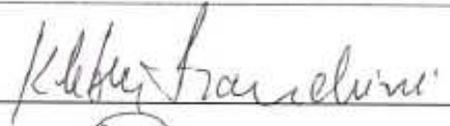
---

---

**MEMBROS:**

---

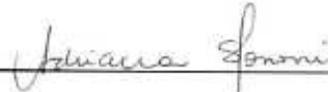
1. PROF(A). DR(A). KLEBER GOMES FRANCHINI



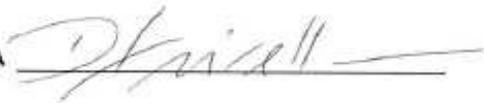
2. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



3. PROF(A). DR(A). ADRIANA SOUZA TORSONI



4. PROF(A). DR(A). DANIELA BARRETTO BARBOSA TRIVELLA



5. PROF(A). DR(A). DEBORAH SCHECHTMAN



---

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 11 de junho de 2013

---



# ***AGRADECIMENTOS***

Agradeço especialmente ao Professor Doutor Kleber Gomes Franchini por toda a oportunidade, aprendizado e confiança a mim depositada durante todos esses anos de pós-graduação. Obrigada por me encorajar a traçar caminhos desconhecidos, pelo apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos os Professores da Unicamp e de outras instituições pelas quais tive a oportunidade de conviver, pela ajuda e importantes colaborações.

Agradeço a todos os colegas de trabalho do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, os atuais e os que já seguiram, com cada um aprendi algo muito valioso entre experiências de vida e de bancada. Agradeço também os colegas de outros laboratórios da Unicamp e do Laboratório Nacional de Biociências que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço aos pesquisadores Dra. Carolina Clemente, Dr. Marcio Bajgelman e Anna Carolina Carvalho pelas produções lentivirais e pelo apoio com os experimentos.

Agradeço aos membros da banca examinadora: Dra. Adriana Torsoni, Dra. Débora Schechtman, Dra. Daniela Trivella, Dr. Erich Vinícius de Paula, Dr. Márcio Dias e a Dra. Sisi Marcondes, pela preciosa colaboração.

Agradeço a minha querida família, meu pai, Erasmo Macedo, minha mãe, Maria Helena Ribeiro e meus irmãos e cunhadas, Francisco e Lívia, João Ricardo e Lívia que mesmo sem



saber muito onde iria dar esta jornada me apoiaram incondicionalmente, me deram força e me transmitiram fé quando eu mais precisava. Vocês são o começo e o fim de tudo!

Agradeço as minhas tias, tios, primos e amigos Alterosenses que sempre rezaram e torceram por mim.

Em especial agradeço imensamente ao meu marido, Alisson Campos Cardoso por tudo. Tudo o que representa na minha vida pessoal e profissional. Pela ajuda nos experimentos, na escrita e correção da tese, pela força e companheirismo, pela paciência. Obrigado pelo pesquisador e marido que você é.

Agradeço à família Campos Cardoso: Marileide, Wilmar, Adriano, Francine, Alessandro, Mariana, Edson, Dilma, Guilherme, Caio, Henrique, Tio Wanderlei, Tia Graça, entre outros, que me acolheram com tanto carinho desde a graduação, o que me deu mais força para continuar na caminhada.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

À Unicamp

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

À Deus!



“As emoções positivas e negativas não podem ocupar a mente ao mesmo tempo. Uma tem de dominar. Compete-lhe a si fazer com que as emoções positivas constituam a influência dominante na sua mente.”

**Napolean Hill**



## RESUMO

Os fatores MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) pertencem à família MADS Box (MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor) e foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a sequências de DNA ricas em A/T nos promotores de vários genes músculo específicos. Existem 4 genes da família MEF2 que foram identificados em vertebrados: MEF2A, B, C e D que são expressos de forma distinta durante a embriogênese e nos tecidos adultos. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que o fator de transcrição MEF2 é ativado por estiramento mecânico e influencia a expressão de genes relacionados à hipertrofia cardíaca. Utilizando a tecnologia de siRNA para MEF2C (siRNA<sup>MEF2C</sup>) demonstramos a atenuação da hipertrofia cardíaca induzida por coarctação da aorta nos animais que receberam o siRNA<sup>MEF2C</sup>. Por outro lado trabalhos demonstraram que animais transgênicos com a superexpressão de MEF2A ou de MEF2C e submetidos à sobrecarga de pressão por coarctação da aorta, não apresentam hipertrofia cardíaca compensatória. Nesses animais a superexpressão de MEF2A ou de MEF2C no coração está associada à deterioração cardíaca funcional e estrutural e o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada. Contudo, a caracterização fenotípica e os mecanismos moleculares envolvidos na superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos ainda são desconhecidos. Da mesma forma não é conhecido o papel do fator de transcrição MEF2C na resposta hipertrófica do miócito cardíaco após coarctação da aorta. No presente trabalho foi demonstrado que a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos (NRMV), com o uso de partículas adenovirais, induziu a desdiferenciação celular e a ativação de mecanismos envolvidos na progressão do ciclo celular. Esses resultados foram obtidos por meio de experimentos de microarranjo de DNA, proteoma, PCR em tempo real e *western blotting*. A análise do fenótipo celular por microscopias de luz, confocal e eletrônica de transmissão demonstra que NRMV possuem aumento na binucleação e desorganização sarcomérica, alterações coerentes com o quadro de desdiferenciação celular e ativação da progressão do ciclo celular. Por meio da técnica de incorporação de iodeto de propídeo e citometria de fluxo confirmamos o aumento de



células em ciclo celular. Para confirmar os achados nos cardiomiócitos neonatos passamos a investigar o efeito da superexpressão de MEF2C em cardiomiócitos de ratos adultos. Para isso padronizamos a técnica de isolamento destas células e tratamos com AdMEF2C. Sendo assim o tratamento com AdMEF2C em miócitos cardíacos de ratos adultos resultou em aumento da expressão de MEF2C após 48 horas de tratamento. O efeito observado foi semelhante ao encontrado em cardiomiócitos neonatos, sendo que os adultos apresentaram aumento da expressão de genes relacionados ao ciclo celular e diminuição dos genes estruturais. A nível ultraestrutural observado por microscopia eletrônica de transmissão no tempo de 48 horas de tratamento não observamos diferenças na estrutura sarcomérica das células tratadas com AdMEF2C.

Por fim demonstramos que o silenciamento de MEF2C pela injeção de lentivírus no coração demonstrou ser capaz de impedir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em camundongos coarctados por 15 dias. A hipertrofia do coração foi avaliada por meio da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo e gravimetria do ventrículo esquerdo e dos pulmões. O conjunto de dados demonstra que a superexpressão de MEF2C leva a alterações estruturais no miócito cardíaco compatíveis com quadro de deterioração e insuficiência cardíaca e que o silenciamento de MEF2C no coração impede o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca decorrente da coarctação da aorta.



# ***ABSTRACT***

The factors MEF2 (myocyte enhancer factor 2) belong to the family MADS box (MCM1-Agamous-deficiens-Serum response factor) and were first described as transcription factors that bind DNA sequences rich in A / T in the promoters of multiple muscle-specific genes. There are four MEF2 family genes that were identified in vertebrates MEF2A, B, C and D are expressed differently during embryogenesis and in adult tissues. Previous studies from our laboratory demonstrated that the transcription factor MEF2 is activated by mechanical stretch and influences the expression of genes related to cardiac hypertrophy. Using siRNA technology to MEF2C (siRNAMEF2C) demonstrated attenuation of cardiac hypertrophy induced by aortic coarctation in animals that received siRNAMEF2C. On the other hand studies have demonstrated that transgenic mice with overexpression of MEF2A or MEF2C and subjected to pressure overload by aortic coarctation show no compensatory cardiac hypertrophy. In these animals the overexpression of MEF2A or MEF2C in the heart is associated with structural and functional cardiac deterioration and development of dilated cardiomyopathy. However, the phenotypic and molecular mechanisms involved in the overexpression of MEF2C in cardiac myocytes are still unknown. Likewise, there is known the role of the transcription factor MEF2C in cardiac myocyte hypertrophic response after aortic coarctation. In the present study it was shown that overexpression of MEF2C in neonatal rat cardiac myocytes (NRMV) with the use of adenoviral particles, and cellular dedifferentiation induced activation mechanisms involved in cell cycle progression. These results were obtained by DNA microarray experiments, proteomics, real time PCR and western blotting. The analysis of cell phenotype by light microscopy, confocal and



transmission electron shows that NRMV have increased binucleation and sarcomeric disorganization, changes consistent with the framework of cellular dedifferentiation and activation of cell cycle progression. By means of the propidium iodide incorporation technique and flow cytometry, confirmed increasing cells in the cell cycle. To confirm the findings in neonatal cardiomyocytes we investigate the effect of overexpression of MEF2C in cardiomyocytes of adult rats. For this standardized technique and isolation of these cells treated with AdMEF2C. Thus treatment with AdMEF2C in adult rat cardiac myocytes resulted in increased expression of MEF2C after 48 hours of treatment. The observed effect was similar to that found in cardiomyocytes neonates, adults who showed increased expression of genes related to cell cycle and decreased structural genes. The ultrastructural level observed by transmission electron microscopy in the time of 48 hours of treatment showed no difference in sarcomeric structure of cells treated with AdMEF2C.

Finally we show that MEF2C silencing by lentivirus injection in the heart has been shown to prevent the development of cardiac hypertrophy in mice after 15 days of pressure overload. The heart hypertrophy was evaluated by the thickness of the posterior wall of the left ventricle and the left ventricle gravity and lungs. The data set shows that overexpression of MEF2C leads to structural changes in the cardiac myocyte compatible framework of deterioration and failure, and MEF2C silencing of the heart prevents the development of cardiac hypertrophy due to aortic coarctation.





3.2.5. Quantificação de proteínas por método de <i>Lowry</i> .....	29
3.2.6. Western Blotting.....	30
3.2.7. Microscopia de luz e análise morfológica .....	31
3.2.8. Protocolo Citometria de Fluxo - Ciclo Celular.....	32
3.2.9. Microscopia de Imunofluorescência.....	32
3.2.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	33
3.2.11. Extração de RNA total.....	35
3.2.12. Microarranjo de DNA.....	37
3.2.13. Análise da expressão de transcritos por PCR em tempo real .....	37
3.2.14. Digestão das amostras para análise por espectrometria de massas pelo método <i>Label Free</i> .....	38
3.2.15. Construção do vetor lentiviral #304 U6shRNA <sup>MEF2C</sup> .....	40
3.2.16. Extração de plasmídeos em mini-escala (miniprep).....	42
3.2.17. Extração de plasmídeos em larga escala (maxiprep).....	42
3.2.18. Produção de Lentivírus.....	43
3.2.19. Citometria de fluxo.....	44
3.2.20. Modelo de injeção de partículas virais em camundongos swiss .....	44
3.2.21. Histologia dos corações .....	45
3.2.22. Modelo de sobrecarga pressórica em camundongos .....	45

3.2.23. Ecocardiografia.....	46
3.2.24. Hemodinâmica.....	46
3.2.25. Gravimetria do ventrículo esquerdo .....	47
3.2.26. Análise estatística .....	47
4-RESULTADOS.....	49
Resultados da avaliação molecular e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos em cultura. ....	51
4.1. Avaliação da expressão de MEF2C, por PCR em tempo real e <i>western blotting</i> em cultura de miócitos cardíaco tratados com Ad-MEF2C. ....	51
4.2. Análise por microarranjo de DNA da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos. ....	53
4.3. Validação de genes diferencialmente expressos a partir dos resultados de microarranjo de DNA.....	60
4.4. Análise por proteômica quantitativa da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos. ....	64
4.5. Validação de proteínas diferencialmente expressas a partir dos resultados de Proteômica. .....	67
4.6. Avaliação do fenótipo de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C por meio de microscopia de luz, confocal e eletrônica de transmissão. ....	69
4.6.1 Microscopia de luz (coloração por hematoxilina-eosina).....	69

4.6.2. Microscopia Confocal .....	71
4.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	72
4.7. Avaliação da síntese de DNA de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad-MEF2C .....	74
4.7.Avaliação do nível de expressão de proteínas relacionadas à autofagia em cultura de miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad-MEF2C .....	75
4.8.Análise da expressão de MEF2C e do fenótipo de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdMEF2C .....	79
4.8.1. Padronização da cultura de cardiomiócitos de ratos adultos.....	79
4.8.2. Microscopia confocal de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos.....	80
4.8.3. PCR em tempo real de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos .....	81
4.8.4. Microscopia eletrônica de transmissão de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdMEF2C. ....	85
Resultados da avaliação do silenciamento gênico de MEF2C por meio de shRNA em coração de camundongos swiss. ....	87
4.9.Utilização do shRNA <sup>MEF2C</sup> em cultura de células .....	87
4.9.1. Clonagem do shRNA <sup>MEF2C</sup> no vetor p-Silencer .....	87
4.9.2. Padronização do silenciamento com shRNA <sup>MEF2C</sup> em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos .....	88

4.9.3.	Subclonagem de shRNA <sup>MEF2C</sup> no vetor lentiviral #304 e produção de partículas lentivirais.....	89
4.9.4.	Padronização do uso de partículas virais #304 U6+shRNA <sup>MEF2C</sup> em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos.....	92
4.10.	Uso de partículas virais #304 U6+ shRNA <sup>MEF2C</sup> em camundongos.....	95
4.10.1.	Injeção de lentivírus controle FUGW em corações de camundongos .....	96
4.10.2.	Avaliação do silenciamento de MEF2C em coração de camundongos .....	99
4.10.3.	Avaliação ecocardiográfica de animais com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C e coarctados por 15 dias.....	101
4.10.4.	Avaliação hemodinâmica de animais coarctados por 15 dias e com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C .....	104
4.10.5.	Gravimetria dos corações de camundongos submetidos a coarctação da aorta e com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C .....	107
5-	DISCUSSÃO .....	111
5.1.	Avaliação gênica e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos	113
5.2.	Avaliação gênica e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos adultos	121
5.3.	Avaliação fenotípica do silenciamento de MEF2C em corações de camundongos coarctados .....	127

6-CONCLUSÃO .....	135
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	139
8. APÊNDICE I.....	149
9. ANEXO I.....	173

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Figura esquemática demonstrando os tipos de hipertrofias cardíacas. ....	5
Figura 2: Conservação de sequencia demonstrando a porcentagem de identidade de aminoácidos, dentro dos domínios MADS, MEF2 e de ativação da transcrição de diferentes membros da família MEF2 em relação ao MEF2A de humano .....	9
Figura 3: Figura esquemática demonstrando os tipos de regulação dos fatores de transcrição MEF2 .....	12
Figura 4:Esquema representativo do vetor pSilencer MEF2C .....	41
Figura 5: Esquema representativo do mapa referente ao vetor lentiviral #304 e o local onde foi feita a clonagem.....	41
Figura 6: Expressão gênica e proteica de MEF2C. <b>A.</b> Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm de MEF2C em miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C comparada ao grupo de células controle Ad-βGal. <b>B.</b> Gráfico representativos da expressão proteica de MEF2C em cultura de células tratadas com Ad-MEF2C comparada ao controle Ad-βGal. Normalizado pela proteína GAPDH.....	53
Figura 7: Esquema representativo das etapas e das proteínas envolvidas na replicação do DNA em eucariotos. Os genes diferencialmente aumentados no ensaio de microarrajo apresentam com uma barra em vermelho. (Vide legenda da Figura 4 no Anexo 01). ....	57
Figura 8: Esquema representativo demonstrando o agrupamento de todos os genes envolvidos nas vias descritas na Tabela 02. Os genes que se apresentaram diferencialmente expressos, por aumento ou diminuição, encontram-se destacados em vermelho ou verde,	

respectivamente. Os genes estão agrupados de acordo com a localização subcelular das proteínas codificadas por eles..... 59

Figura 9: Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm: A) MEF2C; B) CDK2; C) Ciclina E1; D) Aurora kB; em células tratadas com Ad-MEF2C e Ad-23/24 comparado ao grupo de células controle Ad-βGal. \*p<0,05 vs AdβGal. n=4 ..... 61

Figura 10: Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm: A) Desmina; B) Actina cardíaca; C) Actinina; D) Miomesina 1; E) Miosina 6; F) Miosina 7 em células tratadas com Ad-MEF2C comparado ao grupo de células controle Ad-βGal e Ad 23/24. \*p<0,05 vs AdβGal. n=4. .... 63

Figura 11: Esquema representativo demonstrando o agrupamento de todas as proteínas descritas na Tabela 06. As proteínas que se apresentaram diferencialmente expressas, por aumento ou diminuição, encontram-se destacadas em vermelho ou verde, respectivamente. As proteínas estão agrupadas de acordo com a sua localização subcelular..... 66

Figura 12: Western blotting e gráficos representativos da expressão de: A) MEF2C; B) FAK; C) Cadeia Pesada de Miosina; D) Actina; E) Desmina; F) Ciclina E1; em células tratadas com Ad-MEF2C comparado ao grupo de células controle Ad-βGal. \*p<0,05 vs AdβGal. n=4..... 68

Figura 13: Microscopia de luz representativa de miócitos cardíaco tratados com Ad-βGal (A) ou Ad-MEF2C (B e C) coradas com H&E. Observe em (A) a morfologia típica do núcleo do miócito cardíaco, enquanto que em (B e C) os núcleos apresentam-se multinucleados (seta) e com lobulações atípicas (detalhes). Aumento = 400x. (D) Gráfico representativo da porcentagem de células que apresentam multinucleação entre os grupos Ad-βGal e Ad-MEF2C. \*p<0,05 vs AdβGal..... 70

- Figura 14: Microscopia confocal representativa de miócitos cardíacos tratado com Ad- $\beta$ Gal ou Ad-MEF2C. Analise as fibras de actina, em vermelho, organizadas e com estriação típica de miócito no grupo controle (Ad- $\beta$ Gal), enquanto que o grupo Ad-MEF2C apresentou redução qualitativa da marcação e desorganização do padrão estriado das fibras de actina no sarcômero. Actina marcada com faloidina-rodamina (vermelha) e núcleo marcado com DAPI (azul). ..... 71
- Figura 15: Elétron-micrografias representativas de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad- $\beta$ Gal (A e C) ou Ad-MEF2C (B e D) por 48h. Em A e C, observe a morfologia típica do núcleo (N) e cromatina do miócito, bem como a disposição orientada dos sarcômeros (S) com preservação das bandas A e I, além do disco Z. Já em B e D, analise o núcleo com maior quantidade de cromatina condensada (seta), desorganização e adelgaçamento sarcomérico (\*), presença de vesículas fusionadas às mitocôndrias (cabeça de seta). V = vesícula; M = mitocôndria. Barras A e B = 5 $\mu$ m; C e D = 2 $\mu$ m. .... 73
- Figura 16: Dados representativos da análise por citometria de fluxo de miócitos cardíacos marcadas com Iodeto de Propídeo. Em A grupo controle Ad- $\beta$ Gal; em B grupo tratado com Ad-MEF2C; C gráfico representativo demonstrando o número de vezes alterado da quantidade de miócitos cardíacos que estão fora da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular e que apresentam, portanto, aumento na síntese de DNA. n= 3. \*p<0,05 vs Ad- $\beta$ Gal..... 75
- Figura 17: Análise do nível de expressão de proteínas envolvidas em vias autofágicas. *Western blotting* representativo de Atg12, Becn1, Dram1 e LC3 em miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad- $\beta$ Gal ou Ad-MEF2C por 48 horas. .... 77

Figura 18: Expressão de RNAm de proteínas envolvidas em vias autofágicas. PCR em tempo real demonstrando a quantificação relativa de Atg12 e LC3 em miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad-βGal ou Ad-MEF2C por 48 horas. .... 78

Figura 19: Imagem de microscopia de luz demonstrando cardiomiócitos de ratos adultos a fresco em cultura logo após extração. .... 80

Figura 20: Microscopia confocal de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos após 5 dias de isolamento. Em azul marcação com Dapi (núcleo) e vermelho marcação com faloidina (actina). Aumento de 400X. .... 81

Figura 21: Gráficos representativos da quantificação relativa por meio de PCR em tempo real de MEF2C. Amostras de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos aderentes tratados com AdβGal, AdMEF2C e Ad23/24. .... 82

Figura 22: Gráficos representativos da quantificação relativa por meio de PCR em tempo real de genes relacionados ao ciclo celular. Amostras de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdβGal, AdMEF2C e Ad23/24. A) Aurora kB; B) Ciclina E1. \*p<0,05 vs AdβGal. .... 83

Figura 23: Gráficos representativos da quantificação relativa por meio de PCR em tempo real de genes relacionados a estrutura celular. Amostras de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdβGal, AdMEF2C e Ad23/24. A) Actina cardíaca; B) Desmina; C) Miosina 6; D) Actinina. \*p<0,05 vs AdβGal. .... 84

Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos após tratamento com AdβGal (A e B) ou AdMEF2C (C e D). .... 86

Figura 25: Silenciamento por shRNA-MEF2C em cultura de miócitos cardíacos. A, gráfico representativo e *western blotting* demonstrando a diminuição da quantidade proteica de

MEF2C (n=3 culturas). B, gráfico representativo da quantificação relativa por PCR em tempo real do RNAm de MEF2C (n=3 culturas). \*p<0,05 vs shRNA<sup>MEF2C</sup> Scramble..... 88

Figura 26: Citometria de fluxo de células NIH3T3. Gráficos representativos de citometria de fluxo de células NIH3T3 transduzidas por partículas lentivirais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup> e a detecção de GFP. .... 90

Figura 27: Imagens de microscopia de fluorescência de células NIH 3T3 que não receberam as partículas virais #304 U6shRNAMEF2C. Pode-se observar a ausência de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X..... 91

Figura 28: Imagens de microscopia de fluorescência de células NIH 3T3 transduzidas com partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a presença de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X..... 91

Figura 29: Citometria de fluxo de miócitos cardíacos em cultura. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando cultura de cardiomiócitos primário transduzidos por vetor lentiviral #304 U6 shRNA<sup>MEF2C</sup> e a detecção por GFP. .... 92

Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência de cultura de cardiomiócitos que não receberam as partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a ausência de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X..... 93

Figura 31: Imagens de microscopia de fluorescência de cultura de cardiomiócitos transduzidos com partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a presença de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X..... 93

Figura 32: Uso de vetores lentivirais em cultura de cardiomiócitos. Gráficos representativos da quantificação arbitrária do nível proteico (A) e do nível de RNAm (B) de MEF2C em

cardiomiócitos transduzidos com vetor lentiviral #304 U6 shRNA <sup>MEF2C</sup> . n = 3. * p< 0,05 vs controle.....	94
Figura 33: Imagem de microscopia de fluorescência demonstrando a presença da expressão da proteína GFP (verde) no miocárdio de camundongos que receberam injeção de lentivírus controle FUGW. A. marcação em azul (DAPI): núcleos; B. marcação em vermelho (faloidina): fibras de actina; C. marcação em verde: GFP; D. sobreposição das 3 marcações. Aumento 200x .....	97
Figura 34: Imagem de microscopia de fluorescência demonstrando a presença da expressão da proteína GFP (verde) no miocárdio de camundongos que receberam injeção de lentivírus controle FUGW. A. marcação em azul (DAPI): núcleos; B. marcação em vermelho (faloidina): fibras de actina; C. marcação em verde: GFP; D. sobreposição das 3 marcações. Aumento 400x.....	98
Figura 35: Uso de vetores lentivirais em camundongos swiss. Gráfico representativo da quantificação arbitrária do nível proteico de MEF2C em coração de camundongos que receberam injeção de vetores lentivirais #304 U6 shRNA <sup>MEF2C</sup> e seus controles que receberam somente o veículo PBS. ....	100
Figura 36: Avaliação ecocardiográfica dos animais com injeção de Lenti#304 shMEF2C. A. Gráfico demonstrando diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. B. Gráfico demonstrando diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo C. Gráfico demonstrando espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo. D. Gráfico demonstrando a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. SO, <i>sham operated</i> ; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta. DDVE, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP espessura da	

parede posterior do ventrículo esquerdo; FS fração de encurtamento do ventrículo esquerdo.

\*p < 0,05 vs SO PBS; # p < 0,05 vs CoAo PBS..... 103

Figura 37: Avaliação hemodinâmica dos animais com injeção de Lenti#304 shMEF2C e coarctados por 15 dias. A. Gráfico representativo da pressão arterial sistólica na artéria carótida e na artéria femoral. B. Gráfico representativo da pressão arterial diastólica na artéria carótida e na artéria femoral. C. Gráfico representativo da pressão arterial média na artéria carótida e na artéria femoral. D. Gráfico representativo do gradiente arterial (diferença entre as pressões na carótida e na femoral). PASC, pressão arterial sistólica na carótida; PASF, pressão arterial sistólica na femoral; PADC, pressão arterial diastólica na carótida; PADF, pressão arterial diastólica na femoral; PAMC, pressão arterial média na carótida; PAMF, pressão arterial média na femoral. SO, *sham operated*; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta. \*p < 0,05 vs SO PBS e SO Lenti304..... 106

Figura 38: Avaliação gravimétrica dos animais com injeção de Lenti#304 shMEF2C. A. Gráfico demonstrando valor relativo do ventrículo esquerdo (ventrículo esquerdo/peso corporal). B. Gráfico demonstrando valor relativo do ventrículo direito (ventrículo direito /peso corporal). C. Gráfico demonstrando valor relativo dos pulmões (pulmões/peso corporal). SO, *sham operated*; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta . \*p < 0,05 vs SO PBS; # p < 0,05 vs CoAo PBS. .... 109



# ***1- INTRODUÇÃO***



### **1.1. Hipertrofia e insuficiência cardíaca - Aspectos fisiopatológicos e moleculares**

O músculo cardíaco exibe marcante grau de plasticidade fenotípica em resposta ao aumento de sobrecarga. Essa plasticidade é refletida principalmente pelo aumento no tamanho (i.e. hipertrofia) dos miócitos existentes. A resposta hipertrófica por si diminui a tensão da parede ventricular por aumentar a espessura dessa parede e diminuir o raio intracavitário. De acordo com a lei de Laplace [ $T = (P \cdot R) / 2e$ ], a tensão da parede ventricular (T) é uma função inversa da espessura da parede (e) e uma função direta à pressão intracavitária (P) e ao raio intracavitário (R).

A hipertrofia fisiológica, decorrente principalmente de exercícios físicos ou até mesmo durante a gestação, tem como características a preservação das funções cardíacas e pelo fato de ser reversível. Já a hipertrofia patológica é decorrente de estímulos como, por exemplo, aumento da pressão arterial e possui um efeito deletério sobre o músculo cardíaco à longo prazo (MAILLET et al., 2013).

Contudo, a hipertrofia cardíaca prolongada pode promover alterações estruturais que levam a disfunção da contratilidade e do relaxamento do miocárdio que repercutem clinicamente como insuficiência cardíaca, condição grave, responsável por parte significativa das elevadas morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares.

Sobrecargas hemodinâmicas prolongadas são causa e também consequência da maior parte das doenças que acometem o coração (KATZ, 1990). Estímulos de natureza mecânica e neuro-humorais que acompanham doenças como hipertensão, valvulopatias e

infarto do miocárdio induzem hipertrofia e também deterioração estrutural e funcional do ventrículo esquerdo.

Segundo dados de 2008, o Brasil possui 40% da população com aumento de pressão arterial, sendo que aproximadamente metade destes pacientes desconhece a doença. As consequências da hipertensão arterial atingiram mais de 1 milhão de internações em 2005 e 27,4% de todos os óbitos em 2003 (NOBRE & LIMA, 2000). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, no Brasil, 33% de todas as mortes ocorridas em 2010 em ambos os sexos foram atribuídas a doenças cardiovasculares, demonstrando a crescente importância desta doença no contexto social.

Existem dois tipos de hipertrofia: a hipertrofia excêntrica e a hipertrofia concêntrica. A hipertrofia excêntrica ocorre em casos de sobrecarga de volume como no infarto do miocárdio, na regurgitação da válvula aórtica e mitral e nas fístulas arteriovenosas. Esse tipo de hipertrofia é caracterizado por um aumento da espessura de parede, devido a replicação em série dos sarcômeros, e aumento da cavidade do ventricular (MAILLET et al., 2013). Já a hipertrofia concêntrica ocorre em casos de sobrecarga de pressão como a hipertensão arterial e a coarctação da aorta. Ela é caracterizada também pelo aumento da espessura da parede, entretanto, a replicação dos sarcômeros ocorre em paralelo, e há diminuição da cavidade intracavitária (Figura 1).

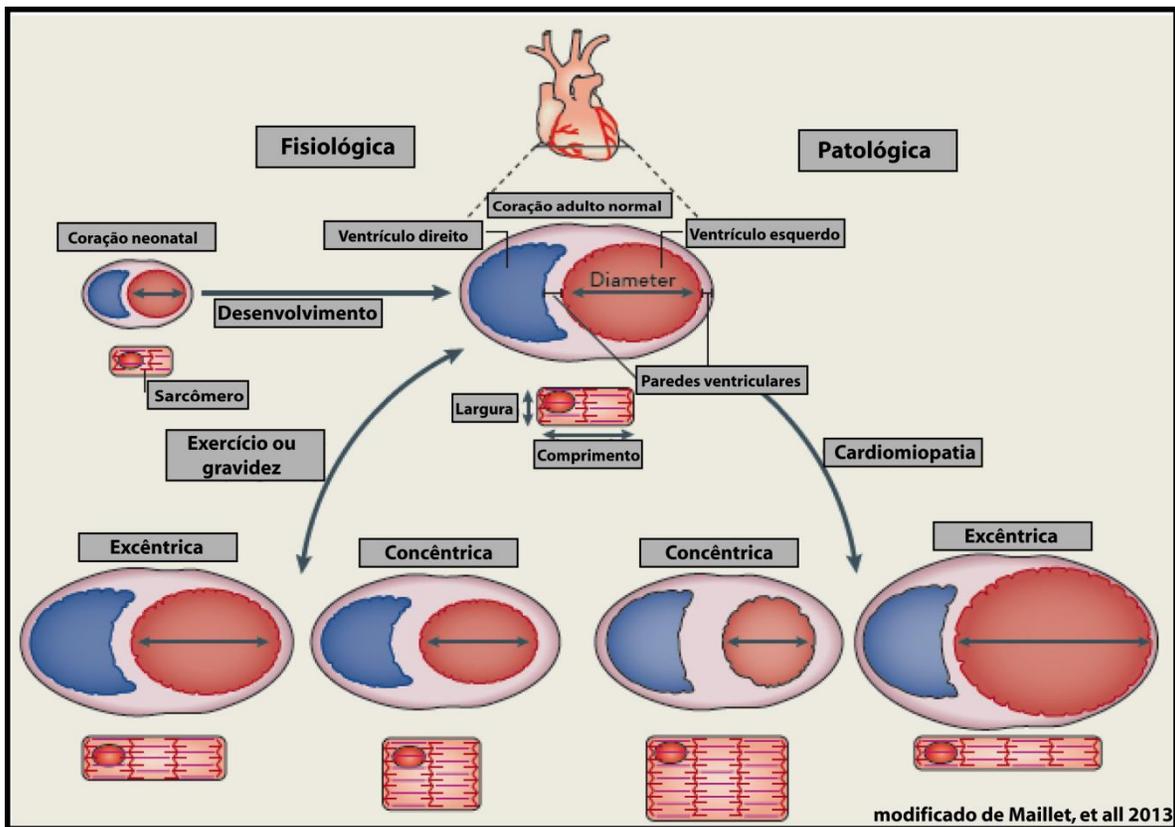


Figura 1: Figura esquemática demonstrando os tipos de hipertrofias cardíacas.

Contudo, as vias moleculares que traduzem o estímulo mecânico em bioquímico e os mecanismos celulares envolvidos na regulação gênica que determina o fenótipo hipertrófico do ventrículo esquerdo em resposta à sobrecarga de pressão ainda não estão totalmente estabelecidos.

Entre os mecanismos celulares envolvidos na hipertrofia miocárdica há a reprogramação complexa da regulação gênica que inclui a re-expressão de genes cardíacos fetais, genes que modificam a composição e a regulação das unidades motoras, genes que

modificam o metabolismo energético e genes que codificam componentes de vias hormonais (HUNTER & CHIEN, 1999; KUWAHARA et al., 2012).

O crescimento hipertrófico envolve o controle da expressão gênica em vários níveis: iniciação da transcrição, alongação e tradução do transcrito (HUNTER & CHIEN 1999; MOKKENTIN & DORN, 2001). As etapas de sinalização culminam no núcleo, onde ativam um conjunto de fatores de transcrição. Esses fatores são responsáveis pela expressão de genes de resposta imediata, re-expressão do programa gênico fetal dos miócitos e também de genes estruturais.

O primeiro grupo de genes ativados pela sobrecarga mecânica é o grupo dos genes de resposta imediata como *c-fos*, *c-jun*, *Erg-1* e *c-myc* (CHIEN et al., 1990; SADOSHIMA et al., 1992). Posteriormente, os genes fetais como a cadeia pesada da  $\beta$ -miosina, fator natriurético atrial e  $\beta$ -actina esquelética são precocemente expressos, sendo seguidos (12 a 24 horas após o início do estímulo mecânico) pela expressão de outros genes constitutivos. Este padrão de expressão gênica é observado tanto em modelos de sobrecarga hemodinâmica em animais, como em miócitos cardíacos isolados tratados cronicamente com agonistas ou submetidos a estiramento mecânico sustentado (SADOSHIMA & IZUMO, 1997; YAMAZAKI et al., 1999). Estes dados indicam que, embora diferentes vias de sinalização celular sejam ativadas por estímulos hipertróficos distintos, o programa gênico relacionado às alterações fenotípicas da hipertrofia cardíaca é comum.

Vários sinais extracelulares disparam vias de sinalização que entre outras coisas culminam com a maior liberação cálcio intracelular para em seguida ativar a proteína quinase dependente de cálcio calmodulina (CaMK) ou ativar a proteína fosfatase calcineurina, que medeiam o crescimento dos cardiomiócitos. Um substrato alvo da

fosfatase calcineurina é o fator de transcrição NFAT (Fator Nuclear de Células T ativadas). NFAT forma complexos com outros fatores de transcrição como GATA4 e MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor-2*) para ativar a transcrição de genes alvo de hipertrofia (MAILLET et al., 2013). Sendo assim podemos observar que o melhor entendimento do papel dos efetores finais destas vias de sinalização, os fatores de transcrição, é de suma importância para se esclarecer a fisiopatologia da hipertrofia cardíaca. Entre estes importantes fatores de transcrição, destacamos os da família MEF2.

## 1.2. Fator de Transcrição MEF2

### 1.2.1 Família e estrutura

O fator de transcrição MEF2 desempenha papel central nas funções de transmissão de sinais extracelulares para o genoma e na ativação dos programas gênicos que controlam a diferenciação celular, proliferação, a morfogênese, a sobrevivência e a apoptose em diversos tipos celulares (linfócitos, neurônios, condrócitos, endoteliais e musculares cardíaca, esquelética e lisa) (POTTHOFF et al., 2007)

Os fatores MEF2 pertencem à família MADS Box (MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor) e foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a sequencias de DNA ricas em A/T nos promotores de vários genes músculo-específicos. Existem 4 genes da família MEF2 que foram identificados em vertebrados: *mef2a*, *b*, *c* e *d* que são expressos de forma distinta, mas em padrões de sobreposição durante a embriogênese e nos tecidos adultos (BLACK & OLSON, 1998).

A Figura 2 representa os domínios de ligação ao DNA (aminoácidos 1-86) quase idênticos na extremidade N-terminal com alta homologia no domínio MADS Box (aminoácidos 1-57). Este domínio é responsável pela ligação ao DNA e dimerização das proteínas, permitindo que os fatores MEF2 se liguem como homo ou heterodímeros a um elemento *cis* com a sequencia (C/T)TA(A/T)<sub>4</sub>TA(G/A). Um domínio adjacente ao MADS Box chamado domínio MEF2 (aminoácidos 58-86), que é característico da família, influencia a afinidade de ligação ao DNA assim como a interação com proteínas coativadoras e corepressoras da atividade transcricional de MEF2. A região C-terminal dos

fatores MEF2 que compreende ao domínio de ativação transcricional apresenta uma menor conservação entre os membros da família MEF2 (JANSON et al., 2001). Nessa região, também ocorrem processos complexos de *splicing* alternativo, com certos exons presentes em todos os tipos celulares, enquanto outros são limitados a tipos celulares específicos.

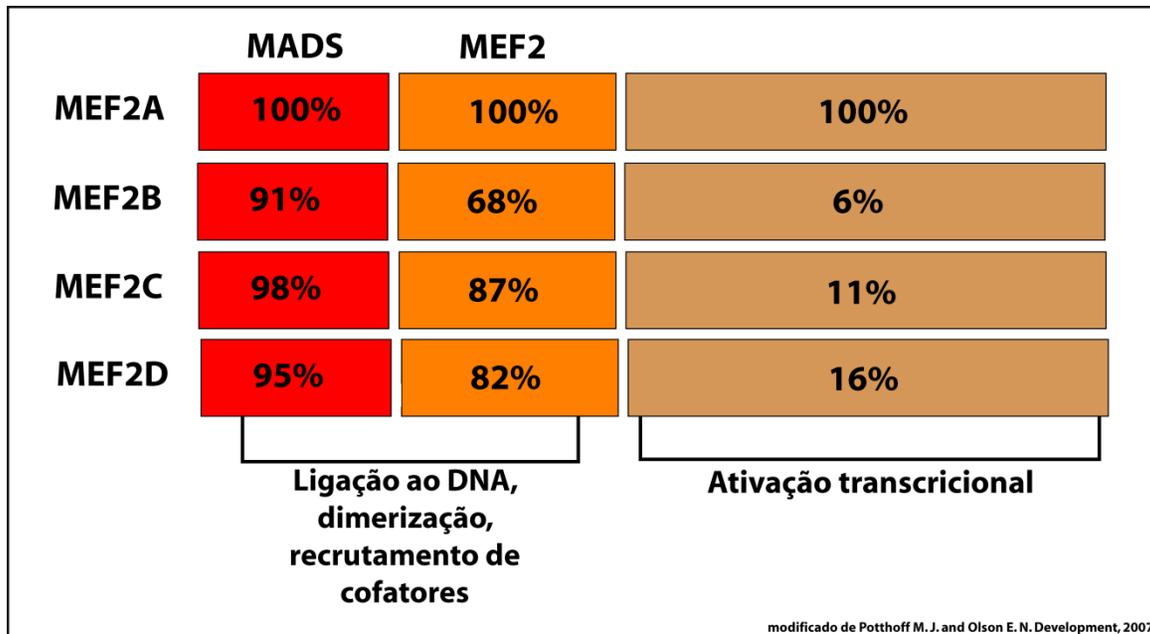


Figura 2: Conservação de sequência demonstrando a porcentagem de identidade de aminoácidos, dentro dos domínios MADS, MEF2 e de ativação da transcrição de diferentes membros da família MEF2 em relação ao MEF2A de humano

Evidências dão suporte à participação dos fatores da família MEF2 na regulação da expressão gênica do miocárdio em resposta a estímulos hipertróficos. Estudos demonstraram que a atividade de ligação do MEF2 ao DNA está de 2 a 3 vezes maior tanto em resposta a sobrecarga de pressão como em resposta a sobrecarga de volume (MOLKENTIN & MARKHAM, 1993; NADRUZ et al., 2003). A atividade de ligação do MEF2

também está aumentada no coração de camundongos MDX, que apresentam miopatia congênita semelhante à miopatia de indivíduos com distrofia de Duchenne (KOŁODZIEJCZYK et al., 1999).

### **1.2.2. Regulação dos fatores de transcrição MEF2**

A regulação dos fatores de transcrição MEF2 se dá principalmente por meio de 3 frentes (Figura 3): modificação da afinidade de ligação a uma sequência específica no DNA, controle da localização nuclear e modulação da capacidade de ativar a transcrição gênica (BLACK e OLSON, 1998).

Os fatores da família MEF2 podem ser ativados por cálcio, calcineurina, MAP quinases p38, ERK5 e CaM quinase, fosforilação por quinases em resíduos de treonina e serina e a acetilação em resíduos de lisina pelo co-ativador p300. Além disso, os fatores MEF2 também são regulados pela associação com deacetilases de histonas da classe II (HDAC-II) no núcleo. Neste caso, a sinalização pelo cálcio, através da ativação de CaM-quinase leva à fosforilação de HDAC-II, que se transloca para o citosol, permitindo a ativação dos fatores MEF2 (BACKS & OLSON, 2006).

As HDACs reprimem a atividade de MEF2 ao deacetilar a porção N-terminal das histonas, o que resulta em condensação da cromatina (LU et al., 2000). Este mecanismo inibe a atividade de transcrição de MEF2, porém sem afetar a afinidade de MEF2 pelo DNA. Neste contexto, a Calmodulina Quinase (CaMK) estimula a atividade de transcrição de MEF2 principalmente por liberá-lo dos efeitos inibitórios das HDACs, através da

fosforilação de dois resíduos de serina na região N-terminal das HDACs (MCKINSEY et al., 2001; BACKS e OLSON, 2006).

As principais proteínas quinases envolvidas na ativação direta de MEF2 são pertencentes à família de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK *-mitogen-activated protein kinase*). A ativação de MEF2 pelas MAPK p38 e ERK5 ocorre pela fosforilação em resíduos de serina e treonina no domínio de transativação de MEF2, levando a um aumento na atividade transcricional desse fator de transcrição (KATO et al., 1997; ZHAO et al., 1999). Já a ativação de MEF2 por calcineurina ocorre pela defosforilação de alguns resíduos de serina que potencializam a atividade transcricional de MEF2 sem alterar a afinidade desse ao DNA (WU et al., 2001).

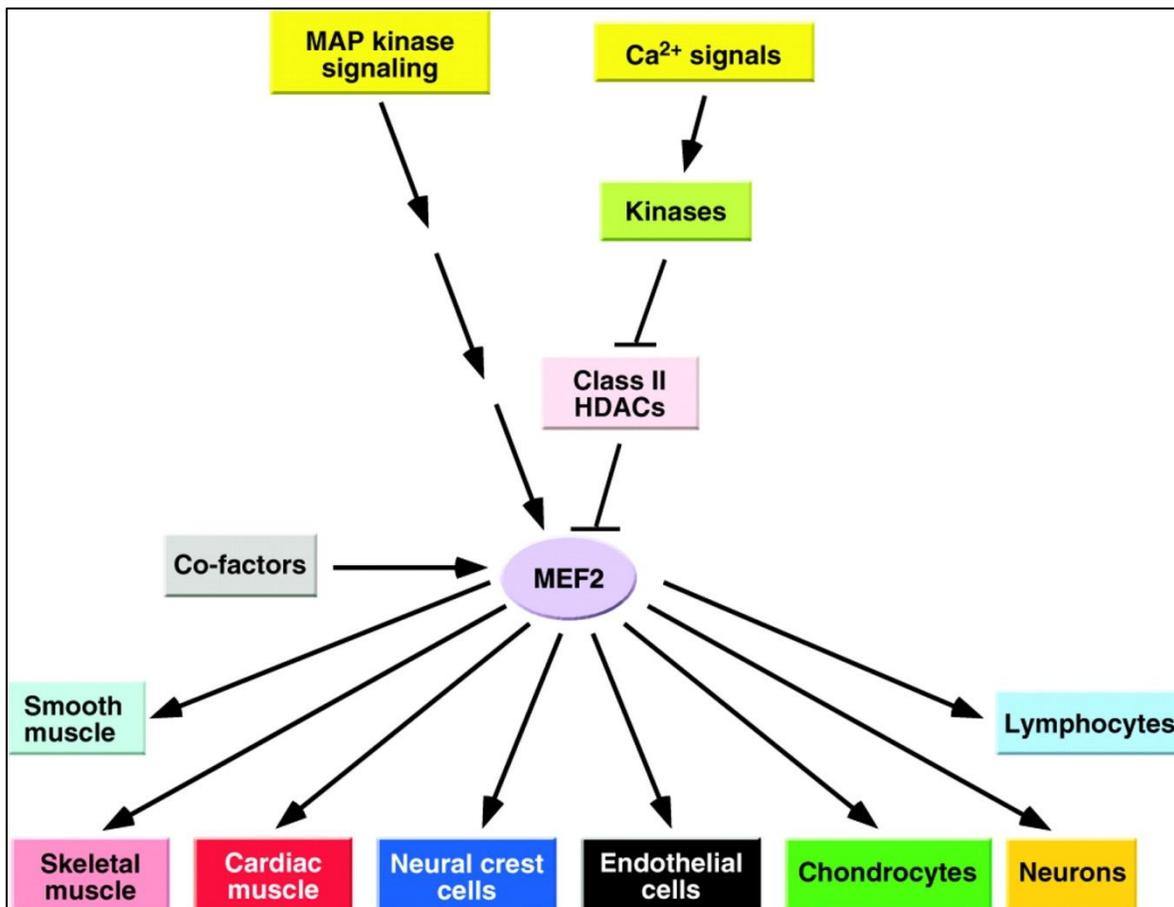


Figura 3: Figura esquemática demonstrando os tipos de regulação dos fatores de transcrição MEF2

Outro nível de regulação da atividade de MEF2 se dá através da acetilação de resíduos de lisina no domínio de transativação de MEF2 pelo o co-ativador transcricional p300 (MA et al., 2005; HE et al., 2011).

Por fim, foi demonstrada uma associação entre MEF2 e o repressor transcricional Cabin-1 que é responsável por interagir diretamente com o domínio MEF2 e recrutar Histonas Deacetilases para a região, levando ao silenciamento gênico (HAN et al., 2003).

Em nosso laboratório demonstramos através de ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética (EMSA ou *shift*) que a atividade do fator de transcrição MEF2 está aumentada em corações de ratos submetidos à coarctação da aorta por 1 e 2 horas, visto que a expressão permanece inalterada durante esse período experimental. Nesse mesmo estudo foi avaliada a interação do MEF2 com a ERK5. Essa interação apresentava-se significativamente aumentada em corações de animais submetidos a sobrecarga pressórica (NADRUZ et al., 2003).

### **1.2.3. Importância da família MEF2 no coração**

Tendo em vista que a família MEF2 possui 4 membros e que eles são expressos constitutivamente no miocárdio, faz-se necessário uma avaliação da importância de cada um destes membros em diversos modelos animais e celulares. Sendo assim vários grupos tentaram elucidar o papel de MEF2 no miocárdio.

MEF2C demonstra ser indispensável para o desenvolvimento normal do coração. Estudos demonstram que a deleção de MEF2C promove a morte de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento fetal, devido à parada do desenvolvimento do tubo cardíaco (LIN et al., 1997). Camundongos que expressam um dominante negativo de MEF2C no coração também morrem durante o desenvolvimento pós-natal, sendo encontrado hipodesenvolvimento cardíaco (KOŁODZIEJCZYK et al., 1999). Camundongos com deleção de MEF2A morrem subitamente durante o período perinatal com dilatação do ventrículo direito, defeitos de condutância, desorganização miofibrilar e anormalidades na estrutura de mitocôndrias (NAYA et al., 2002).

Mais recentemente nosso laboratório demonstrou que o silenciamento do fator de transcrição MEF2C atenua a hipertrofia do ventrículo esquerdo em resposta a sobrecarga de pressão (PEREIRA et al., 2009). O silenciamento foi realizado com a injeção na veia jugular de siRNA e o silenciamento permanecia por até 4 dias e os animais que permaneceram coarctados por 7 e 15 dias apresentaram uma menor espessura da parede posterior e menor peso relativo comparados aos animais que receberam apenas o siRNA irrelevante.

Por outro lado, estudos demonstraram que a superexpressão de MEF2A e MEF2C está associada ao aparecimento espontâneo de cardiomiopatia dilatada em camundongos. Nesse modelo, a sobrecarga de pressão induzida pela coarctação da aorta não foi acompanhada por hipertrofia cardíaca compensatória. Ao contrário, esses animais apresentaram efeitos ainda mais deletérios na estrutura e função do coração, com uma exagerada dilatação cardíaca, em resposta a sobrecarga mecânica. A superexpressão de MEF2A e MEF2C em cultura de miócitos cardíacos induziu desorganização sarcomérica, com alterações morfológicas das células, sem evidências de hipertrofia (XU et al., 2006).

Ainda nesse contexto, outros estudos evidenciam que MEF2 não é necessário para a resposta hipertrófica do coração frente a estímulos mecânicos. EL AZZOUZI e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição da atividade dos fatores MEF2, com utilização de dominante negativo, não impede o desenvolvimento da hipertrofia e insuficiência cardíaca durante a sobrecarga de pressão em ratos. Além disso, esses animais apresentaram uma disfunção cardíaca exagerada em resposta a sobrecarga pressórica crônica. Os animais com diminuição da atividade de MEF2 e submetidos a sobrecarga de pressão, apresentaram defeitos mitocondriais, diminuição significativa de NADH

desidrogenase 6, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e aumento de morte celular por apoptose (EL AZZOUZI et al., 2010). Esses dados sugerem que a atividade transcricional de MEF2 no coração é importante para a adaptação mitocondrial em resposta a sobrecarga de pressão, uma vez que a progressão para a insuficiência cardíaca está associada com uma diminuição na atividade das vias respiratórias mitocondriais que levam a uma capacidade diminuída na produção de ATP (INGWALL e WEISS, 2004).

Outro membro desta família de fatores de transcrição também estudado foi o MEF2D. Camundongos que não expressavam MEF2D, especificamente no coração, apresentaram resistência a hipertrofia cardíaca, a ativação gênica fetal e a formação de fibrose frente a sobrecarga de pressão por coarctação da aorta. Por outro lado no mesmo trabalho foi demonstrado que a superexpressão de MEF2D por si causa um típico quadro de cardiomiopatia com dilatação atrial, formação de trombos, fígado e pulmões congestivos além de extensa fibrose cardíaca (KIM et al., 2008).

Com base em todos os trabalhos já realizados para elucidar a importância dos fatores de transcrição MEF2, podemos dizer que as conclusões são pouco claras, uma vez que os resultados são até sobrepostos. Sendo assim faz-se necessário o melhor entendimento do papel de MEF2 no desenvolvimento da hipertrofia e na homeostase do miócito cardíaco.



## ***2- OBJETIVO***



**I. OBJETIVO**

Avaliar os eventos moleculares e os efeitos fenotípicos da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos e do silenciamento de MEF2C em coração de camundongos adultos coarctados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar as alterações moleculares e fenotípicas da superexpressão de MEF2C em cultura de miócitos cardíacos primários de ratos neonatos.
2. Avaliar as alterações moleculares e fenotípicas da superexpressão de MEF2C em cultura de miócitos cardíacos primários de ratos adultos.
3. Avaliar os efeitos do silenciamento gênico de MEF2C por meio de shRNA em coração de camundongos swiss submetidos à coarctação da aorta por 15 dias.



### ***3- MATERIAL E MÉTODOS***



### 3.1. Material

Anticorpos: anti-GAPDH (FL335), anti-Desmina (H76), anti-Ciclina E1 (M-20), anti-Actina (H196), anti-LC3, anti-Atg12, anti-Dram1, anti-Becn1, foram obtidos da empresa da Santa Cruz Biotechnology, anticorpo secundário anti-*rabbit* biotilado foi obtido da empresa da Amersham, anticorpo secundário anti-*mouse* biotilado da Amersham, anti-MEF2C (AP100561) foi obtido da empresa da Protein Tech e anti-Miosina (ab- 15-100) da Abcan.

Primers para PCR em tempo real: Prodimol

PRIMER	SEQUENCIA
GAPDH (rat) F	5'- GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA -3'
GAPDH (rat) R	5'- AGG GTG CAG GGA ACT TTA TT -3'
MEF2C (rat) F	5'- GCA AGC ACA CAA TGC CAT CA -3'
MEF2C (rat) R	5'- ACT GGG GTA GCC AAT GAC TG-3'
Ciclina E (rat) F	5'- CGT TTA AGC CCC CTG ACC AT -3'
Ciclina E (rat) R	5'- GAT CTG CAC GAA GAC CTG CT -3'
CDK2 (rat) F	5'- AAA TCC GGC TCG ACA CTG AG -3'
CDK2 (rat) R	5'- TCC AGC AGC TTG ACG ATG TT -3'
Aurora kinase B (rat) F	5'- CTC GGG AGA AGA AAA GCC GT -3'
Aurora kinase B (rat) R	5'- TGG ATT TCG ATC TCT CGG CG -3'
Desmina (rat) F	5'- CCG ATC CAG ACC TTC TCT GC -3'
Desmina (rat) R	5'- TCT CCA TCC CGG GTC TCA AT -3'
Actina cardíaca (rat) F	5'- TAT GCC TTA CCC CAT GCC AT -3'

Actina cardíaca (rat) R	5'- TCA CGT TCA GCG GTG GTG ACA -3'
Actinina (rat) F	5'- CCA ACA TGC TAA TGA GCG CC -3'
Actinina (rat) R	5'- CCC TGT GAT CTG GAT GGA GC -3'
Miomesina 1 (rat) F	5'- GCA ACT GGC CAT TCT ACC CT -3'
Miomesina 1 (rat) R	5'- GGG CCT TGT TTC CTG ATC CA -3'
Miosina 6 (rat) F	5'- CTG CTC TCC ACC GGG AAA AT -3'
Miosina 6 (rat) R	5'- GTT GTC CAT CAC CCC TGG AG -3'
Miosina 7 (rat) F	5'- CTG CTC TCC ACC GGG AAA AT -3'
Miosina 7 (rat) R	5'- CCG CAC TGC ACA GGA AAA T -3'

### Reagentes

Os seguintes produtos: agarose, brometo de etídeo, DEPC, SDS, poliacrilamida, TEMED (Invitrogen); antibióticos, triptona, etanol, metanol (Merck); nucleotídeos, enzimas de restrição, *Taq* DNA polimerase e ligase, foram adquiridas junto a Invitrogen, Promega ou GE Healthcare, SuperSinal west Pico Chemiluminescent Substrate e Syber Green (Invitrogen).

DMEM e estreptomicina-ampicilina da Nutricell, soro fetal bovino e soro eqüino da Gibco BRL Co., soro fetal bovino da Hyclone, Lipofectamina da Invitrogen, streptoavidina conjugada a Cy2 e faloidina conjugada a rodamina da Sigma, Vectashield da Vecta. Colagenase fração IV foi obtida da empresa Worthington Biochemical Corp., propriedade. PMSF, aprotinina, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glicerol, soro de albumina

bovino (BSA-fração V), pancreatina, tripsina, gelatina, rapamicina e demais reagentes utilizados foram obtidos da empresa Sigma Chemical CO.

### Plasmídeos

Plasmid: pSilencer 1.0-U6: Ambion - AddGene

Produção viral: #304 U6 shRNAMEF2C, PMD2G e VSVG cedidos gentilmente pelo Dr. Márcio Chaim Bajgelman (LNBio- Laboratório Nacional de Biociências).

### Meio de cultura LB (Luria – Bertani)

O meio de cultura LB foi utilizado no crescimento bacteriano, o meio líquido na expressão proteica e o meio sólido para a manutenção das colônias bacterianas. Ele é composto por triptona 10 g/L, cloreto de sódio (NaCl) 10 g/L e extrato de levedura 5 g/L.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Cultura de Células – Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos (MVRNs)**

Detalhes da técnica de cultura de cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos *Wistar* neonatos de 1 a 3 dias de vida, foi realizado conforme descrito anteriormente (TORSONI et al., 2003). Os ratos neonatos tiveram seu coração extraído do tórax e os ventrículos foram separados dos átrios, reduzidos a pequenos tamanhos com o auxílio de pinça e tesoura estéreis e transferidos para uma placa contendo solução tampão ADS 1X estéril (6,8 g NaCl, 4,76 g Hepes, 0,138 g NaH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g D-glucose, 0,4 g KCl, 0,195 g MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>4</sub>O e água Milliq para um volume final de 100 ml). O tecido foi então submetido a múltiplas digestões enzimáticas (5 a 6 digestões de 20 minutos cada) à 37 °C usando-se para isso uma mistura de colagenase tipo II (80 Mandl U/ml) e pancreatina (0,6 mg/ml) (tampão ADS 1X, 80 unidades/ml colagenase tipo II e 0,6 mg/ml pancreatina). A solução obtida em cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1,0 ml de soro fetal bovino (SFB), centrifugada (3000 rpm, 5 minutos, 37° C) e os *pellets* resultantes foram ressuspendidos em 1,0 ml de SFB, colocados em placa de cultura e mantidos em uma atmosfera de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, à 37° C, até o final da digestão do restante do tecido.

Os cardiomiócitos foram purificados em gradiente descontínuo de Percoll, ressuspendidos em meio de plaqueamento contendo DMEM, 10% de soro de cavalo, 5% de soro fetal bovino, bromodeoxiuridina 0,01% e 0,5% de antibiótico

(penicilina/estreptomicina - 100 U/ml). Plaqueados em placas de petri contendo colágeno tipo I (Flexcell International Corp.). Após 48 horas, o meio foi substituído pelo meio de manutenção contendo DMEM, 0,5% antibiótico (penicilina/estreptomicina - 100 U/ml), bromodeoxiuridina 0,01% e os miócitos foram incubados por 24 horas em estufa (atmosfera de 95% de O<sub>2</sub> suplementado com 5% CO<sub>2</sub>).

### **3.2.2. Cultura de Células – Miócitos Ventriculares de Ratos Adultos**

Cardiomiócitos foram isolados de ratos machos Wistar-Kyoto (5-8 semanas, 70-120 g) por dissociação enzimática de todo o coração em um aparelho de perfusão, como descrito em (ZHANG et al., 2010). Os animais foram heparinizados e anestesiados por cetamina / xilazina (30 mg/kg e 6 mg/kg, respectivamente). Os corações foram rapidamente retirados e limpos para remoção de sangue em solução gelada de *Tyrode* antes de ser montado no aparelho de perfusão. Em seguida o coração foi perfundido retrogradamente com as quatro seguintes soluções oxigenadas em ordem sequencial: 1- Solução *Tyrode* modificada contendo 1,0 mM de Ca<sup>2+</sup> (2 min); 2- Solução *Tyrode* modificada livre de Ca<sup>2+</sup> (2-3 min); 3- Solução *Tyrode* modificada livre de Ca<sup>2+</sup>, contendo 0,2 unidades de WUNSCH/ml de collagenase por 10-15 minutos dependendo das condições de digestão; 4- Lavagem em solução de KB por 5 min. Os atrios foram separados e os ventrículos digeridos foram cortados e picados em solução KB, foi feita pipetagem para dissociar as células, depois filtrada através de uma malha de nylon (200 µm de tamanho dos poros) para remover pedaços grandes de tecido não digerido. As células isoladas foram lavadas em

solução KB e deixadas em repouso por gravidade 3 vezes para remover detritos e não-cardiomiócitos. As células foram ressuspensas em solução KB e foram pipetadas acima da camada de um gradiente de Percoll formada por 20%, 40%, 70% e centrifugadas a 100g por 20 min para purificar os cardiomiócitos. Após três lavagens em solução KB, os miócitos foram ressuspensos em solução KB ou em meios de cultura para experimentos futuros. Solução modificada de *Tyrode* contém (mmol / L): NaCl 105, KCl 5,4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6, NaHCO<sub>3</sub> 6, KHCO<sub>3</sub> 5, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, Glucose 5, taurina 20 (pH 7,35 com NaOH), e solução KB contém (Mmol / L): KCL 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, K +-gLUTAMATO 70, MgCl<sub>2</sub> 1, GLICOSE 25, B-hidroxi-ácido 10, taurina 20, EGTA 0,5, HEPES 10, e 0,1% de albumina (pH 7,25 com KOH). Os miócitos purificadas foram ressuspensos em meio 199 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 110 mg de piruvato de sódio, 0,1 mmol/L de B-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, e 5% de FBS (Invitrogen) e cultivados em placas revestidas de laminina em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A concentração de SFB no meio foi gradualmente aumentada para 10% e 20%, no segundo e terceiro dia de cultura respectivamente.

### **3.2.3. Partículas Adenovirais**

No presente estudo, as partículas adenovirais de MEF2C (Ad-MEF2C) do mutante K23A/K24A de MEF2C (Ad-MEF2C23/24) e do controle  $\beta$ -Galactosidade (Ad- $\beta$ -Gal) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jeffery Molkenin (*University of Cincinnati*) e utilizado conforme descrito em (XU et al., 2006).

### **3.2.4. Extrato Proteico de Células**

Ao final do período experimental, as células foram rapidamente removidas, homogeneizadas imediatamente em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,1 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100). Os homogenatos foram sonicados (3 pulsos de 5 segundos, nível 2), e adicionados 10% de Triton 10%. Após 30 min de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 min para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de *Lowry*.

Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão de Laemmili 5x (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e 0,015g de DTT, foram aquecidos a 100° C por 5 min e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

### **3.2.5. Quantificação de proteínas por método de *Lowry***

O método de *Lowry* foi escolhido para a quantificação de proteínas extraídas de cultura de células por ser o mais sensível e preciso em amostras de baixa concentração protéica e cada amostra foi analisada em triplicata.

Neste método modificado, a cada 1ml de solução C foram adicionados 10µl de amostra e os tubos de ensaio foram incubados por 10 min protegidos da luz. Após este período, adicionou-se 50µl de *Folin Cicauteau* e as amostras foram incubadas por mais 30 min protegidas da luz. Após esta última incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 660nm (LOWRY, et al., 1951).

Para o cálculo de concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina bovina, variando as concentrações de 10µg/µl a 0,625µg/µl, e os valores de absorbância obtidos das amostras foram comparados para adquirir a concentração de proteínas correspondentes.

### **3.2.6. Western Blotting**

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 10% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD miniature slab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 min a 120V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD., utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 45 min, a temperatura ambiente, em tampão de bloqueio (5% BSA; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação

inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 15 min em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais, todos na diluição de 1:1000 em tampão de anticorpo (3% BSA; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante toda a noite, a 4° C.

Após serem lavadas por 15 min em solução basal, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 120 minutos. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos em solução basal. As membranas são expostas a um agente quimioluminescente, e a reação produz fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína. As imagens foram adquiridas no Image Quant™ 300 da GE Healthcare. As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica através do software ImajeJ.

### **3.2.7. Microscopia de luz e análise morfológica**

Para a análise morfológica dos cardiomiócitos estas células foram fixadas em metanol por 20 minutos a temperatura ambiente.

Coloração Hematoxilina-eosina

- hematoxilina de Harris – 1 minuto
- lavagem em água – 5 minutos
- eosina – 30 segundos

### **3.2.8. Protocolo Citometria de Fluxo - Ciclo Celular**

Para este experimento foram usadas aproximadamente  $10^6$  células que foram centrifugadas e lavadas com 500 $\mu$ L de PBS 1X em tubos de 15mL. Após, às células foi adicionado 4,5mL Etanol 70% em PBS 1X e ressuspensas imediatamente e estocadas em geladeira a 4°C. Para o dia da leitura as células foram centrifugadas a 330g, 4°C, 5 minutos e tiveram o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500 $\mu$ L de Iodeto de Propídeo (0,1% Triton X-100; 20mg RNase A; 2mg de Iodeto de Propídeo; em 100mL de PBS 1X) , ressuspensado e incubadas a 37°C por 20 minutos e imediatamente colocadas no gelo por mais 30 minutos. As células foram centrifugar a 330g, 4°C, 5 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionar 500 $\mu$ L de PBS1X, mantidas à 4°C protegido da luz.

### **3.2.9. Microscopia de Imunofluorescência**

Miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura foram lavados em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e as células foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, este material foi submetido à reação de imunofluorescência.

Após lavagem em PBS 0,1 M, pH 7,4, MVRNs foram incubados com solução bloqueadora (0,8% Triton X-100, 3% leite em pó desnatado, diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4), por 1 hora, à TA, a fim de se evitar a ligação de proteínas não-específicas. Em seguida, as células foram incubados com o anticorpo primário (anti-MEF2C na diluição da

1:100) em solução de marcação (1% BSA diluída em PBS 0,1M, pH 7,4), em câmara úmida e fechada, por 16 horas à 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS 1x. Anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 568 ou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) foram utilizados. As lamínas com cardiomiócitos foram incubadas com faloidina conjugada à rodamina (anti-actina). As lâminas foram montadas com o meio de montagem Vectashield com ou sem DAPI. As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio de fluorescência (Leica DM4000).

### **3.2.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura foram submetidos ao tratamento com vírus por 48 horas. Após isso, as células foram lavadas e fixadas com solução de Glutaraldeído 2,5% em Tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4 com 0,5% de ácido tânico durante 2 horas a 4°C. A seguir:

1. Lavagem em tampão Cacodilato 0,1M três vezes durante 5 minutos cada à temperatura ambiente.
2. Pós-fixação em Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4 durante 1 hora à 4°C
3. Lavagem com tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4 - três vezes durante 5 minutos cada à 4°C.

4. Desidratação em Etanol

Etanol 70%.....20 min. (4° C)

Etanol 95%.....20 min temp.

Etanol 100%.....2X-20 min

5. Embebição em Resina Epóxi EPON 812

Resina:Etanol .....1:3 – 1-2 horas

Resina:Etanol .....1:1 – 02 horas

Resina:Etanol .....3:1 – 16 horas

Resina Pura .....12 horas -2x

Resina Pura .....Para polimerizar- Estufa 60°C

6. Polimerização em estufa 60°C, durante 72 horas

7. Remoção do suporte plástico+lâmina de vidro da resina. Foi feita uma triagem prévia da monocamada ao microscópio invertido.

8. Obtenção de cortes ultra-finos de 70nm paralelos às superfícies das monocamadas celulares, com emprego de Ultramicrotomo Leica (modelo UCT-Leica Áustria) e faca de diamante (Diatome- USA). Coleta de cortes ultra-finos em “*grids*” de Cobre de 200 mesh.

9. Contrastação com acetato de uranila durante 20 minutos e posteriormente com citrato de chumbo, durante 10 minutos.

10. Observação e análise ao Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906 (Leica – Alemanha) operando com tensão aceleradora de 60kV e equipado com sistema de captura de imagens digitais Morada (Gatan-USA).

### **3.2.11. Extração de RNA total**

Foi empregado Trizol para obtenção de RNA total e seu uso posterior em PCR em tempo real. Às placas de petri foi adicionado 1ml de Trizol gelado e raspadas as células. O homogeneizado foi deixado à temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 200µl de clorofórmio, homogeneizado e, após a centrifugação (12.000rpm, 4°C, por 10 min), foi separada a fase aquosa (superior) contendo o RNA total. Para precipitar o RNA, adicionou-se 1/10 do volume inicial de NaAc 3,0M pH5.3 e 2,5X do volume inicial de etanol absoluto gelado, incubou-se à -20°C por 2hs e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 12.000rpm, 4°C, por 15 min. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com etanol 75%. Após a secagem, o pellet foi ressuspenso em 200µl de água MilliQ tratada com DEPC. A amostra ressuspenso foi submetida à nova extração com fenol e clorofórmio. Adicionou-se 200µl de fenol à amostra, misturou-se e centrifugou-se por 12000rpm, 3 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e adicionou-se 160µl de clorofórmio, misturou-se e centrifugou-se por 12000rpm, 3 min a 4°C. O RNA total foi precipitado com 1/10 do volume inicial de NaAc 3,0M pH5.3 e 2,5X do volume inicial de etanol absoluto gelado, incubou-se à -20°C por 8hs e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 12000rpm, 4°C, por 15 min. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com etanol 75%. Após a

secagem, o pellet foi ressuscitado em 30 $\mu$ l de água MilliQ tratada com DEPC e armazenado a -70°C. Para o uso do RNA total na RT-PCR, este foi submetido ao tratamento com DNase.

#### Tratamento com DNase

Para a reação usou-se: 1 $\mu$ g de RNA total, 1 $\mu$ l tampão 10X, 1 $\mu$ l DNaseI AmpGrade (1U) e água MilliQ tratada com DEPC q.s.p. 10 $\mu$ l. A reação ocorreu por 15 min. a temperatura ambiente e foi paralisada com 1 $\mu$ l de 25mM EDTA e 65°C por 10min. Em seguida adicionou-se 190 $\mu$ l de água MilliQ para se obter um volume final de 200 $\mu$ l e se iniciou a extração do RNA por fenol clorofórmio. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 30 $\mu$ l de água MilliQ com DEPC e estocado a -70°C.

### **3.2.12. Microarranjo de DNA**

As amostras de RNA mensageiro foram hibridizadas em lâminas de DNA de *Rattus norvegicus* (Affymetrix, Santa Clara, CA) conforme as recomendações do fabricante. Cada Chip de DNA contém aproximadamente 33 mil sondas representando, portanto, genes transcritos que podem ser analisados simultaneamente com relação a seus respectivos níveis de expressão.

As lâminas foram escaneadas (Affymetrix Gene Chip Scanner 3000–7G) e analisados no programa ArrayAssist (ArrayAssit x.5, Stratagene, USA) utilizando-se o algoritmo MAS5 para normalização e correção da linha base. Os tratamentos foram analisados sempre em comparação ao tratamento controle Adenovírus  $\beta$ Gal. Dados como genes presentes, induzidos ou reprimidos foram levados em consideração. Todos os genes com nível de expressão (*fold-change*) acima ou abaixo de 2 foram analisados. Cada experimento foi realizado a partir de três réplicas biológicas.

### **3.2.13. Análise da expressão de transcritos por PCR em tempo real**

O PCR em tempo real (qRT-PCR) foi utilizado para confirmar a expressão de diversos genes em amostras de cultura de células de cardiomiócitos tratadas com adenovírus. A síntese de cDNA foi realizada incubando-se 2 $\mu$ g de RNA total de cultura de células de cardiomiócitos com iniciadores randômicos (Randon Primer 250ng - Invitrogen), 50U da enzima SuperScriptIII<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen) e os seguintes ciclos:

25°C por 5 min, 42°C por 1 h e 70°C por 15 min. Além disso, essa técnica nos propiciou uma quantificação relativa da expressão dos genes através da comparação da amplificação do cDNA entre os grupos controles e os tratados.

A qRT-PCR foi realizada em um sistema MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA), utilizando sistema SYBR green. Os primers foram desenhados utilizando Primer Express Software (PerkinElmer Life Sciences) e validado através da análise das curvas de dissociação e modelo titulação. Cada qRT-PCR (volume final de 12 µl) contém 10 ng de RNA transcrito (cDNA), 400 nM de cada primer e 6 µl de *SYBR Green PCR Master Mix* 2X (Invitrogen). Cada amostra foi analisada em triplicata. As condições da PCR foram: 50 ° C por 2 min (1 ciclo), 95 ° C por 10 min (1 ciclo); 95 ° C durante 15 segundos, 57 ° C por 1 minuto (35 ciclos). Os resultados foram avaliados pelo método do CT comparativo (User Boletim n ° 2, PerkinElmer Life Sciences) sendo os valores comparados pelas eficiências de cada par de oligos previamente padronizados no laboratório. O gene GAPDH foi usado como controle e a amostra controle foi usada como normalizadora.

#### **3.2.14. Digestão das amostras para análise por espectrometria de massas pelo método *Label Free***

As frações foram submetidas ao protocolo de digestão em solução, conforme especificações do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio. Cerca de 1000µg de proteínas de cada extrato foram submetidos à redução com DTT em uma concentração final de 5 mM por 25 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à alquilação por 30

min, protegidas da luz, com iodoacetamina em uma concentração final de 14 mM. Em seguida, adicionava-se novamente DTT para uma concentração final de 5 mM e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz por mais 15 minutos. Adicionou-se então cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) para um concentração final de 1 mM, seguida da tripsina na proporção de 1:50 (1 µg de tripsina para 50 µg de proteína). A digestão ocorreu por 16h a 37°C. No dia seguinte, a reação foi interrompida com a adição de ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4%. O pH foi acertado para um valor menor que 2 e a amostra centrifugada a 2500 xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e a solução evaporada em *speed vac*.

#### Análise por espectrometria de massas

Cerca de 50µg de proteína foram injetados no espectrômetro de massas, do tipo Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Hampton, USA), em um fluxo de 0,3 µL/min. Os peptídeos foram dessalinizados na coluna *trap*, e então direcionados para coluna de separação (C18) onde foram eluídos aumentando-se a concentração de acetonitrila. Na análise dos peptídeos, a aquisição dos espectros de MS/MS foi feita por um experimento do tipo DDA (análise dependente dos dados), onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de massa. No caso da presença de espécies multicarregadas, as três mais intensas foram selecionadas e então fragmentadas na câmara de colisão, contendo gás argônio (energia de colisão definida pela m/z e carga do precursor). Os tempos de corrida foram de 45 minutos e as frações que identificavam mais proteínas eram novamente analisadas com um tempo de corrida de 90 minutos.

Análise dos dados obtidos

Os espectros foram processados pelo programa *Mascot Distiller* (*Matrix Science*) e os resultados gerados foram submetidos ao programa MASCOT 2.3.0 (*Matrix Science*) contra o banco de dados *IPI Rat* (versão 3.86).

Pelo método de *Label-Free*, a contagem de espectros (*Spectral Counts*) foi normalizada pelo programa *Scaffold*<sup>TM</sup> 3.3.1 (*Proteome Software*). Para interpretação e comparação dos resultados de quantificação, foram utilizados 60% de probabilidade de peptídeos identificados e *scores* do Mascot (*Ion score* em 30 para os íons +1, +2, +3 e +4). Neste trabalho, apenas se considerou proteínas reguladas aquelas que apresentavam o mesmo perfil de expressão em pelo menos dois experimentos independentes.

**3.2.15. Construção do vetor lentiviral #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>**

A sequência que codifica shRNA<sup>MEF2C</sup> mais o promotor U6 próprio para a RNA polimerase III foram inseridos em um vetor de clonagem viral cedido pela Dra. Priscila Zenatti (LNBio). O uso de vetores lentivirais que contém sequência de shRNA são vantajosos em relação ao siRNA sintéticos pois oferecem um silenciamento do gene de interesse prolongado. Para a construção do vetor lentiviral #304 U6 shRNA<sup>MEF2C</sup> o cassette U6-shRNA<sup>MEF2C</sup> foi removido do vetor pSilencer MEF2C (Figura 4) e clonado no vetor #304 (Figura 5). Nesta etapa da clonagem das construções do vetor lentiviral #304 U6

shRNA<sup>MEF2C</sup> tivemos a colaboração da Dra. Carolina Fernanda Manfredi Zambon Clemente pesquisadora do laboratório de modificação do genoma, LNBio. A produção das partículas virais foi feita no Laboratório de vetores virais (LVV) do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, sob a coordenação do Dr. Márcio Chaim Bajgelman.

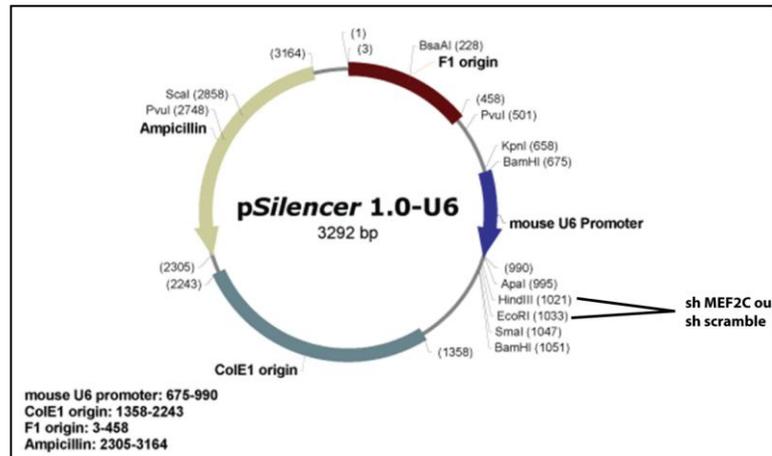


Figura 4:Esquema representativo do vetor pSilencer MEF2C

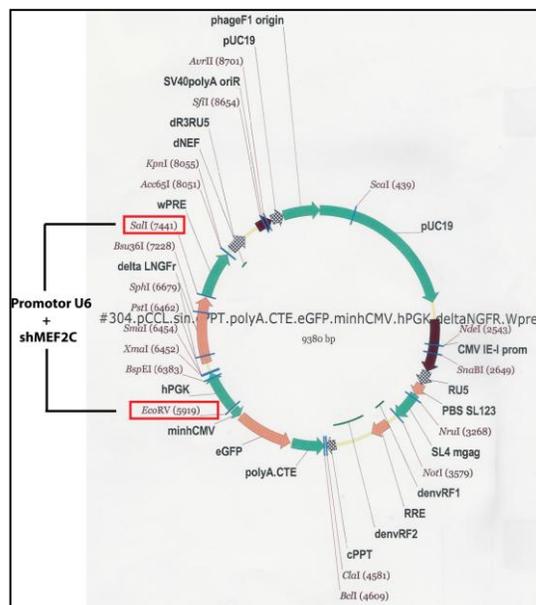


Figura 5: Esquema representativo do mapa referente ao vetor lentiviral #304 e o local onde foi feita a clonagem

### **3.2.16. Extração de plasmídeos em mini-escala (miniprep)**

Os plasmídeos foram extraídos a partir de 2ml de cultura em LB/Amp incubados por uma noite, pelo método de hidrólise alcalina e ressuspensos em 50µl de H<sub>2</sub>O milliQ contendo (RNase 1µg/ml).

### **3.2.17. Extração de plasmídeos em larga escala (maxiprep)**

As colônias que cresceram isoladas nas placas LB agar com antibiótico ampicilina foram transferidas para Erlenmeyer com 50ml de meio LB líquido com ampicilina. Estas colônias foram mantidas a 37°C, 200rpm por uma noite. Este meio foi centrifugado em tubos de centrífuga a 9000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se as soluções P1 (50mM TrisHCl pH8.0/ 10mM EDTA) P2 (200mM NaOH/ 1% SDS) e P3 (3M acetato de potássio pH5.5). Após agitação vigorosa, os tubos foram centrifugados a 9000g por 1 hora. O sobrenadante foi transferido para novos tubos onde foi adicionado isopropanol. Os tubos foram agitados e centrifugados a 9000g por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi purificado pela técnica de fenol-clorofórmio. No final do protocolo o precipitado foi lavado com etanol 75% e centrifugado por 5 minutos a 9000g. Os precipitados foram ressuspensos em água miliQ autoclavada.

### **3.2.18. Produção de Lentivírus**

As partículas lentivirais para shMEF2C foram produzidas pelo Laboratório de vetores virais do LNBio / CNPEM / MCTi (LOIS et al., 2002).

Células embrionárias de rim humano (HEK) 293T aderentes foram cultivadas em DMEM (Gibco-BRL) suplementado com soro bovino fetal a 10% (FCS) (Hyclone), penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 mg / mL) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Para a produção dos lentivírus,  $1,0 \times 10^6$  células HEK 293T foram plaqueadas em placas de petri de 10mm com DMEM + 10% soro bovino fetal + 1% antibióticos. Posteriormente, o vetor lentiviral #304 U6 shRNA<sup>MEF2C</sup> (20ug), que foi co-transfectado com sistema de empacotamento para envelope de VSV-G (*vesicular stomatitis virus glycoprotein*). As preparações contendo genes repórteres foram tituladas por citometria de fluxo (BAJGELMAN et al., 2003).

No terceiro dia, o meio contendo vetor lentiviral foi colhido e os debris celulares foram removidos por centrifugação por 5 min a 1200 rpm. O sobrenadante viral foi ultracentrifugado a 200.000g por 2 horas, ressuspendido em 150ul de PBS gelado e armazenado em freezer -80°C. O título viral foi determinado a partir de células NIH 3T3 que foram plaqueadas em placas de seis poços e receberam quantidades crescentes do sobrenadante viral. O rendimento da produção das partículas virais foi determinado pela fluorescência GFP por citometria de fluxo. O título é expresso como unidades transacionais por mililitro (UT/ml) e os valores foram corrigidos para a variação entre as sessões.

### **3.2.19. Citometria de fluxo**

Após a produção das partículas virais células HEKs 293 foram transduzidas com quantidades crescentes de vírus e foram extraídas e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo cujo equipamento usado foi BD FACSCalibur e o software FACSDiva.

### **3.2.20. Modelo de injeção de partículas virais em camundongos swiss**

Para a realização da cirurgia para injeção de partículas virais, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e de Xilazina (5mg/kg) e colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo para visualização do coração, 50ul de sobrenadante viral foi injetado diretamente no músculo cardíaco através de 6 a 8 injeções em diferentes porções do músculo cardíaco. A cavidade torácica foi fechada e após a recuperação anestésica os animais foram devolvidos às suas gaiolas. Os animais controles foram submetidos à cirurgia fictícia, com abertura da cavidade torácica e com a injeção da mesma quantidade de PBS. Após 7 dias da injeção os animais foram anestesiados, sacrificados e seus tecidos e plasma foram retirados para posterior análise.

### **3.2.21. Histologia dos corações**

Amostras de corações foram coletadas, fixadas em solução de formalina tamponada 10% por 2 horas. Posteriormente os tecidos foram fixados nos suportes apropriados com auxílio de *Tissue Tek* (Sakura, EUA) e criocortes de 12 $\mu$ m foram feitos utilizando-se o criostado (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) a -25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 0,1M e quando secaram, foram marcadas com faloidina e Dapi.

### **3.2.22. Modelo de sobrecarga pressórica em camundongos**

Para a realização da sobrecarga pressórica, os camundongos foram submetidos ao modelo experimental de coarctação da aorta. Inicialmente, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e de Xilazina (5mg/kg) e colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo e a crossa da aorta foi dissecada e constricta com fio cirúrgico 8.0, tendo como guia uma agulha 20G. A cavidade torácica foi fechada e após a recuperação anestésica os animais foram devolvidos às suas gaiolas. Os animais *sham* foram submetidos à cirurgia fictícia, com abertura da cavidade torácica, porém, sem coarctação da crossa da aorta. A sobrecarga pressórica foi acompanhada por 1, 7 e 15 dias (FRANCHINI et al., 2000).

### **3.2.23. Ecocardiografia**

Para avaliação da estrutura e da função do ventrículo esquerdo, camundongos foram submetidos à ecocardiografia, utilizando o aparelho Toshiba PowerVision e o transdutor linear 7-11 MHz. Os animais foram anestesiados com a mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e de Xilazina (5mg/kg). Após 15 minutos da aplicação do anestésico, o exame foi iniciado. Foram feitos cortes transversais do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares, para medida do septo intraventricular, da parede posterior e do diâmetro diastólico no final da diástole e diâmetro sistólico no pico da sístole. Cada medida foi repetida 3 vezes com arquivo fotográfico (CLEMENTE, et al., 2007).

A fração de encurtamento (%FS) foi calculada pela fórmula:

$$\%FS = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$$

Onde:

DDVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo,

DSVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

### **3.2.24. Hemodinâmica**

Após a ecocardiografia os camundongos foram anestesiados e monitorados hemodinamicamente para obtenção da pressão arterial e da frequência cardíaca. Para isso, foram utilizados cateteres de polietileno (PE-10 estirado) nas artérias carótida e femoral

direita, os quais foram acoplados a transdutores de pressão COBE (Avarda, EUA). O sinal foi amplificado por um amplificador GP4A Stemtech (Stemtech, USA), acoplado a um conversor analógico-digital, conectado a um computador contendo o programa WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments, EUA) para a monitoração hemodinâmica contínua e gravação de dados. Calculou-se o gradiente da pressão sistólica arterial pela diferença entre a pressão sistólica da carótida em relação a da femoral. Os registros hemodinâmicos foram realizados 1, 7 e 15 dias de coarctação da aorta (CLEMENTE, et al., 2007).

#### **3.2.25. Gravimetria do ventrículo esquerdo**

Após a avaliação hemodinâmica, com 7 e 15 dias, os camundongos foram sacrificados e o coração foi retirado, lavado em solução fisiológica e seco delicadamente com uma gaze para a retirada do sangue intracavitário. O ventrículo direito, os átrios e a base do coração foram retirados com a ajuda de um tesoura de ponta fina e o ventrículo esquerdo foi pesado utilizando uma balança de alta precisão. A gravimetria foi calculada pela razão entre a massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final dos animais, multiplicado por um fator 10000 (GUIDO MC, et al, 2007).

#### **3.2.26. Análise estatística**

Toda a análise estatística foi feita com base na média e erro padrão médio. Para cada experimento foram realizadas com distintas culturas primárias e distintos animais de

experimentação. As comparações estatísticas foram feitas utilizando-se t de *Student* e/ou *one-way ANOVA* com pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

## ***4-RESULTADOS***



## **Resultados da avaliação molecular e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos em cultura.**

### **4.1. Avaliação da expressão de MEF2C, por PCR em tempo real e *western blotting* em cultura de miócitos cardíaco tratados com Ad-MEF2C.**

Recentemente foi demonstrado que a superexpressão de MEF2A ou MEF2C em cultura primária de miócitos cardíacos de ratos neonatos utilizando partículas adenovirais, provocou desorganização sarcomérica e alteração no fenótipo desses miócitos cardíaco (XU et al., 2006). No entanto, os eventos moleculares envolvidos e as modificações fenotípicas causadas pela superexpressão de MEF2C em miócito cardíaco ainda não são conhecidas. Diante desses dados, decidimos utilizar o modelo da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos, para compreendermos quais genes apresentam-se alterados, quais vias estão ativadas e quais processos celulares são regulados por MEF2C em miócitos cardíaco. Para isso, uma combinação de ensaios de microarranjo de DNA (*Microarray*), PCR em tempo real, *western blotting* e análises por microscopias de luz, confocal e eletrônica de transmissão foram realizados, comparando células tratadas com adenovírus para MEF2C (Ad-MEF2C) com células tratadas com adenovírus para gene da  $\beta$ -galactosidade (Ad- $\beta$ Gal) como controle. As partículas adenovirais utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jeffery Molkenin (*University of Cincinnati*) e utilizado conforme descrito em (XU et al., 2006).

Os níveis de RNA mensageiro e de proteína de miócitos cardíaco de ratos neonatos em cultura tratados com Adenovírus foram avaliados através das técnicas de PCR em tempo real e *western blotting* (WB), respectivamente. Após 48 horas de tratamento o RNAm foi extraído em Trizol® e as proteínas totais extraídas em tampão RIPA. A análise por PCR em tempo real do grupo tratado com AdMEF2C apresentou um aumento de aproximadamente 35 vezes no nível de RNA mensageiro de MEF2C transcrito comparado ao grupo controle tratado com AdβGal (Figura 6\_A). Já a análise densitométrica do nível de expressão proteica por WB demonstrou um aumento de aproximadamente 5,5 vezes quando comparado ao grupo controle (Figura 6\_B). Sendo assim podemos afirmar que a transdução por partículas adenovirais é eficiente e que induz aumento da expressão gênica de MEF2C em cultura de miócitos cardíaco de ratos neonatos.

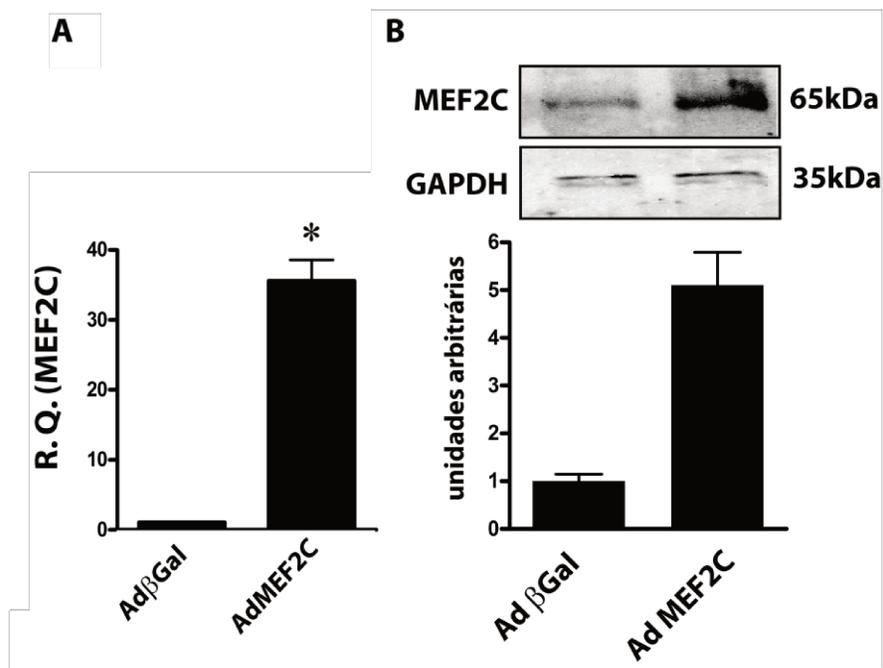


Figura 6: Expressão gênica e proteica de MEF2C. **A.** Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm de MEF2C em miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C comparada ao grupo de células controle Ad-βGal. **B.** Gráfico representativos da expressão proteica de MEF2C em cultura de células tratadas com Ad-MEF2C comparada ao controle Ad-βGal. Normalizado pela proteína GAPDH.

#### 4.2. Análise por microarranjo de DNA da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos.

Uma primeira abordagem para compreendermos o papel de MEF2C em miócitos cardíacos foi avaliar as alterações gênicas provocadas pela superexpressão de MEF2C através do uso da técnica de microarranjo de DNA.

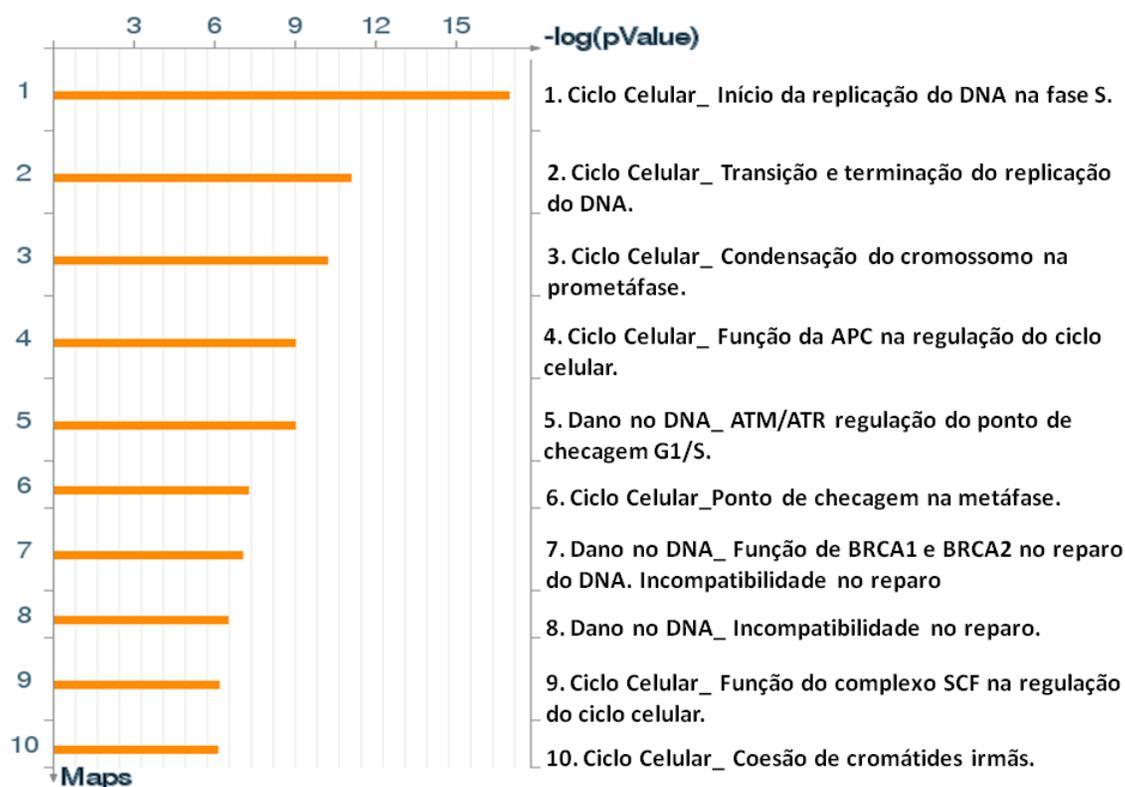
As amostras de cDNA de células tratadas com Ad-MEF2C ou com Ad-βGal foram hibridizadas em triplicata, perfazendo um total de 6 membranas analisáveis. Os valores normalizados das médias da triplicata de cada gene foram submetidos à análise estatística

pelo teste de Wilcoxon, sendo que os p-valores extraídos permitiu agrupá-los em ordem crescente de significância. Destas comparações foram selecionados os genes com p-valores menores que 0,05 (ou seja, os representantes com maior relevância estatística,  $p < 0,05$ ). Os genes do grupo Ad-MEF2C foram comparados com o controle quanto ao nível de expressão do RNAm. Os valores com uma diferença de  $\pm 2$  vezes e valor de  $p < 0,05$ , foram submetidos à análise quanto aos seus aspectos funcionais através do programa *Metacore*<sup>TM</sup>.

Assim, a Tabela 1 sumariza os principais processos celulares e os genes identificados em cada processo, respectivamente, classificados de acordo com o *score* do programa *Metacore*, ao qual é derivado do p-valor de cada gene e indica a probabilidade dos genes alvo em uma rede serem encontrados juntos devido ao acaso.

A lista completa dos 1072 genes diferencialmente expressos (com variação mínima de  $\pm 2$  vezes e valor de  $p < 0,05$ ) entre Ad-MEF2C e Ad- $\beta$ Gal estão demonstrados no Apêndice I, classificados em ordem alfabética.

Tabela 01 – Principais processos celulares envolvidos na superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco, identificados no ensaio de Microarranjo de DNA, classificados de acordo com o *Score* do programa *Metacore* tendo como base o número de genes identificados no processo celular em questão.



Dentre os genes diferencialmente expressos, distribuídos segundo sua relação funcional, observou-se um grande número de genes envolvidos com os processos de Ciclo Celular, Organização Celular, Replicação, Recombinação e Reparo do DNA.

Nesse contexto, a Figura 7 demonstra um resumo do processo de replicação do DNA juntamente com as proteínas envolvidas. Na mesma figura, com uma barra em vermelho ao lado da proteína representa os genes que apresentaram aumento na análise do ensaio de Microarranjo de DNA de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C em relação ao controle. Os genes que não apresentam tal barra não estavam diferencialmente expressos nos ensaios de microarranjo (Vide legenda da figura no Anexo I). O processo de replicação

do DNA precede a divisão celular, ocorrendo durante a fase S do ciclo em eucariotos e envolve o recrutamento de diversas proteínas. O início da replicação do DNA ocorre somente em sítios específicos do DNA cromossômico denominado Complexo de Reconhecimento da Origem (ORC). Nesse processo, a proteína recém-sintetizada CDC6 associa-se temporalmente ao ORC na transição das fases G1-S sendo essencial para a montagem de um complexo de pré-replicação (preRC) na região de origem da replicação. Isto é seguido pelo recrutamento da proteína CDT1 e de proteínas do complexo de manutenção do minicromossomo (MCM) sobre as origens de replicação que conduzem juntamente com CDC6 à formação de preRCs. Em seguida, proteínas CDK da fase S fosforilam as proteínas CDC6/CDC18, inativando essas proteínas e impedindo a re-iniciação da replicação do DNA. O complexo CDC7-DBF4 fosforila a proteína MCM no preRC, recrutando CDC45. Finalmente, as proteínas de replicação, tais como RPA e DNA-polimerases são recrutadas para o complexo, levando a replicação do DNA. Portanto observa-se na Figura 4 que os genes envolvidos na transcrição de DNA foram, em sua grande maioria, identificados em nossos ensaios de microarranjo de DNA e encontraram-se aumentados no grupo de miócitos tratados com Ad-MEF2C quando comparado ao controle.

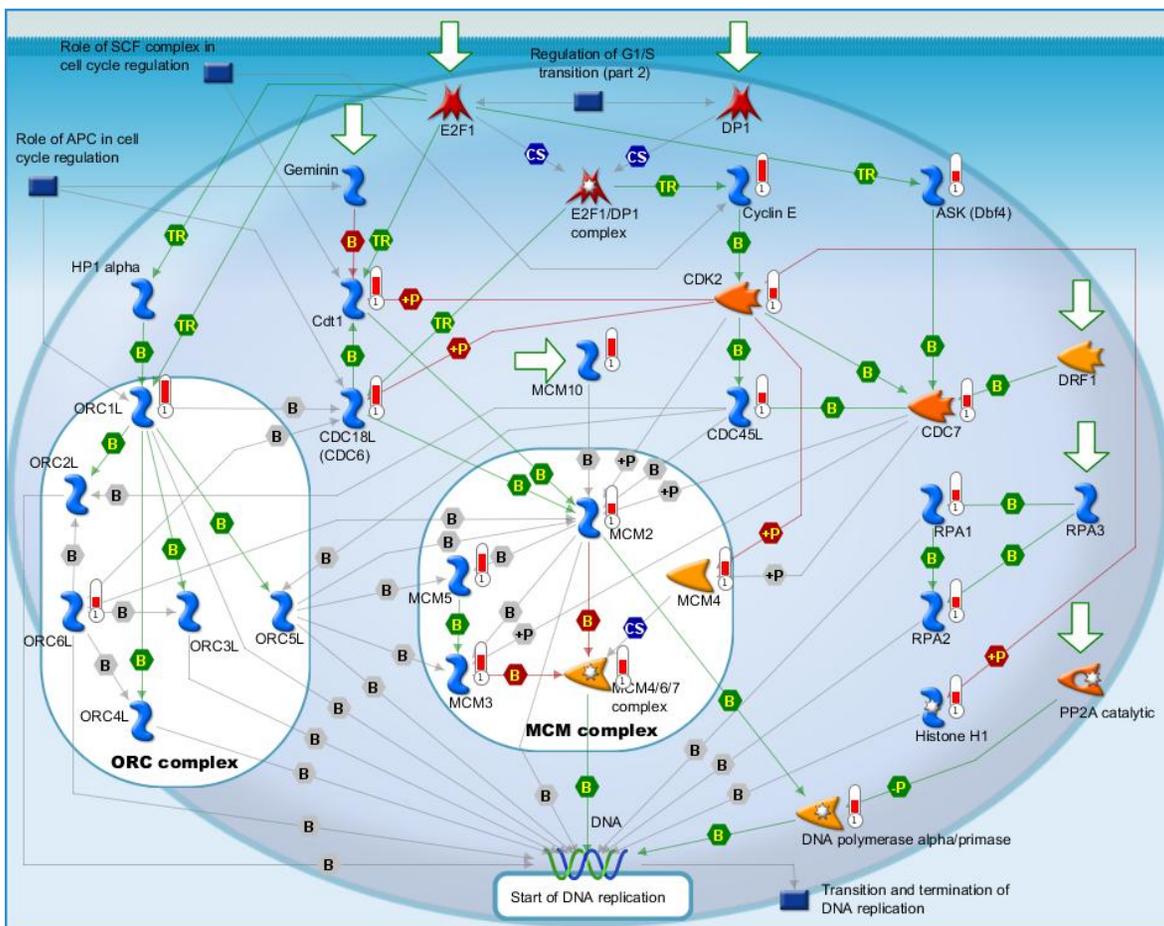


Figura 7: Esquema representativo das etapas e das proteínas envolvidas na replicação do DNA em eucariotos. Os genes diferencialmente aumentados no ensaio de microarranjo apresentam com uma barra em vermelho. (Vide legenda da Figura 4 no Anexo 01).

Os genes diferencialmente expressos no ensaio de microarranjo foram agrupados e submetidos ao programa *Ingenuity* para fazer a classificação das proteínas de acordo com a localização subcelular. Portanto as proteínas foram agrupadas nos seguintes compartimentos: Núcleo, Citoplasma, Membrana Plasmática, Espaço extracelular. Conforme podemos observar na Figura 8, há um grande acúmulo de proteínas do núcleo, que apresentaram aumento na expressão do RNAm (vermelho) com o tratamento com Ad-

MEF2C quando comparado ao controle. Além disso, a grande maioria dos genes que apresentaram diminuição na expressão do RNAm (verde) encontram-se fora do compartimento nuclear. Esses dados demonstram que os genes que estão envolvidos com vias de regulação do ciclo celular estão aumentados e por outro lado, grande quantidade de genes estruturais encontram-se diminuídos.

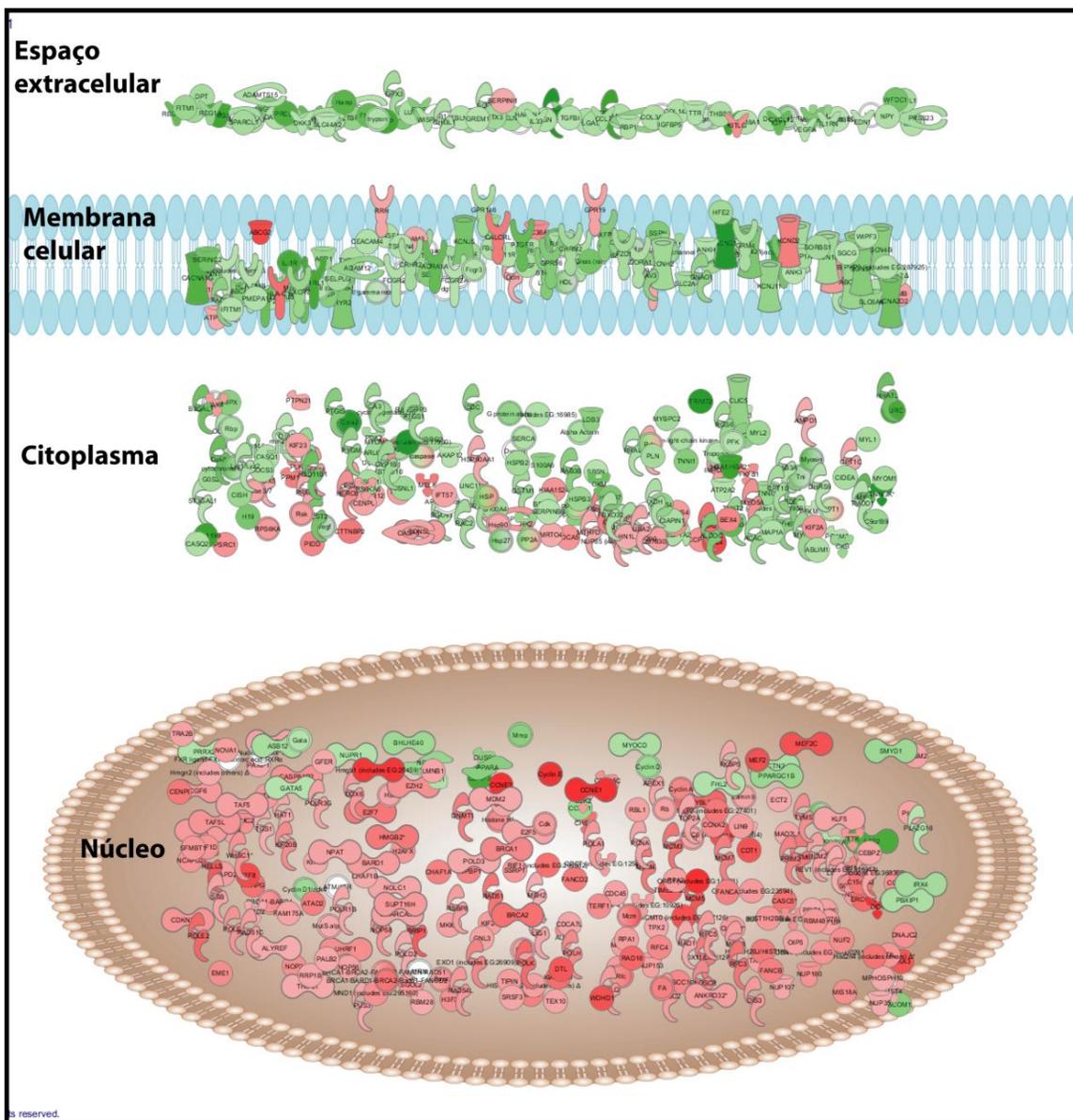


Figura 8: Esquema representativo demonstrando o agrupamento de todos os genes envolvidos nas vias descritas na Tabela 02. Os genes que se apresentaram diferencialmente expressos, por aumento ou diminuição, encontram-se destacados em vermelho ou verde, respectivamente. Os genes estão agrupados de acordo com a localização subcelular das proteínas codificadas por eles.

### 4.3. Validação de genes diferencialmente expressos a partir dos resultados de microarranjo de DNA

De acordo com os resultados do microarranjo de DNA, foram selecionados alguns genes para serem validados quanto ao nível de expressão. A Tabela 2 lista 04 genes envolvidos em processos do ciclo celular que se apresentaram diferencialmente expressos positivamente (*up regulated*) no ensaio de Microarranjo de DNA e foram selecionados para serem validados por PCR em tempo real. Neste experimento de PCR em tempo real para validação do microarranjo utilizamos um controle, Ad-23/24, que é um adenovírus que carrega o gene MEF2C com a mutação nos aminoácidos K23I/K24D (Ad-23/24) e portanto apesar de o tratamento com este vírus causar a superexpressão de MEF2C não demonstra os mesmos efeitos que o Ad-MEF2C selvagem.

Tabela 2 – Lista de genes relacionados a progressão do ciclo celular e valores vezes alterado do RNAm dos genes avaliados nos ensaios de Microarranjo de DNA em células tratadas com Ad-MEF2C comparado a células controle (Ad-βGal)

Gene	Vezes Alterado
<b>MEF2C</b>	+4,22
<b>CDK2</b>	+ 2,41
<b>Ciclina E1</b>	+5,01
<b>Aurora K B</b>	+ 2,70

Portanto, os genes apresentado na Tabela 2 foram validados por ensaios de PCR em tempo real (Figura 9) que confirmaram os resultados observados nos ensaios de microarranjo de DNA. Podemos observar que CDK2, Ciclina E1 e Aurora kB apresentam aumentados nas células tratadas com Ad-MEF2C e não apresentam aumento nas células tratadas com Ad-23/24.

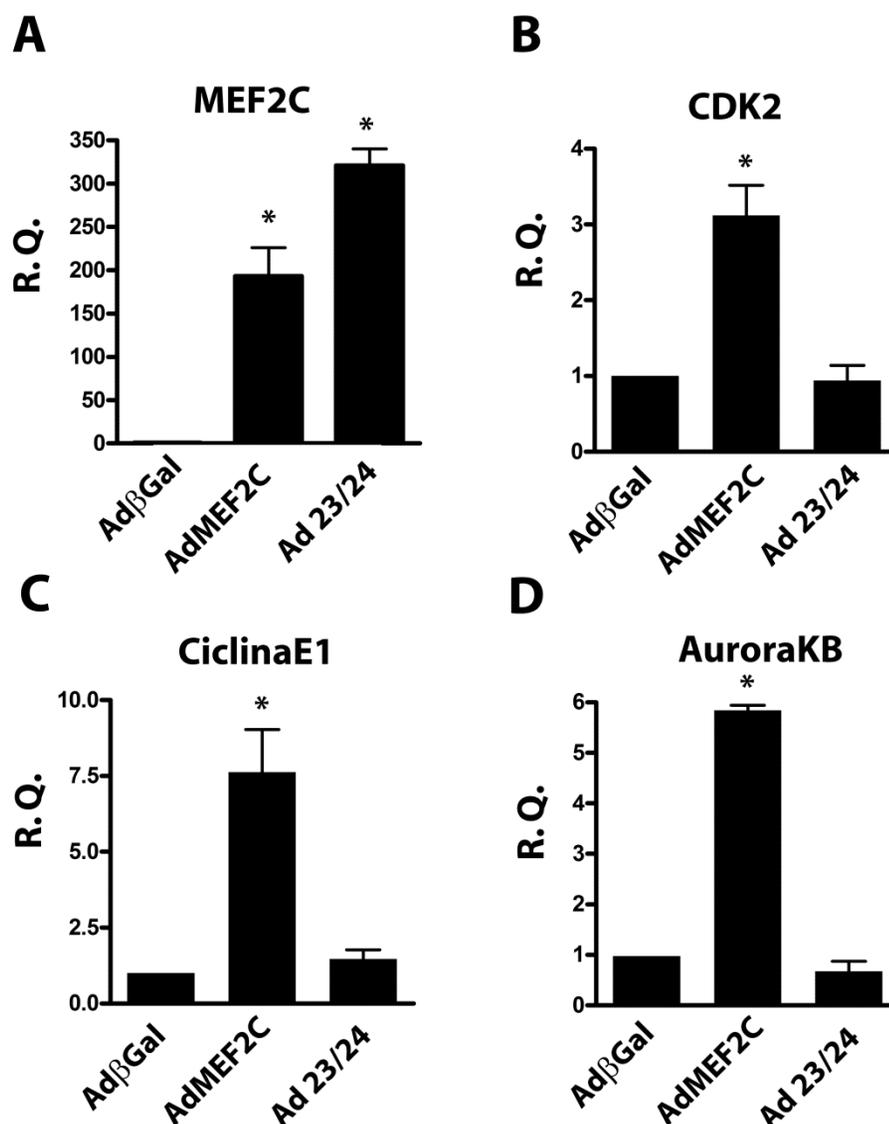


Figura 9: Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm: A) MEF2C; B) CDK2; C) Ciclina E1; D) Aurora kB; em células tratadas com Ad-MEF2C e Ad-23/24 comparado ao grupo de células controle Ad- $\beta$ Gal. \* $p < 0,05$  vs Ad $\beta$ Gal. n=4

A Tabela 3 lista 06 genes envolvidos com a estrutura celular que se apresentaram diferencialmente expressos negativamente (*down regulated*) no ensaio de Microarranjo de DNA e foram selecionados para serem validados por PCR em tempo real.

Tabela 3 – Lista de genes e valores vezes alterado do RNAm dos genes avaliados nos ensaios de Microarranjo de DNA em células tratadas com Ad-MEF2C comparado a células controle (Ad-βGal)

<b>Gene</b>	<b>Vezes Alterado</b>
<b>Desmina</b>	- 2,70
<b>Actinina cardíaca</b>	-2,29
<b>Actina cardíaca</b>	- 1,50
<b>Miomesina 1</b>	- 2,35
<b>Miosina 6</b>	- 3,26
<b>Miosina 7</b>	-1,77

Sendo assim podemos observar na Figura 10 que todos os genes estruturais, Desmina, Actinina, Actina cardíaca, miomesina 1, miosina 6 e miosina 7 se mostraram diminuídos nas células tratadas com Ad-MEF2C quando comparadas as células tratadas com Ad-βGal. Mas uma vez podemos observar que o tratamento com Ad-23/24 apesar de causar a superexpressão de MEF2C não causa a diminuição dos genes estruturais.

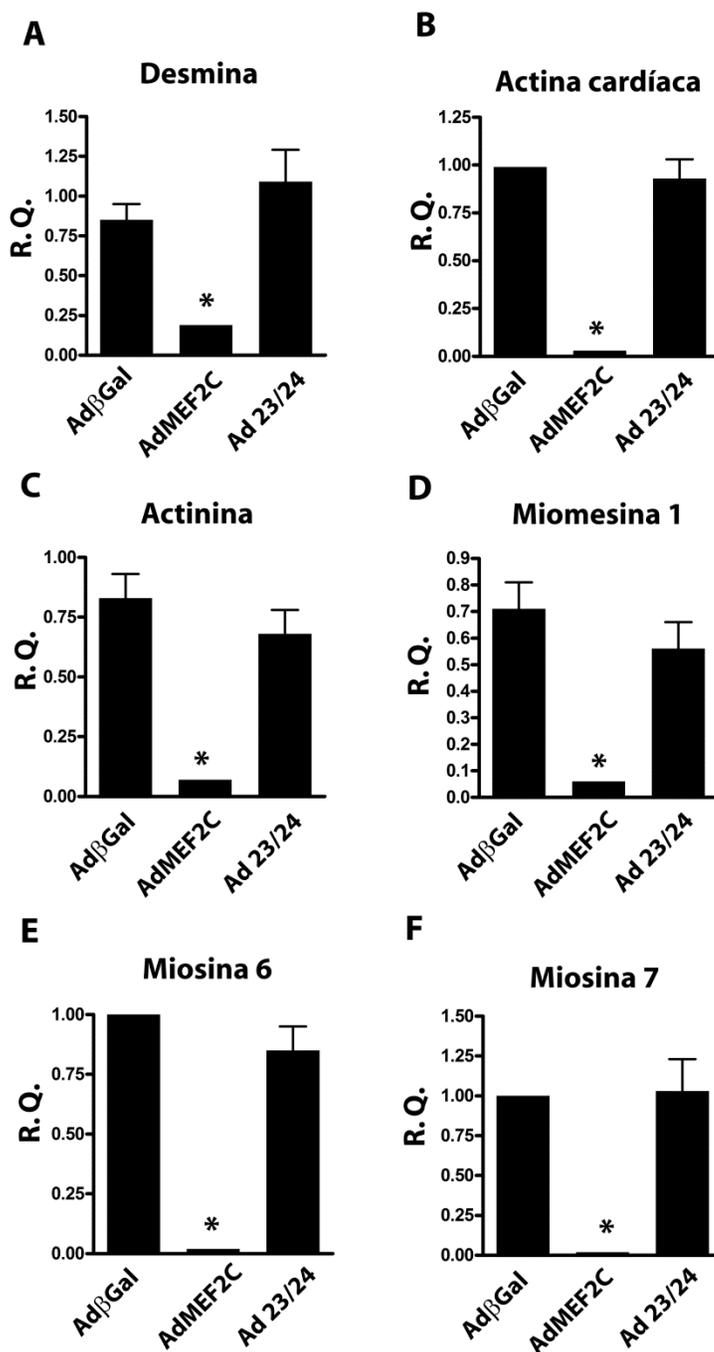


Figura 10: Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm: A) Desmina; B) Actina cardíaca; C) Actinina; D) Miomesina 1; E) Miosina 6; F) Miosina 7 em células tratadas com Ad-MEF2C comparado ao grupo de células controle Ad-βGal e Ad 23/24. \*p<0,05 vs AdβGal. n=4.

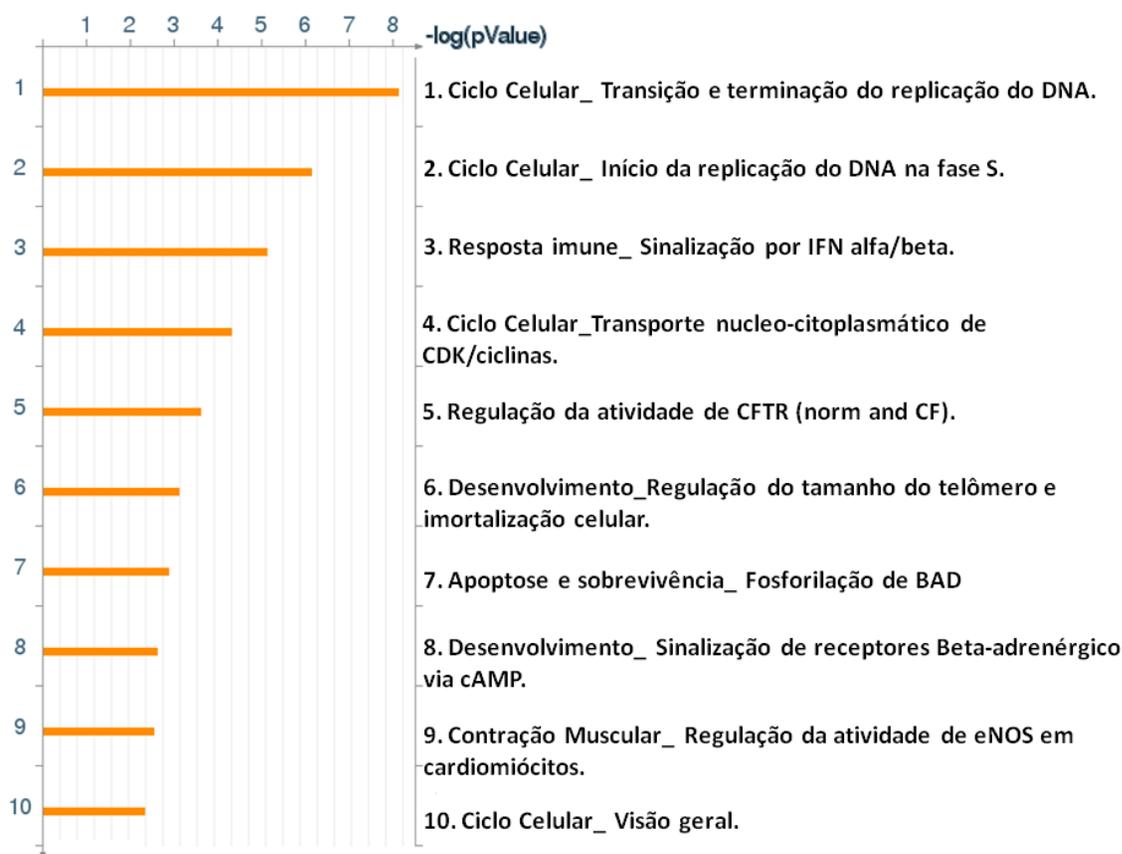
#### **4.4. Análise por proteômica quantitativa da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos.**

As amostras de proteínas de células tratadas com Ad-MEF2C ou com Ad-βGal, como controle foram extraídas em triplicata, submetidas à digestão com tripsina e analisadas, perfazendo um total de 6 amostras, no espectrômetro de massas *Orbitrap<sup>TM</sup>* (Laboratório Nacional de Biociências - LNBio) . Os valores normalizados das médias da triplicata de cada proteína foram submetidos à análise estatística pelo teste *t-student*, sendo que os p-valores extraídos permitiu agrupá-los em ordem crescente de significância. Destas comparações foram selecionadas as proteínas com p-valores menores que 0,05 (ou seja, os representantes com maior relevância estatística,  $p < 0,05$ ). As proteínas do grupo Ad-MEF2C foram comparados com o controle quanto ao nível de expressão baseado no número de espectros atribuídos àquela proteína. Os valores com uma diferença de  $\pm 1,5$  vezes e valor de  $p < 0,05$ , foram submetidos à análise quanto aos seus aspectos funcionais através do programa *Metacore<sup>TM</sup>*.

Assim, a Tabela 4 sumariza os principais processos celulares e as proteínas identificados em cada processo, respectivamente, classificados de acordo com o *score* do programa *Ingenuity*, ao qual é derivado do p-valor de cada proteína e indica a probabilidade das proteínas alvos em uma rede serem encontrados juntos devido ao acaso.

No total, foram identificadas 199 proteínas diferencialmente expressas entre os dois grupos, apresentando uma diferença de  $\pm 1,5$  vezes e valor de  $p < 0,05$ . Dessas, 43 proteínas (aproximadamente 22%) apresentaram diminuição e 156 (~78%) apresentaram aumento na expressão no grupo Ad-MEF2C quando comparado ao controle Ad-βGal.

Tabela 4 – Principais processos celulares envolvidos na superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco, identificados no ensaio de proteômica quantitativo e classificados de acordo com o *Score* do programa *Metacore* e com o número de proteínas identificadas (ID) no processo celular em questão



Dentre as proteínas diferencialmente expressas, distribuídas segundo sua relação funcional, observou-se um grande número de proteínas envolvidas com os processos de Metabolismo de ácidos nucleicos, Replicação, Recombinação e Reparo do DNA. Esses dados confirmam e reforçam os dados de microarranjo de DNA, que relacionam que a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos induz ativação de vias relacionadas à síntese de DNA e progressão do ciclo celular.

As proteínas diferencialmente expressas nas 10 vias citadas na Tabela 4 foram agrupadas e submetidas ao programa *Ingenuity* para fazer a classificação das proteínas de acordo com a localização subcelular. Portanto as proteínas foram agrupadas nos seguintes compartimentos: Núcleo, Citoplasma, Membrana Plasmática e Espaço extracelular (Figura 11).

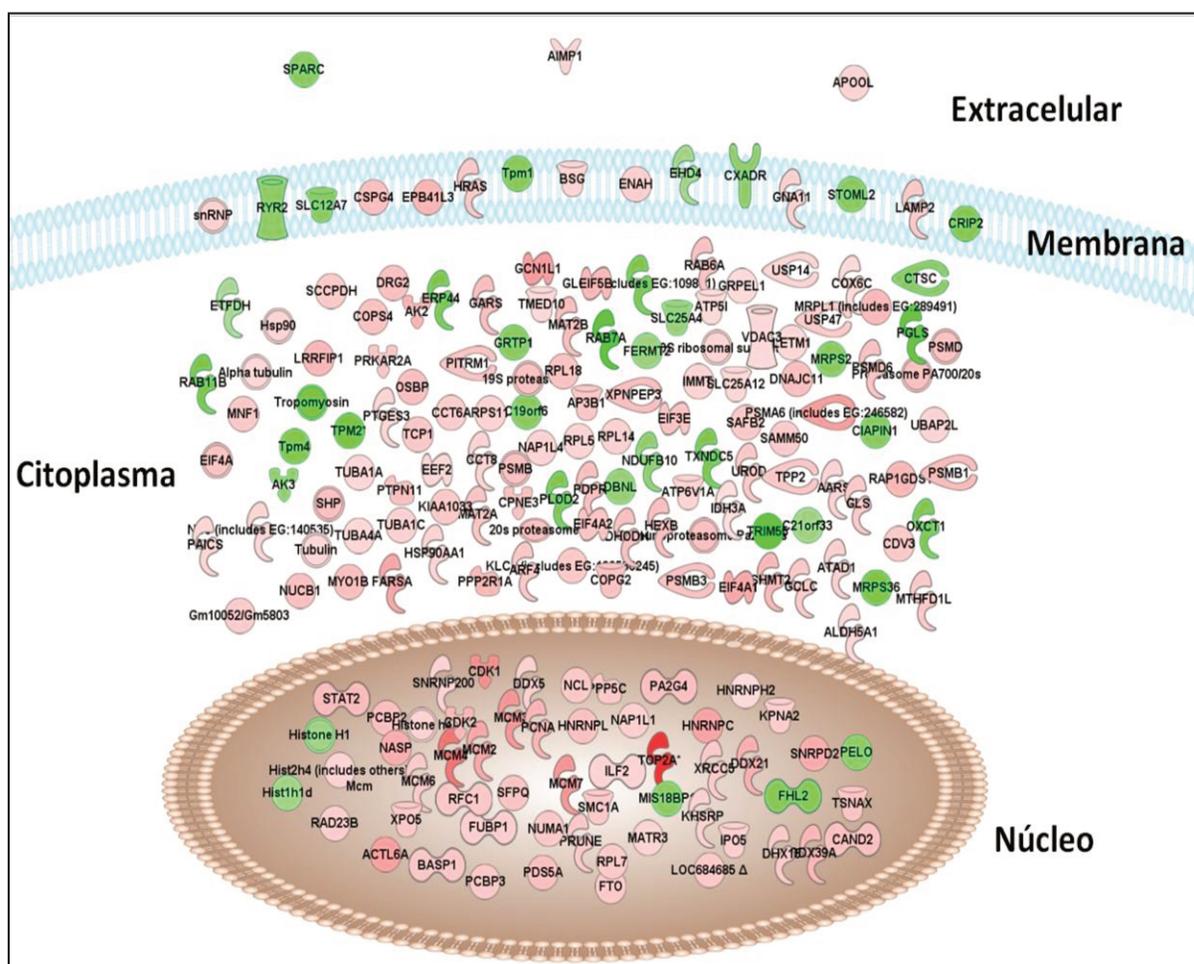


Figura 11: Esquema representativo demonstrando o agrupamento de todas as proteínas descritas na Tabela 06. As proteínas que se apresentaram diferencialmente expressas, por aumento ou diminuição, encontram-se destacadas em vermelho ou verde, respectivamente. As proteínas estão agrupadas de acordo com a sua localização subcelular.

#### **4.5. Validação de proteínas diferencialmente expressas a partir dos resultados de Proteômica.**

De acordo com os resultados do proteoma, foram selecionadas algumas proteínas para serem validadas quanto ao nível de expressão. A Figura 12 demonstra o *western blotting* de seis proteínas selecionadas para validar o ensaio de proteoma. Podemos observar que estão diferencialmente expressos positivamente, MEF2C e ciclina E1. Já os genes envolvidos com estrutura celular, como, Miosina e desmina se encontram com expressões diminuídas em células tratadas com Ad-MEF2C quando comparadas com o tratamento Ad- $\beta$ Gal. As proteínas FAK e Actina não demonstraram alteração no western blotting.

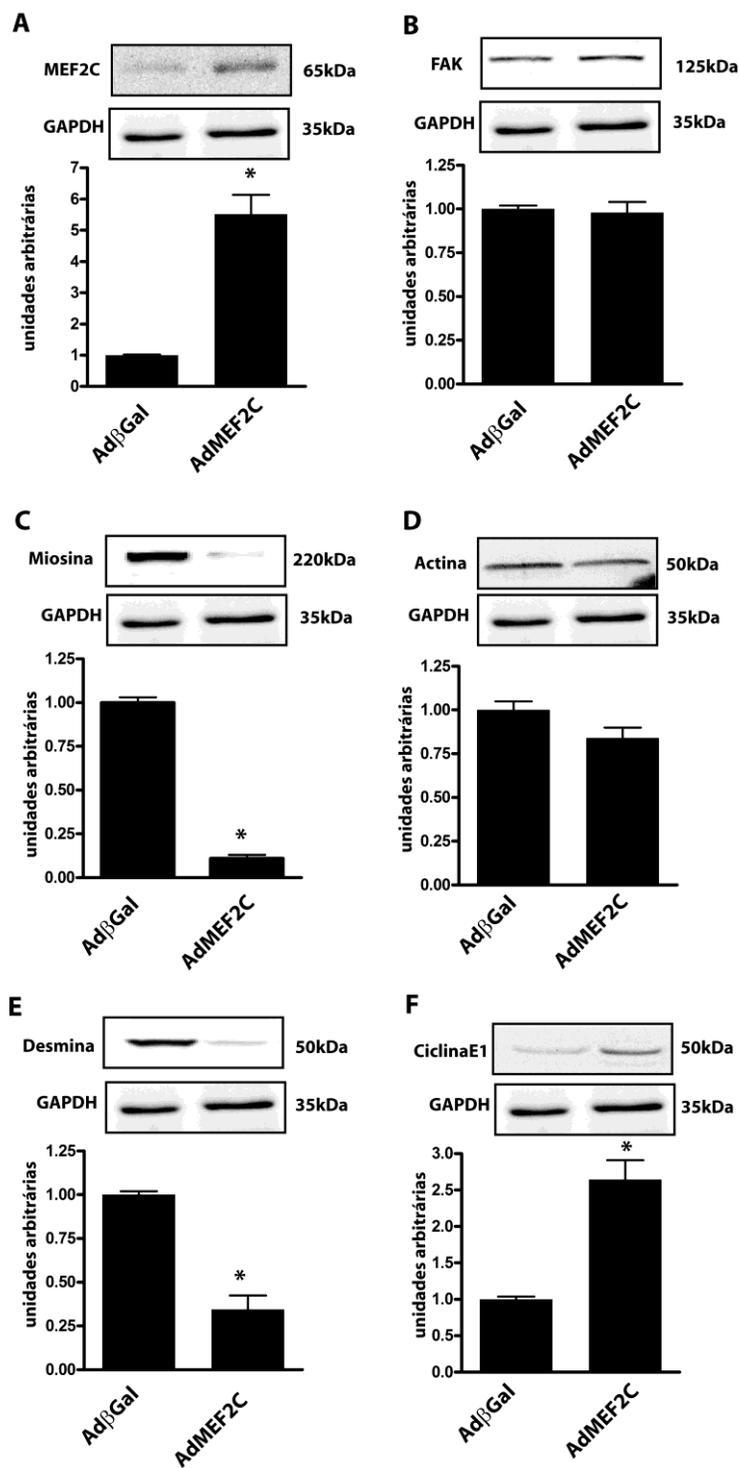


Figura 12: Western blotting e gráficos representativos da expressão de: A) MEF2C; B) FAK; C) Cadeia Pesada de Miosina; D) Actina; E) Desmina; F) Ciclina E1; em células tratadas com Ad-MEF2C comparado ao grupo de células controle Ad-βGal. \*p<0,05 vs AdβGal. n=4.

#### **4.6. Avaliação do fenótipo de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C por meio de microscopia de luz, confocal e eletrônica de transmissão.**

De acordo com os resultados apresentados anteriormente podemos afirmar que o aumento da expressão de MEF2C é efetivo e que através dos genes observados como diferencialmente expressos, pode existir alterações no fenótipo das células tratadas com Ad-MEF2C.

##### **4.6.1 Microscopia de luz (coloração por hematoxilina-eosina)**

Após 48 horas de tratamento com Ad-MEF2C e controle Ad- $\beta$ Gal as células foram fixadas com formaldeído 3,7% e coradas com Hematoxilina (núcleo) e Eosina (citoplasma) H&E. Como resultado, podemos observar e destacar como característica mais marcante das células tratadas com Ad-MEF2C a presença de maior quantidade de células binucleadas ou até multinucleadas (setas brancas) quando comparada às células tratadas com Ad- $\beta$ Gal (Figura 13). Em algumas oportunidades, foi possível observar a presença de núcleos com lobulações atípicas (detalhes da Figura 13\_B). O gráfico na Figura 13\_D compara a porcentagem de células com dois ou mais núcleos entre os grupos Ad-MEF2C e Ad- $\beta$ Gal. Foram contadas um total de 200 células por grupo em triplicata. Esse dado demonstrou que a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos induziu um aumento no número de células multinucleadas (aproximadamente três vezes) quando comparado ao grupo controle.

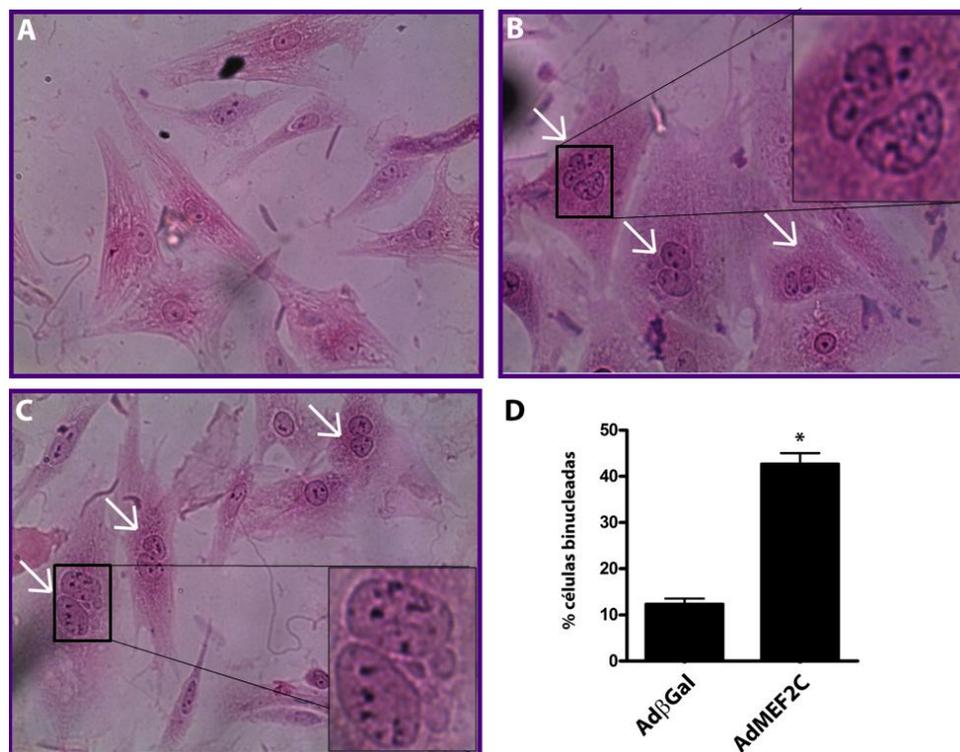


Figura 13: Microscopia de luz representativa de miócitos cardíaco tratados com Ad-βGal (A) ou Ad-MEF2C (B e C) coradas com H&E. Observe em (A) a morfologia típica do núcleo do miócito cardíaco, enquanto que em (B e C) os núcleos apresentam-se multinucleados (seta) e com lobulações atípicas (detalhes). Aumento = 400x. (D) Gráfico representativo da porcentagem de células que apresentam multinucleação entre os grupos Ad-βGal e Ad-MEF2C. \* $p < 0,05$  vs AdβGal.

#### 4.6.2. Microscopia Confocal

Conforme observado na Figura 14, as fibras de actina das células controle (tratadas com Ad- $\beta$ Gal) apresentam um padrão de estriação e organização típicos de miócito cardíaco em cultura. Já o grupo de células tratadas com Ad-MEF2C apresentou desorganização sarcomérica com fibras de actina dispostas de forma irregular e não ordenada.

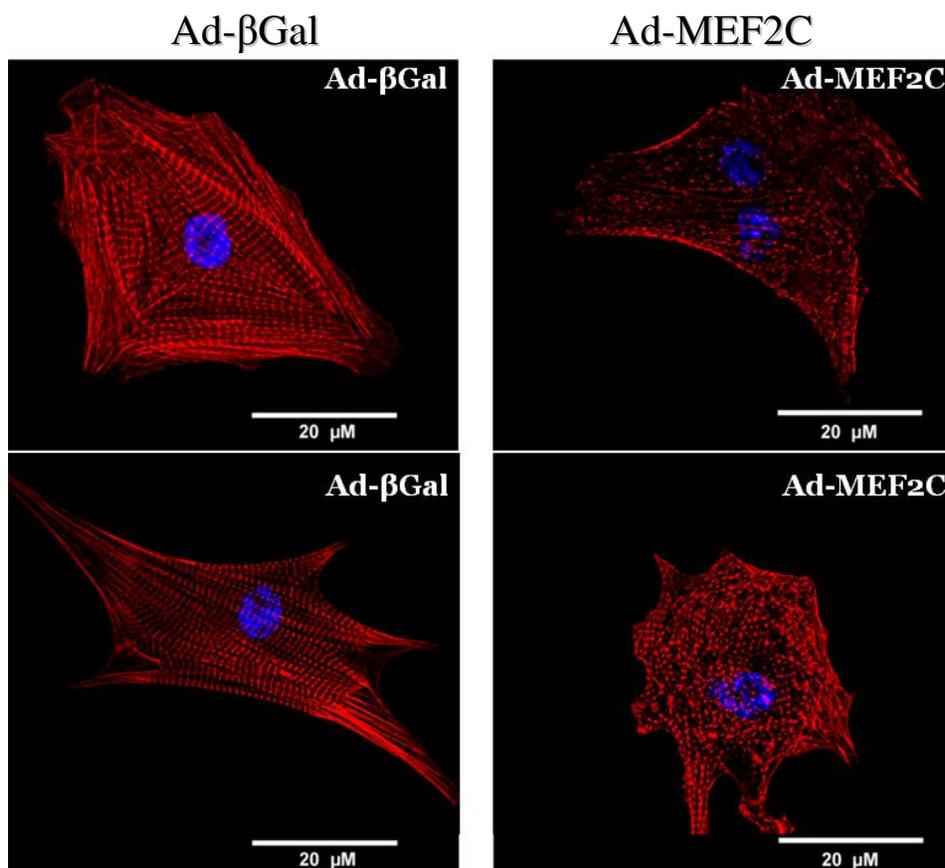


Figura 14: Microscopia confocal representativa de miócitos cardíacos tratado com Ad- $\beta$ Gal ou Ad-MEF2C. Analise as fibras de actina, em vermelho, organizadas e com estriação típica de miócito no grupo controle (Ad- $\beta$ Gal), enquanto que o grupo Ad-MEF2C apresentou redução qualitativa da marcação e desorganização do padrão estriado das fibras de actina no sarcômero. Actina marcada com faloidina-rodamina (vermelha) e núcleo marcado com DAPI (azul).

### **4.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para avaliação ultra-estrutural das diferenças fenotípicas encontradas pela microscopia de luz e confocal no núcleo e na organização sarcomérica, optou-se pela microscopia eletrônica de transmissão de miócitos cardíacos após 48h de transdução viral tratado com Ad-MEF2C ou controle com Ad- $\beta$ Gal.

Na Figura 15 observamos que as células controle Ad- $\beta$ Gal (A e C) apresentaram núcleo preservado, citoplasma íntegro, disposição e padrão sarcomérico típicos, mitocôndrias com aspectos ultra-estruturais preservados e sem estruturas vesiculares associadas. Por outro lado, os miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C (B e D) apresentam regiões de cromatina condensada (seta) no núcleo, já no citoplasma houve aumento no número e no tamanho de vesículas. Ainda neste grupo, destacou-se a degeneração sarcomérica com pequena quantidade de sarcômeros íntegros, presença de vesículas fusionadas às mitocôndrias.

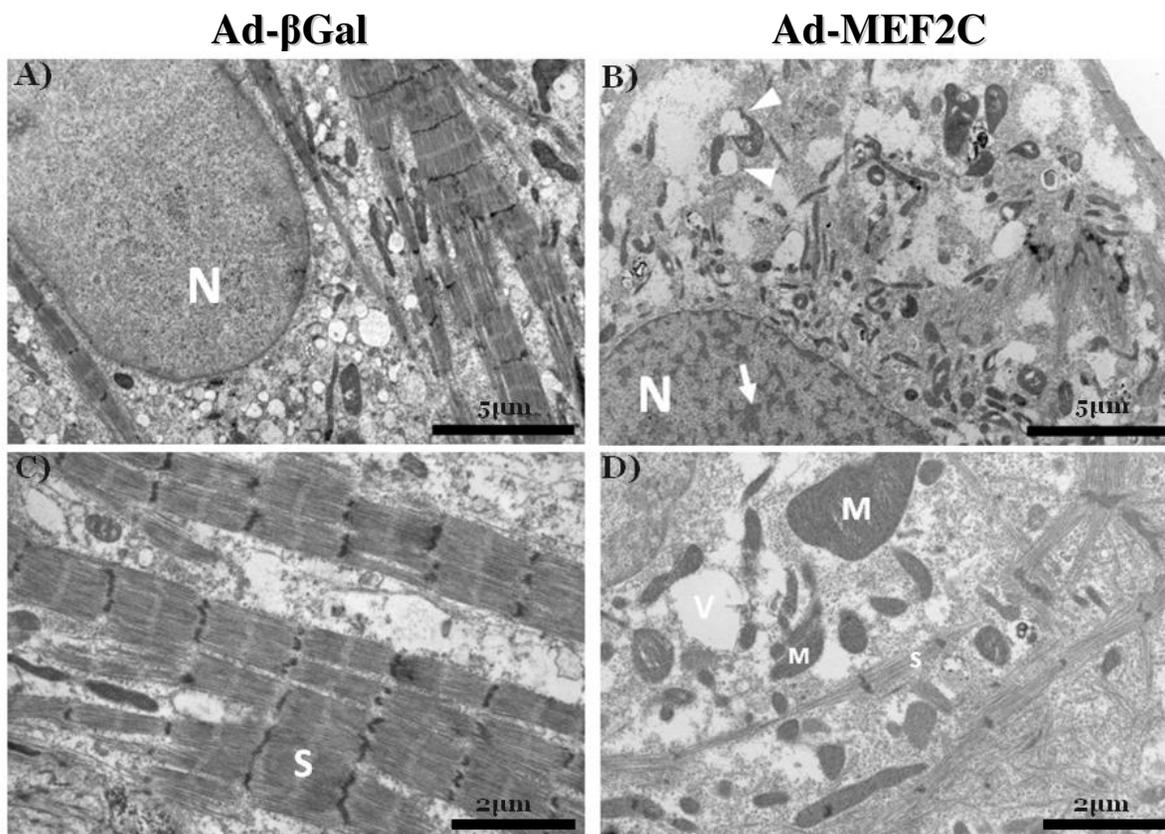


Figura 15: Elétron-micrografias representativas de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad- $\beta$ Gal (A e C) ou Ad-MEF2C (B e D) por 48h. Em A e C, observe a morfologia típica do núcleo (N) e cromatina do miócito, bem como a disposição orientada dos sarcômeros (S) com preservação das bandas A e I, além do disco Z. Já em B e D, analise o núcleo com maior quantidade de cromatina condensada (seta), desorganização e adelgaçamento sarcomérico (\*), presença de vesículas fusionadas às mitocôndrias (cabeça de seta). V = vesícula; M = mitocôndria. Barras A e B = 5 $\mu$ m; C e D = 2 $\mu$ m.

#### **4.7. Avaliação da síntese de DNA de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad-MEF2C**

O conjunto de dados ate o momento demonstra que a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos induz a um aumento de genes relacionados ao ciclo celular e alterações fenotípicas, com um aumento significativo de células com multinucleação. Diante disso fomos investigar, se a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos neonatos induz a um aumento na síntese de DNA. Para utilizamos a técnica de incorporação de iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo.

Miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C apresentaram um aumento significativo de aproximadamente três vezes na síntese de DNA quando comparado aos miócitos cardíacos tratados com Ad- $\beta$ Gal (Figura 16). A superexpressão de MEF2C provocou uma diminuição de células em  $G_0/G_1$  e um concomitante aumento de células na fase S ou na fase  $G_2/M$ . Miócitos cardíacos podem apresentar aumento na síntese de DNA sem ocorrer mitose, levando a um aumento na ploidia. Também pode ocorrer mitose, porém sem ocorrer citocinese, levando a um aumento no número de núcleos por célula. Sendo assim, podemos afirmar somente que o tratamento com Ad-MEF2C em miócitos cardíacos induz um aumento na síntese de DNA, quando comparado às células controle.

Esses dados estão em concordância com os dados de microarranjo de DNA em que observamos que os genes envolvidos na progressão do ciclo celular e envolvidos na síntese de DNA estão aumentados.

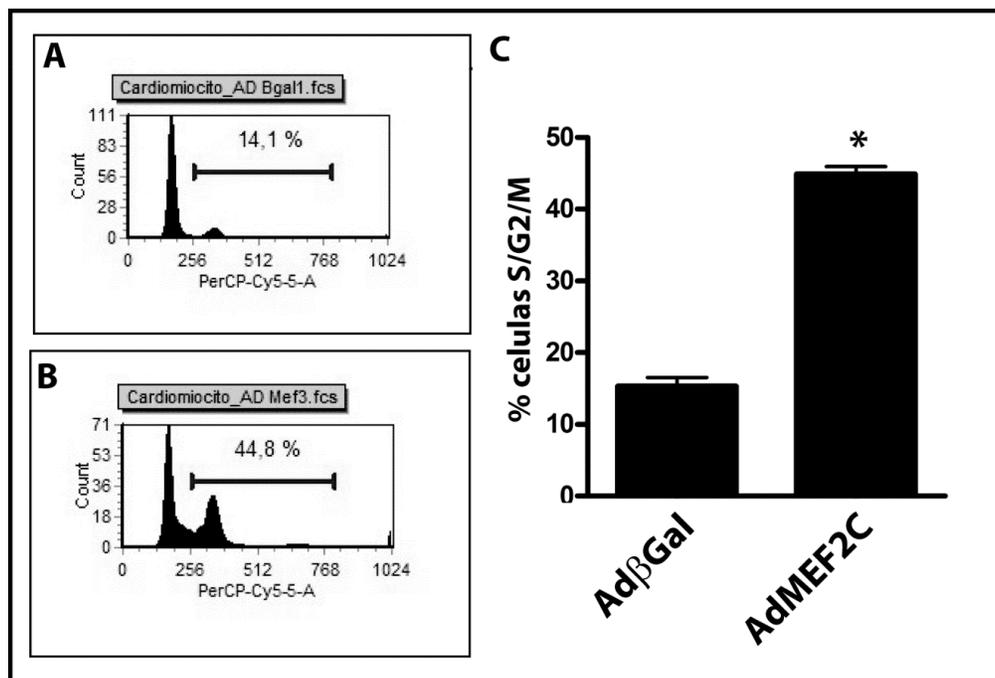


Figura 16: Dados representativos da análise por citometria de fluxo de miócitos cardíacos marcadas com Iodeto de Propídeo. Em A grupo controle Ad- $\beta$ Gal; em B grupo tratado com Ad-MEF2C; C gráfico representativo demonstrando o número de vezes alterado da quantidade de miócitos cardíacos que estão fora da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular e que apresentam, portanto, aumento na síntese de DNA. n= 3. \*p<0,05 vs Ad- $\beta$ Gal.

#### 4.7. Avaliação do nível de expressão de proteínas relacionadas à autofagia em cultura de miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad-MEF2C

Outra alteração fenotípica observada nos miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C foi o aumento na quantidade de vesículas citoplasmáticas e a associação dessas vesículas com mitocôndrias. A natureza das vesículas ainda é desconhecida em nosso estudo. Essas vesículas associadas a mitocôndrias poderiam ser indícios que essa célula apresenta-se em processo de autofagia. No entanto morfológicamente o processo de

autofagia apresenta-se de forma diferente, no qual a organela obsoleta é envolta por membrana, apresentando, portanto duplas ou múltiplas membranas (Clarke, 1990), morfologia não observada em nosso material.

Portanto, para avaliarmos se os miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C apresenta ativação de processos de morte celular por autofagia foi realizado ensaios de *western blotting* para avaliar o nível de expressão de proteínas envolvidas nesses processos. Como resultado, observamos na Figura 17, que as proteínas envolvidas no processo de autofagia, como, Atg12, Becn1, Dram1 e LC3 não apresentaram modificação na expressão proteica. Esses dados demonstram que os miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C não apresentam vias de autofagia ativada. Dessa forma, estudos adicionais deverão ser realizados para avaliarmos a natureza, as causas e as implicações da formação desses vacúolos citoplasmáticos em miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad-MEF2C.

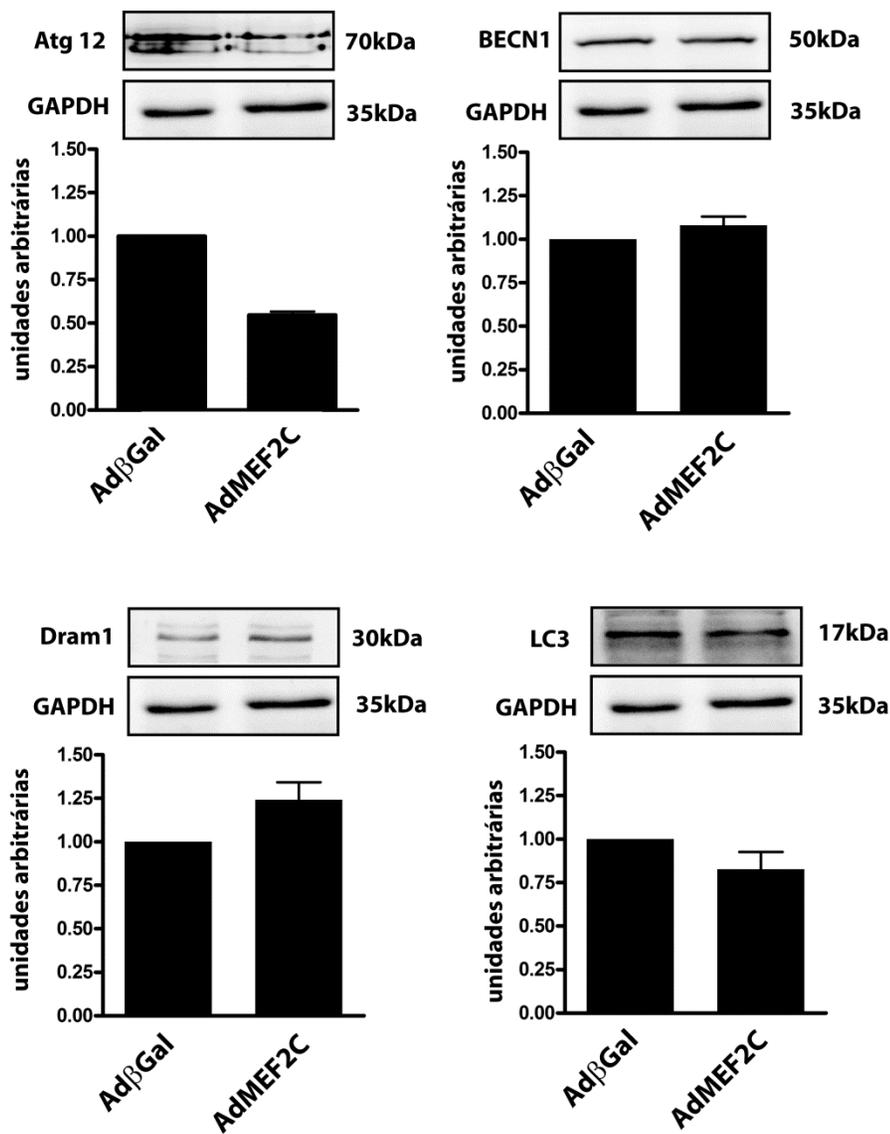


Figura 17: Análise do nível de expressão de proteínas envolvidas em vias autofágicas. *Western blotting* representativo de Atg12, Becn1, Dram1 e LC3 em miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad- $\beta$ Gal ou Ad-MEF2C por 48 horas.

A expressão gênica das proteínas Atg12 e LC3 envolvidas em vias autofágicas foram também avaliadas pela técnica de PCR em tempo real. Da mesma forma, foi demonstrando que não houve diferença na quantificação relativa no nível de expressão de

RNAM de Atg12 e LC3 em miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C comparado ao controle Ad- $\beta$ Gal (Figura 18).

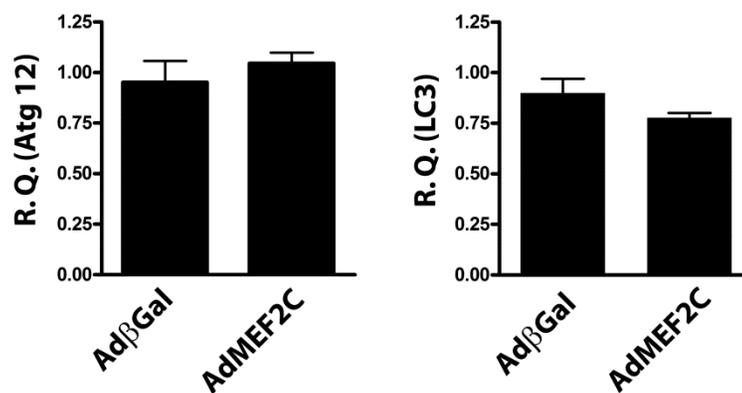


Figura 18: Expressão de RNAm de proteínas envolvidas em vias autofágicas. PCR em tempo real demonstrando a quantificação relativa de Atg12 e LC3 em miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad- $\beta$ Gal ou Ad-MEF2C por 48 horas.

#### **4.8. Análise da expressão de MEF2C e do fenótipo de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdMEF2C**

O conjunto de resultados apresentados anteriormente demonstram as alterações moleculares e fenotípicas da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos. No entanto, sabemos que as células de neonatos, apesar de não apresentarem características de células progenitoras ainda não estão totalmente diferenciadas e podem apresentar, ainda que baixa, capacidade proliferativa preservada. Diante disso, dedicamos esforços para avaliar se as alterações observadas em miócitos de neonatos também ocorriam em miócitos de ratos adultos.

##### **4.8.1. Padronização da cultura de cardiomiócitos de ratos adultos**

Cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos foram isolados conforme descrito em Material e métodos. No primeiro momento de padronização da técnica as células foram acompanhadas sem tratamento por até 12 dias após o isolamento. Neste período não foram observadas mudanças morfológicas nas células que apresentaram o formato típico de cardiomiócito adulto durante todo o tempo observado. Podemos observar na Figura 19 que o rendimento da cultura foi considerado bom e que o formato das células indica que as mesmas estão viáveis para os próximos experimentos.

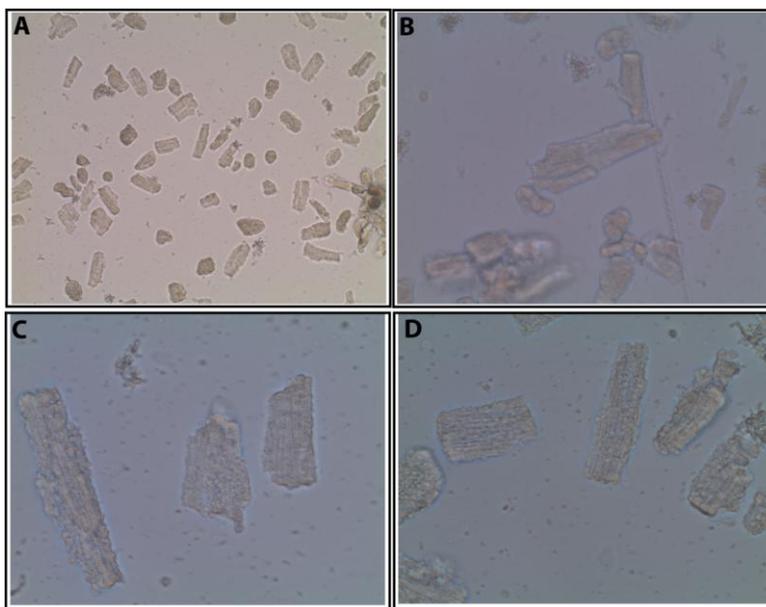


Figura 19: Imagem de microscopia de luz demonstrando cardiomiócitos de ratos adultos a fresco em cultura logo após extração.

#### **4.8.2. Microscopia confocal de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos**

Com o objetivo de observar a morfologia dos cardiomiócitos de ratos adultos após o isolamento obtemos imagens de microscopia confocal das células após 5 dias do isolamento. Podemos observar na Figura 20 que os cardiomiócitos apresentam formato e padrão típico de estriação quando marcados com faloidina

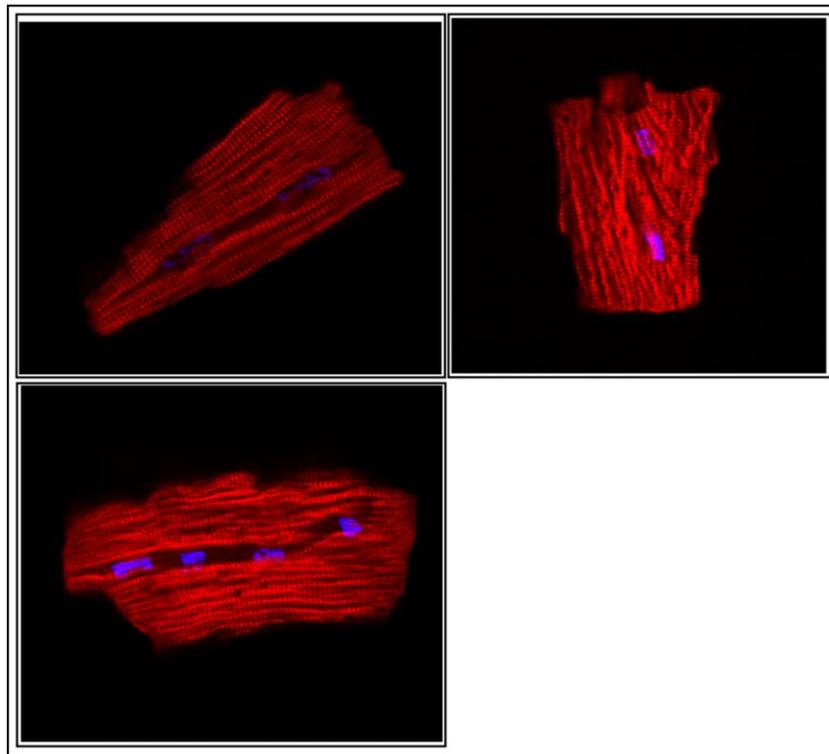


Figura 20: Microscopia confocal de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos após 5 dias de isolamento. Em azul marcação com Dapi (núcleo) e vermelho marcação com faloidina (actina). Aumento de 400X.

#### **4.8.3. PCR em tempo real de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos**

Após a confirmação da padronização da técnica de isolamento de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos passamos para as próximas etapas de análise molecular das células tratadas com Ad-MEF2C. Sendo assim após 3 dias do isolamento e a verificação que as células estavam corretamente aderidas, foram tratadas igualmente com Ad $\beta$ Gal, AdMEF2C e Ad 23/24. Após 48 horas de tratamento as células foram extraídas com Trizol

para o isolamento de RNAm. A partir do RNA das células foi realizado PCR em tempo real de MEF2C para a comprovação da transdução viral. Conforme apresentado na Figura 21 podemos observar que nas células houve a transdução e, por conseguinte a superexpressão de MEF2C, tanto nas células que receberam AdMEF2C quanto as que receberam Ad 23/24.

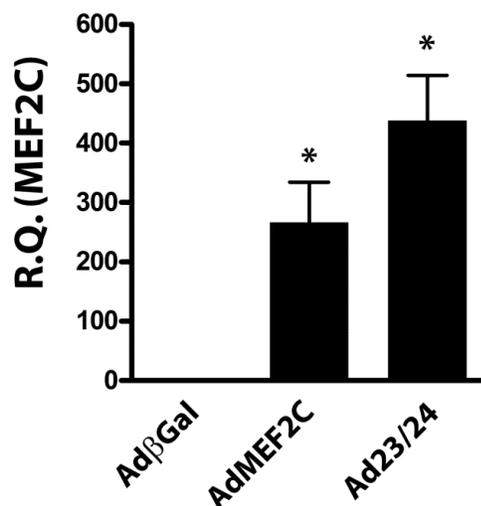


Figura 21: Gráficos representativos da quantificação relativa por meio de PCR em tempo real de MEF2C. Amostras de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos aderentes tratados com AdβGal, AdMEF2C e Ad23/24.

Uma vez verificada a superexpressão de MEF2C na cultura de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos verificamos o nível de expressão de genes relacionados ao ciclo celular e genes relacionados à estrutura celular. Sendo assim podemos observar na Figura 22 que a expressão dos genes relacionados à progressão do ciclo celular (Aurora kB e Ciclina E1), de células tratadas com AdMEF2C estão com níveis aumentados quando comparados as tratadas com AdβGal. Por outro lado, apesar do aumento de expressão de

MEF2C nas células tratadas com Ad23/24 estas células não apresentaram aumento de expressão de genes do ciclo celular.

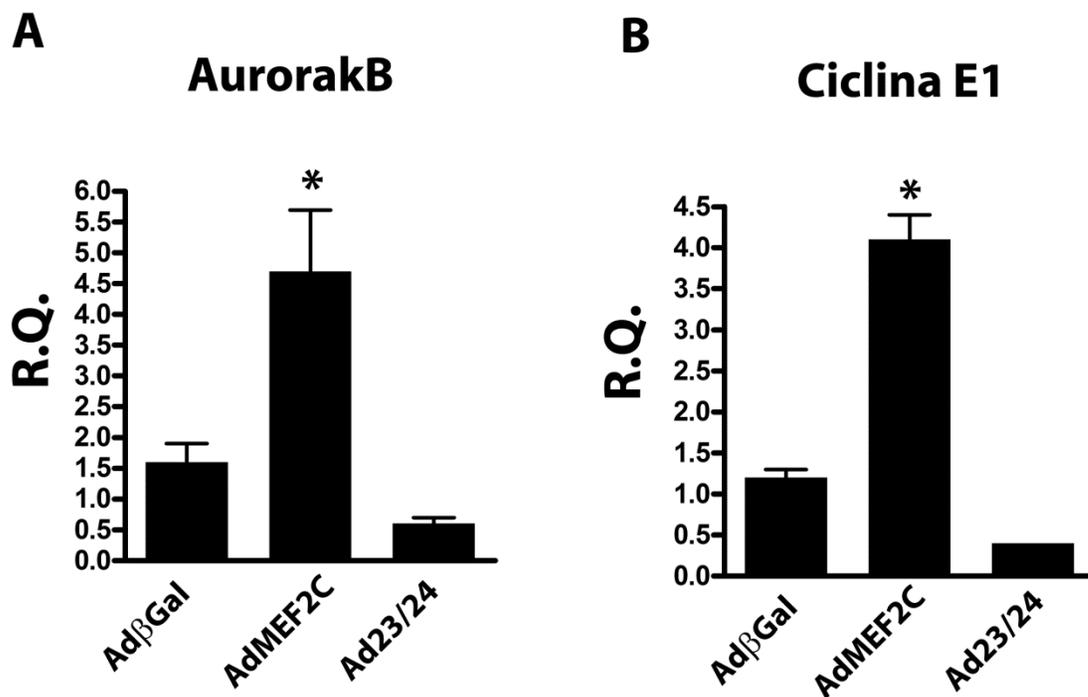


Figura 22: Gráficos representativos da quantificação relativa por meio de PCR em tempo real de genes relacionados ao ciclo celular. Amostras de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdβGal, AdMEF2C e Ad23/24. A) Aurora kB; B) Ciclina E1. \* $p < 0,05$  vs AdβGal.

Da mesma forma que foi observada em cultura de cardiomiócitos neonatos, onde a expressão de genes com envolvimento estrutural se mostravam diminuídos, na cultura de cardiomiócitos adultos estes mesmos genes, desmina, miosina 6, actinina e actina cardíaca se mostraram diminuídos nas células tratadas com AdMEF2C quando comparados ao grupo AdβGal e Ad23/24 (Figura 23).

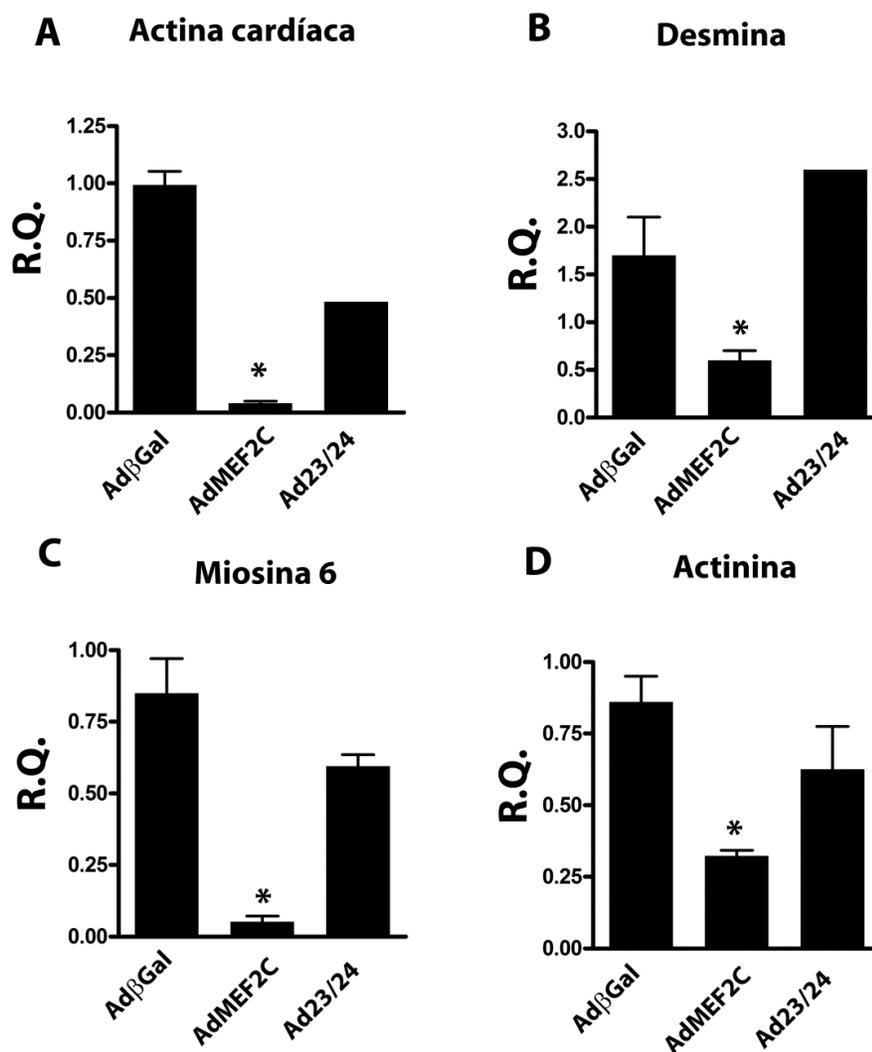


Figura 23: Gráficos representativos da quantificação relativa por meio de PCR em tempo real de genes relacionados a estrutura celular. Amostras de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos tratados com AdβGal, AdMEF2C e Ad23/24. A) Actina cardíaca; B) Desmina; C) Miosina 6; D) Actinina. \* $p < 0,05$  vs AdβGal.

**4.8.4. Microscopia eletrônica de transmissão de cardiomiócitos  
ventriculares de ratos adultos tratados com AdMEF2C.**

Após 3 dias do isolamento as células foram tratadas com Ad $\beta$ Gal ou AdMEF2C onde permaneceram sob tratamento por 48 horas. Na Figura 24 podemos observar que o tratamento com AdMEF2C não altera as estruturas sarcoméricas como o observado em cardiomiócitos de ratos neonatos. A nível ultraestrutural podemos observar que os sarcômeros em ambos os tratamentos (Ad $\beta$ Gal e AdMEF2C) se apresentam intactos e preservados, bem como as outras estruturas celulares, como por exemplo as mitocôndrias. Este achado se deu provavelmente devido ao *turnover* das proteínas sarcoméricas de cardiomiócitos adultos, uma vez que apesar do nível de RNAm de genes estruturais se apresentar diminuído, as alterações fenotípicas como a desestruturação sarcomérica precisar de mais tempo para ser observada.

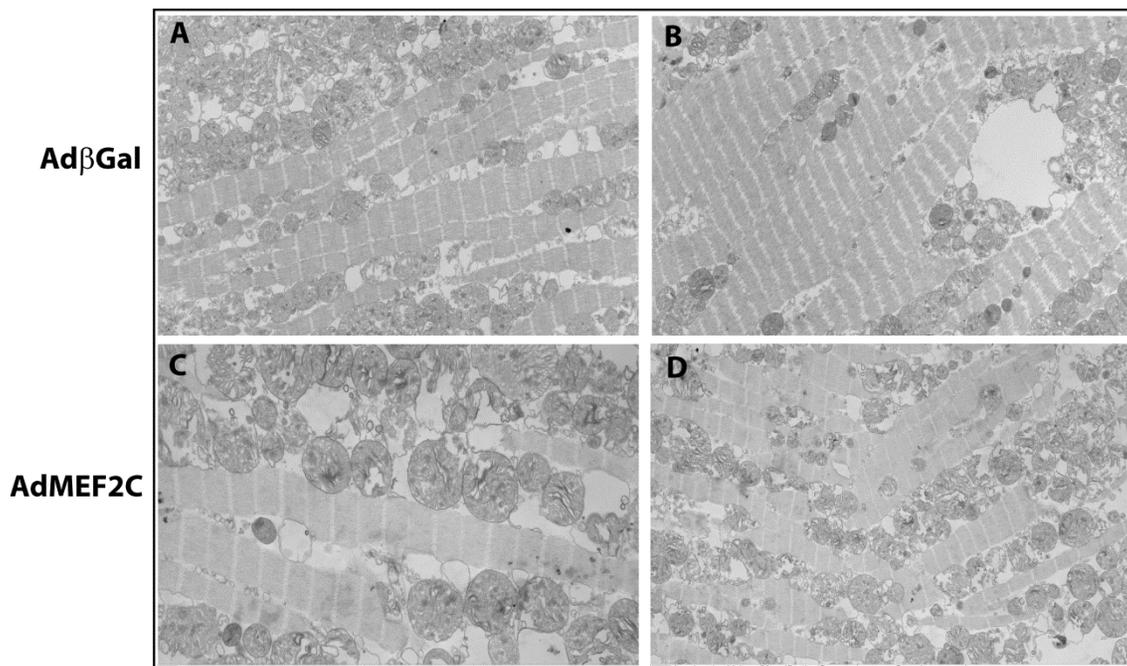


Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos após tratamento com AdβGal (A e B) ou AdMEF2C (C e D).

## **Resultados da avaliação do silenciamento gênico de MEF2C por meio de shRNA em coração de camundongos swiss.**

### **4.9. Utilização do shRNA<sup>MEF2C</sup> em cultura de células**

#### **4.9.1. Clonagem do shRNA<sup>MEF2C</sup> no vetor p-Silencer**

Estudos anteriores do nosso laboratório (PEREIRA et al., 2009) demonstraram que o uso de RNA de interferência sintético produz um silenciamento transiente de MEF2C no coração de camundongos, observado por até 4 dias. Como tentativa de aumentar o tempo de silenciamento e permitir avaliações dos efeitos do silenciamento prolongado de MEF2C optamos pela utilização de shRNA (short harpin RNA) que uma vez integrado ao genoma e expresso constitutivamente, prolongaria o silenciamento gênico de MEF2C.

A primeira etapa cumprida foi a clonagem do shRNA<sup>MEF2C</sup> em plasmídeo pSilencer. Os oligonucleotídeos sense e antisense do gene MEF2C e seu respectivo controle (*scramble*) foram utilizados na obtenção de shRNAs dupla fita para inserção no vetor pSilencer. Em seguida, os insertos shRNAs foram ligados ao vetor pSilencer digerido e purificado. O produto da ligação foi usado para transformar bactérias e três colônias deram origem a produtos de PCR correspondentes ao fragmento U6+shRNA, de aproximadamente 442pb. Como controle utilizamos shRNA<sup>MEF2C</sup> *scramble*. As construções pSilencer+shRNA<sup>MEF2C</sup> e pSilencer+shRNA<sup>MEF2C</sup> *scramble* foram sequenciadas e analisadas por meio de programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) que confirmou a efetividade da clonagem.

#### 4.9.2. Padronização do silenciamento com shRNA<sup>MEF2C</sup> em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos

Uma vez confirmada a clonagem, o próximo passo foi a confirmação do silenciamento em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos usando o shRNA<sup>MEF2C</sup>. Sendo assim, após as células permanecerem em meio de cultura por 48 horas as mesmas foram transfectadas com 20 $\mu$ g de shRNA<sup>MEF2C</sup> e lipofectamina 2000 e foram mantidas em meio sem soro por 48 horas quando foram extraídas para análise do silenciamento por *western blotting* (WB) e PCR em tempo real. Como observado na Figura 25\_A, a transfecção com 20 $\mu$ g de shRNA<sup>MEF2C</sup> diminui a expressão proteica de MEF2C em aproximadamente 80%, enquanto que a quantificação relativa feita através de PCR em tempo real demonstra que ocorre uma diminuição de aproximadamente 75% do nível de expressão de RNAm de MEF2C (Figura 25\_B).

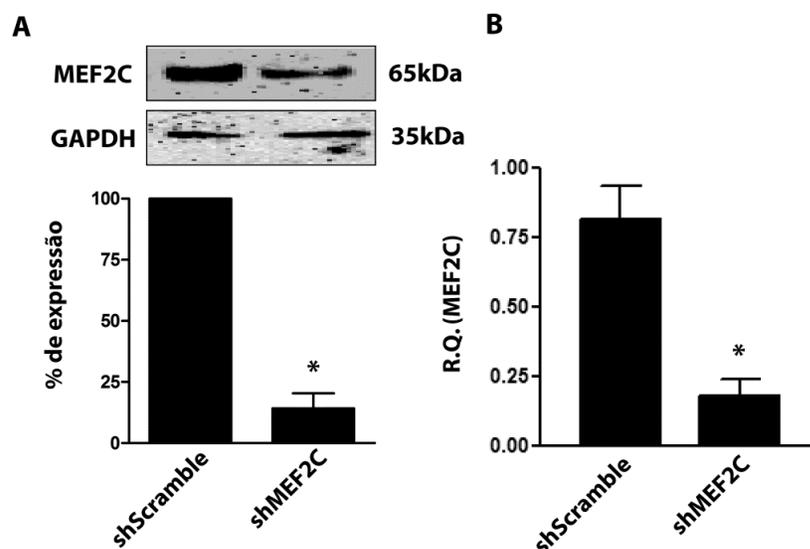


Figura 25: Silenciamento por shRNA-MEF2C em cultura de miócitos cardíacos. A, gráfico representativo e *western blotting* demonstrando a diminuição da quantidade proteica de MEF2C (n=3 culturas). B, gráfico representativo da quantificação relativa por PCR em tempo real do RNAm de MEF2C (n=3 culturas). \* $p < 0,05$  vs shRNA<sup>MEF2C</sup> Scramble.

#### **4.9.3. Subclonagem de shRNA<sup>MEF2C</sup> no vetor lentiviral #304 e produção de partículas lentivirais.**

Como demonstrado anteriormente, o plasmídeo contendo o shRNA<sup>MEF2C</sup> produz silenciamento de MEF2C em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos. Porém a técnica de shRNA traz consigo a dificuldade de se introduzir o plasmídeo na célula animal *in vivo*. Sendo assim, resolvemos utilizar a técnica de transdução por lentivírus. Para tanto subclonamos o promotor U6+shRNA<sup>MEF2C</sup> no vetor lentiviral #304, e a produção lentiviral foi realizada a partir da transfecção em células HEK 293T. A titulação da produção das partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup> (o qual contém o gene da proteína verde fluorescente GFP) foi feita em células NIH3T3. O título médio conseguido foi da ordem de  $10^7$  unidades transducionais por mililitro de sobrenadante viral ( $10^7$  UT/ml). A Figura 26 apresenta o ensaio de citometria de fluxo de células NIH3T3 que receberam quantidades crescentes de sobrenadante viral, 1, 10 e 100  $\mu$ l. Pode-se observar que com a quantidade de 100  $\mu$ l de sobrenadante viral, 99% das células se apresentaram positivas para a expressão da proteína fluorescente GFP, demonstrando a efetividade da técnica de produção e de transdução viral em células NIH3T3.

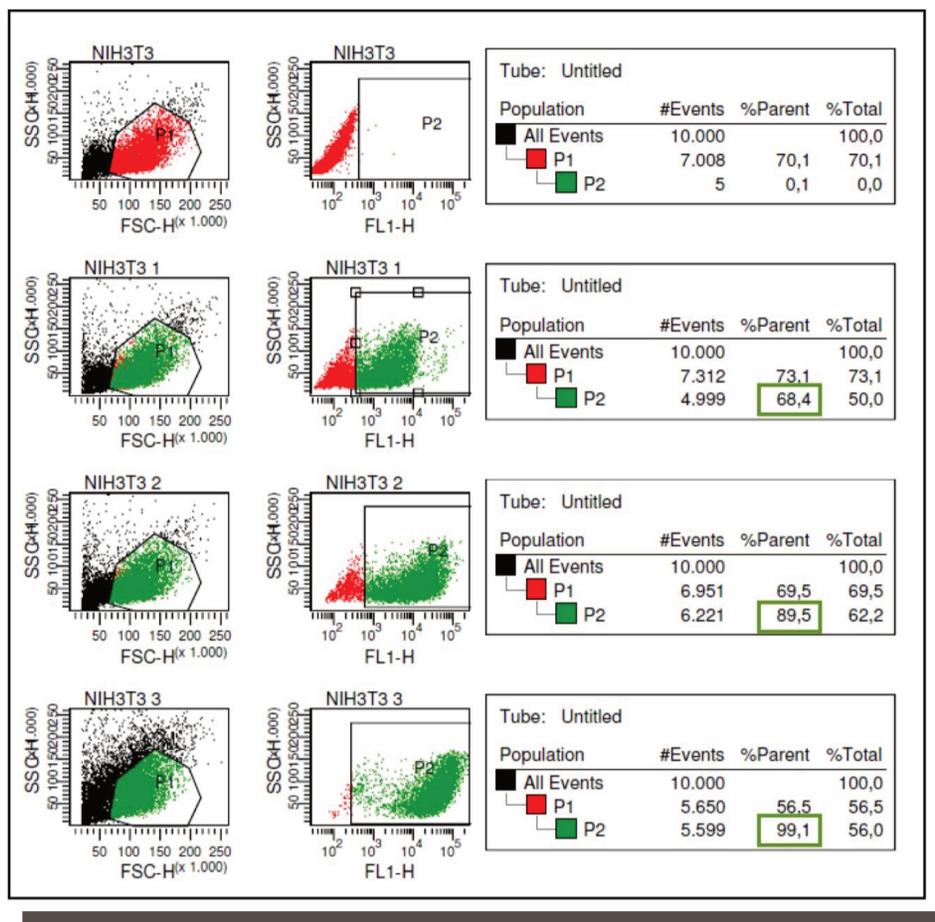


Figura 26: Citometria de fluxo de células NIH3T3. Gráficos representativos de citometria de fluxo de células NIH3T3 transduzidas por partículas lentivirais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup> e a detecção de GFP.

Abaixo podemos observar imagens de microscopia de fluorescência de cultura de células NIH 3T3 que não receberam a partícula lentiviral #304 shRNA<sup>MEF2C</sup> (Figura 27) e portanto não apresentam expressão de GFP, enquanto na Figura 28 as células que receberam a partícula lentiviral #304 shRNA<sup>MEF2C</sup> apresentam marcadamente expressão para a proteína fluorescente GFP.

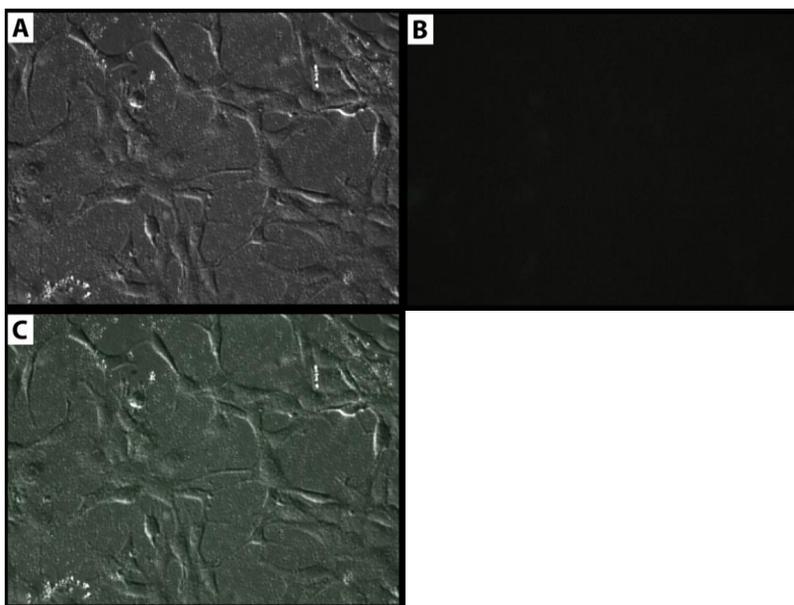


Figura 27: Imagens de microscopia de fluorescência de células NIH 3T3 que não receberam as partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a ausência de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X.

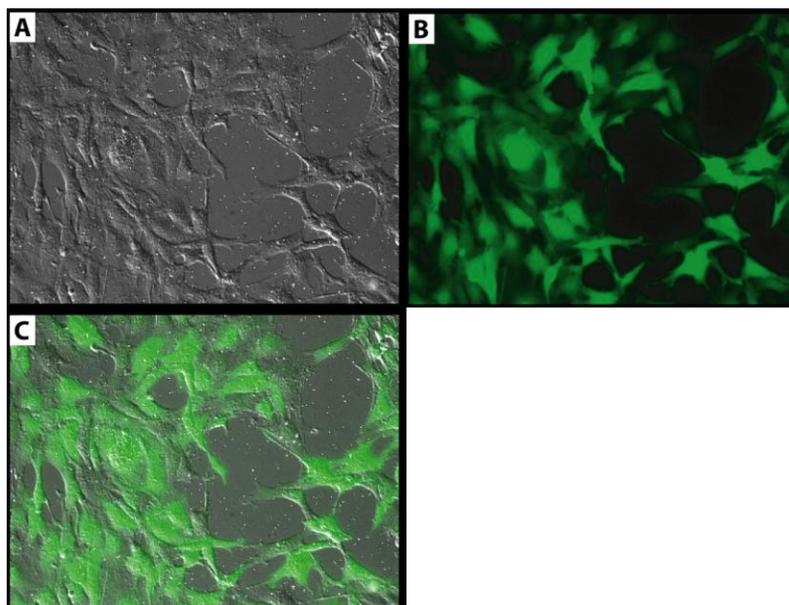


Figura 28: Imagens de microscopia de fluorescência de células NIH 3T3 transduzidas com partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a presença de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X.

#### 4.9.4. Padronização do uso de partículas virais #304 U6+shRNA<sup>MEF2C</sup> em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos

Miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura foram transduzidas com  $2,4 \times 10^5$  partículas lentivirais por 48 horas. Em seguida as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo e para extração de proteínas totais para *western blotting*. A Figura 29 apresenta os dados de citometria de fluxo que demonstra a porcentagem de miócitos cardíacos transduzidos com partículas virais #304 U6+shRNA<sup>MEF2C</sup> expressando a proteína fluorescente GFP. A eficiência da transdução foi de aproximadamente 45%, avaliado pela porcentagem de células positivas para GFP.

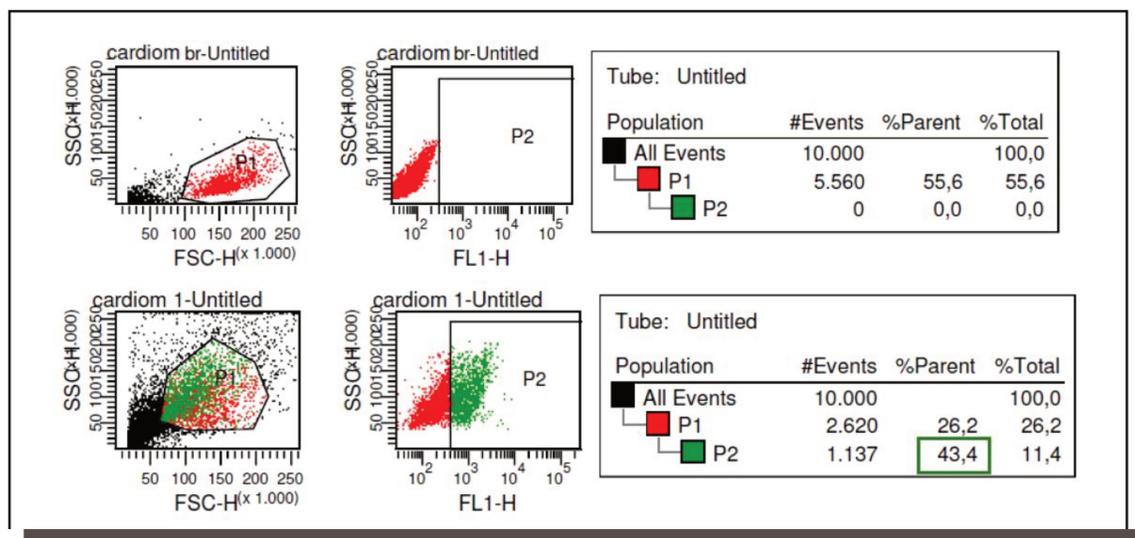


Figura 29: Citometria de fluxo de miócitos cardíacos em cultura. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando cultura de cardiomiócitos primário transduzidos por vetor lentiviral #304 U6 shRNA<sup>MEF2C</sup> e a detecção por GFP.

Como esperado as culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos que não receberam a partícula lentiviral #304 shRNA<sup>MEF2C</sup> (Figura 30) e portanto não apresentam expressão de GFP, enquanto as células que receberam a partícula lentiviral #304 shRNA<sup>MEF2C</sup> (Figura 31) apresentam marcada expressão da proteína fluorescente GFP.

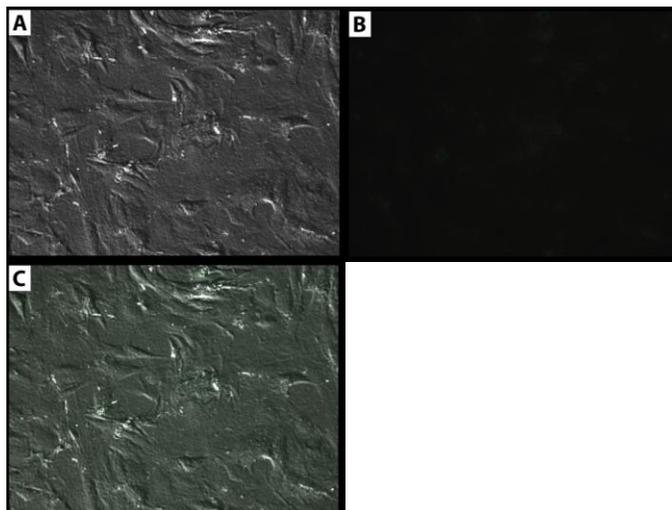


Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência de cultura de cardiomiócitos que não receberam as partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a ausência de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X.

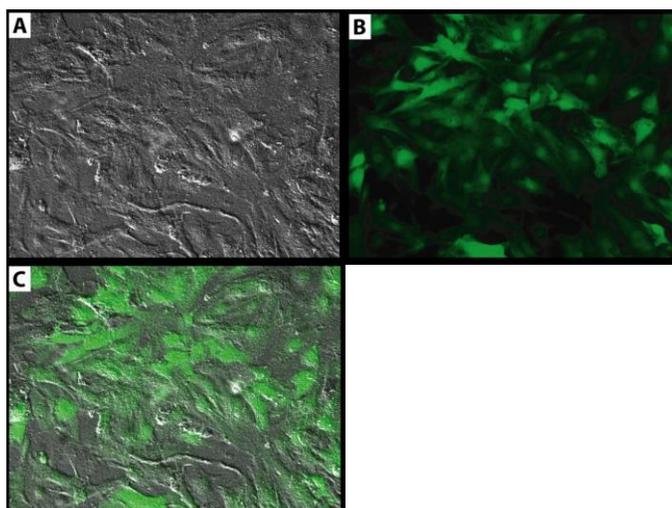


Figura 31: Imagens de microscopia de fluorescência de cultura de cardiomiócitos transduzidos com partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup>. Pode-se observar a presença de células que expressam a proteína fluorescente GFP. Aumento 200X.

Após a avaliação da efetividade da transdução viral por meio da quantificação pela proteína GFP os miócitos cardíacos foram submetidos à extração de proteínas totais para realização de *western blotting* e de RNA para a realização de PCR em tempo real. Foi observado que o tratamento com as partículas viras carregando o shRNA<sup>MEF2C</sup> promove uma diminuição do nível proteico de MEF2C 48 horas após o tratamento, com um silenciamento de aproximadamente 70%, conforme indicado na Figura 32\_A. Já o nível de transcritos de MEF2C avaliado por meio da técnica de PCR em tempo real apresentou uma diminuição de aproximadamente 50% após 48 horas de tratamento (Figura 32\_B). Estes resultados confirmam a eficácia da técnica de transdução por partículas lentivirais o que minimiza os efeitos deletérios provocados pelo uso da lipofectamina em células em cultura. Também demonstramos a efetividade do silenciamento do fator de transcrição MEF2C em miócitos cardíacos em cultura pela utilização do plasmídeo #304 U6+sh<sup>MEF2C</sup>.

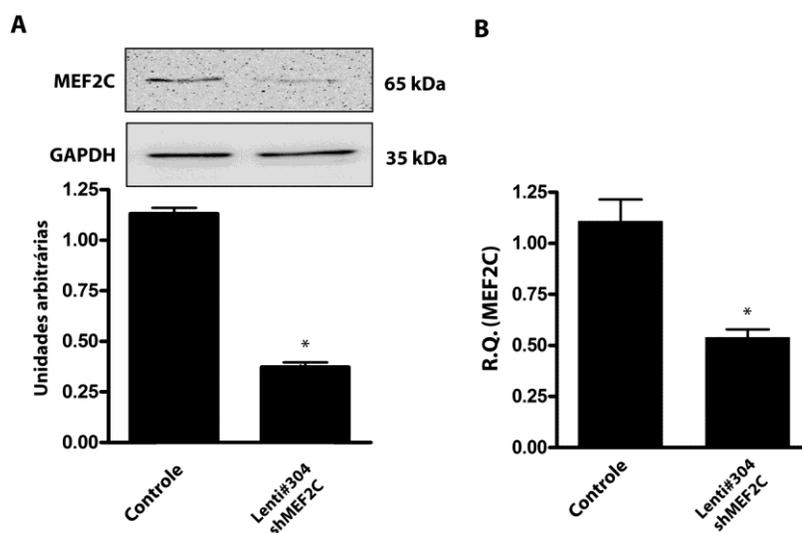


Figura 32: Uso de vetores lentivirais em cultura de cardiomiócitos. Gráficos representativos da quantificação arbitrária do nível proteico (A) e do nível de RNAm (B) de MEF2C em cardiomiócitos transduzidos com vetor lentiviral #304 U6 shRNA<sup>MEF2C</sup>. n = 3. \* p < 0,05 vs controle.

#### **4.10. Uso de partículas virais #304 U6+ shRNA<sup>MEF2C</sup> em camundongos**

Lentivírus possuem a capacidade de se integrar de forma estável no genoma da célula-alvo resultando na expressão persistente do gene de interesse, além de serem eficientes em transduzir células que não estão em divisão, pois são independentes da divisão celular para a conclusão do seu ciclo de replicação. Vetores lentivirais tornaram-se uns dos meios mais utilizados para a pesquisa de genômica funcional e terapia gênica (MÁTRAI et al., 2010).

Trabalhos da literatura têm demonstrado, desde os anos 90, a eficiência da injeção intramuscular de DNA plasmidial na expressão de genes. Vários estudos usando método similar de injeção de lentivírus demonstraram expressão gênica em fígado, pulmão, coração e pele. No entanto as limitações do método são o baixo nível de transdução, que fica restrita ao local de injeção, e procedimentos cirúrgicos para a administração local (LIU et al., 1999). Pela dificuldade em se manter as partículas virais no interior do coração, uma vez que na injeção intravenosa as partículas são ejetadas para fora do coração rapidamente, decidimos pela técnica de injeção direta no músculo cardíaco.

#### **4.10.1. Injeção de lentivírus controle FUGW em corações de camundongos**

Para podermos avaliar a eficiência de transdução do lentivírus por meio da injeção direta no músculo cardíaco, realizamos a injeção de partículas lentivirais controle contendo apenas a sequência da proteína fluorescente GFP (vetor FUGW). Sendo assim, camundongos swiss foram anestesiados, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo para visualização do coração e 50µl de sobrenadante viral ( $10^9$  UT/ml) foram injetados diretamente no músculo cardíaco em diversos pontos do ventrículo esquerdo. Após 4 dias da injeção os animais foram sacrificados e seus corações retirados, fixados e processados para criocortes. Os cortes histológicos foram marcados com faloidina, que marca fibras de actina e DAPI para marcação nuclear. Como observado nas Figuras 33 (aumento de 200 vezes) e 34 (aumento de 400 vezes) verifica-se a presença de fluorescência em diversos pontos do miocárdio, confirmando a efetividade da transdução das partículas virais.

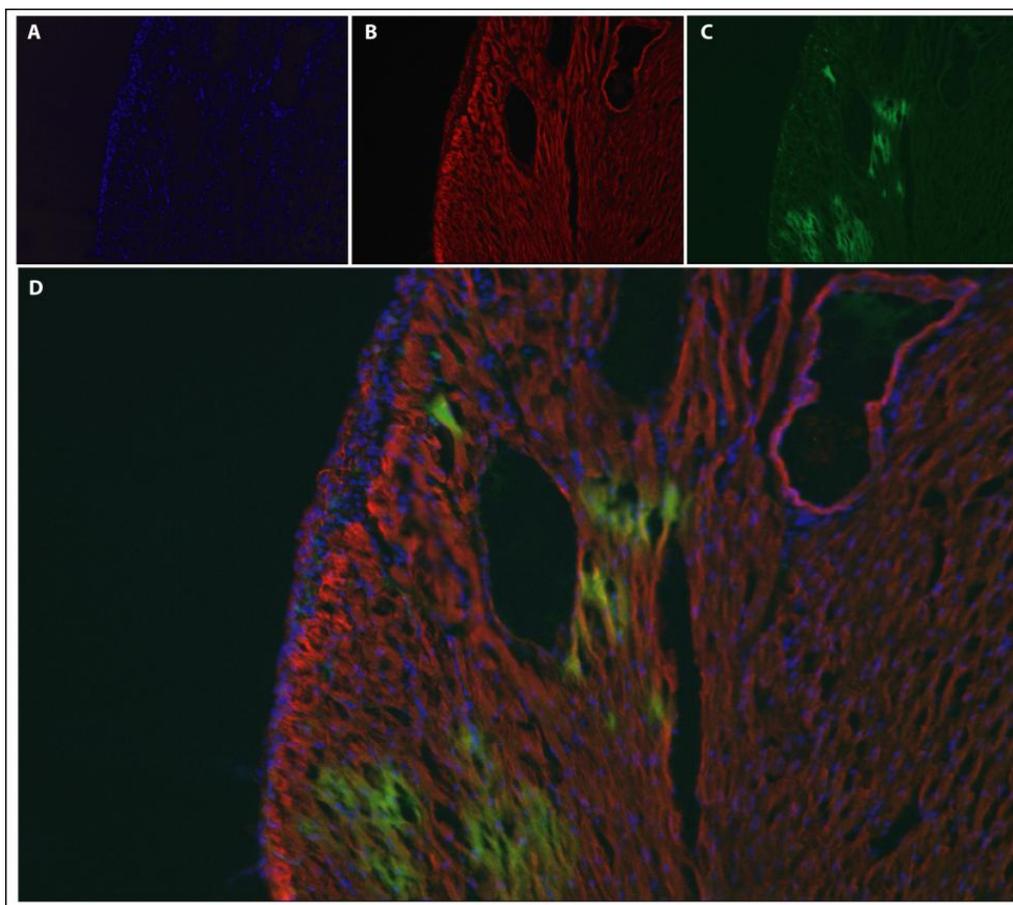


Figura 33: Imagem de microscopia de fluorescência demonstrando a presença da expressão da proteína GFP (verde) no miocárdio de camundongos que receberam injeção de lentivírus controle FUGW. A. marcação em azul (DAPI): núcleos; B. marcação em vermelho (faloidina): fibras de actina; C. marcação em verde: GFP; D. sobreposição das 3 marcações. Aumento 200x

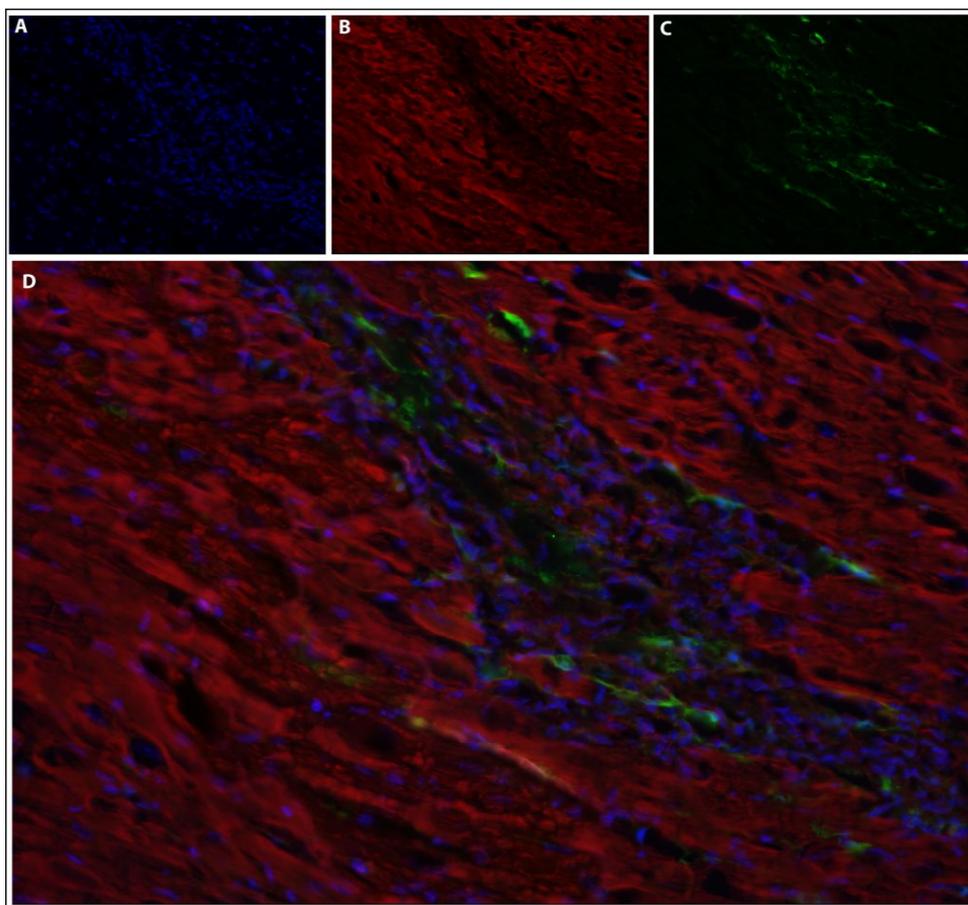


Figura 34: Imagem de microscopia de fluorescência demonstrando a presença da expressão da proteína GFP (verde) no miocárdio de camundongos que receberam injeção de lentivírus controle FUGW. A. marcação em azul (DAPI): núcleos; B. marcação em vermelho (faloidina): fibras de actina; C. marcação em verde: GFP; D. sobreposição das 3 marcações. Aumento 400x.

#### **4.10.2. Avaliação do silenciamento de MEF2C em coração de camundongos**

Verificada a eficiência do silenciamento de cardiomiócitos em cultura e a positividade da expressão da proteína GFP em músculo cardíaco passamos a testar a capacidade das partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup> em transduzir e silenciar cardiomiócitos adultos *in vivo*. Para isso como primeiro teste utilizamos  $10^6$  UT/ml do lentivírus #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup> que foram injetados em diversos pontos do músculo cardíaco enquanto os controles receberam diversas injeções de PBS. Após 7 dias da injeção os animais foram sacrificados, seus corações retirados e processados para extração de proteínas totais e *western blotting*. Pode-se observar que a técnica de injeção em múltiplos sítios do músculo cardíaco confere silenciamento de aproximadamente 40% no nível proteico de MEF2C (Figura 35). Vale ressaltar que a quantidade de partículas virais usadas em nosso experimento foi inferior a utilizada por outros trabalhos da literatura que injetam intramuscular a média de  $10^8$  a  $10^9$  UT/ml (FLEURY et al., 2003), o que poderia explicar o nível de silenciamento. Os próximos experimentos para avaliação funcional foram realizados com injeções mais concentradas de partículas virais #304 U6shRNA<sup>MEF2C</sup> na ordem de  $10^8$  UT/ml.

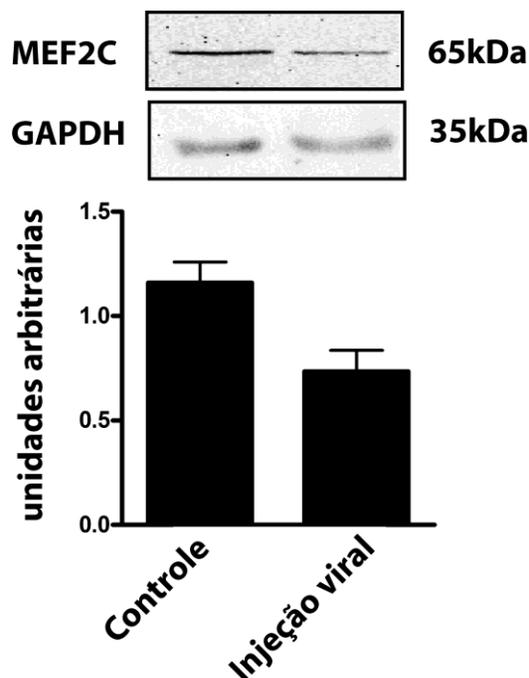


Figura 35: Uso de vetores lentivirais em camundongos swiss. Gráfico representativo da quantificação arbitrária do nível proteico de MEF2C em coração de camundongos que receberam injeção de vetores lentivirais #304 U6 shRNA<sup>MEF2C</sup> e seus controles que receberam somente o veículo PBS.

Uma vez verificada a eficiência de infecção pelas partículas lentivirais, realizamos a injeção de 50 $\mu$ l de lentivírus #304 shMEF2C ( $10^8$  TU/ml) diretamente na parede do ventrículo esquerdo e após 24 horas os animais foram submetidos a uma sobrecarga pressórica por meio da coarctação da aorta. Estes animais, juntamente com seus respectivos controles foram acompanhados por 15 dias, quando foram realizados os exames ecocardiográficos, hemodinâmicos e o sacrifício para a extração do coração para avaliação gravimétrica.

#### **4.10.3. Avaliação ecocardiográfica de animais com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C e coarctados por 15 dias.**

Transcorridos os 15 dias experimentais os animais foram anestesiados e submetidos a ecocardiografia para avaliação dos diâmetros diastólico, sistólico e espessura da parede ventricular, bem como da função cardíaca. Conforme demonstrado na Tabela 5 e Figura 34 podemos observar que a coarctação da aorta por 15 dias não produz efeitos importantes nos diâmetros diastólicos e sistólicos uma vez que com este tempo o animal ainda apresenta uma hipertrofia compensatória. Porém conforme o esperado, a espessura da parede posterior apresenta-se significativamente aumentada no grupo coarctado PBS sendo que este aumento é atenuado pela presença da injeção de lentivírus #304 shMEF2C, demonstrando assim uma diminuição da hipertrofia nestes ventrículos esquerdos. A função cardíaca avaliada pela fração de encurtamento se apresenta preservada e sem alterações nos quatro grupos avaliados (Figura 36). Podemos assim demonstrar o efeito anti-hipertrófico do silenciamento do fator de transcrição MEF2C por meio do lentivírus #304 shMEF2C.

Tabela 5. Análise ecocardiográfica dos animais com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C e coarctados por 15 dias.

<b>Ecocardiografia</b>				
	<b>Sham</b>		<b>CoAo</b>	
	<b>PBS</b>	<b>Lenti shMEF2C</b>	<b>PBS</b>	<b>Lenti shMEF2C</b>
<b>N</b>	5	8	5	5
<b>DDVE (mm)</b>	38,5±0,7	40,4±0,8	38,42	38,2±1,4
<b>DSVE (mm)</b>	22,8±1,4	24,2±0,4	21,5±2,3	19,1±1,2
<b>EPPVE (mm)</b>	5,3±0,1	5,4±0,04	7,8±0,16*	6,8±0,09 <sup>#</sup>
<b>FS (%)</b>	40,7±2,9	40,2±0,4	44,8±4	50±2,0

N, número de animais utilizados; *Sham* (*sham operated*); CoAo, coarctação da aorta por 15 dias; N, número de animais; DDVE, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, EPPVE, parede posterior do ventrículo esquerdo; FS, fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. Teste ANOVA e Bonferroni's multiple-range. \* $p < 0.05$  vs Sham PBS; #  $p < 0.05$  vs CoAo PBS.

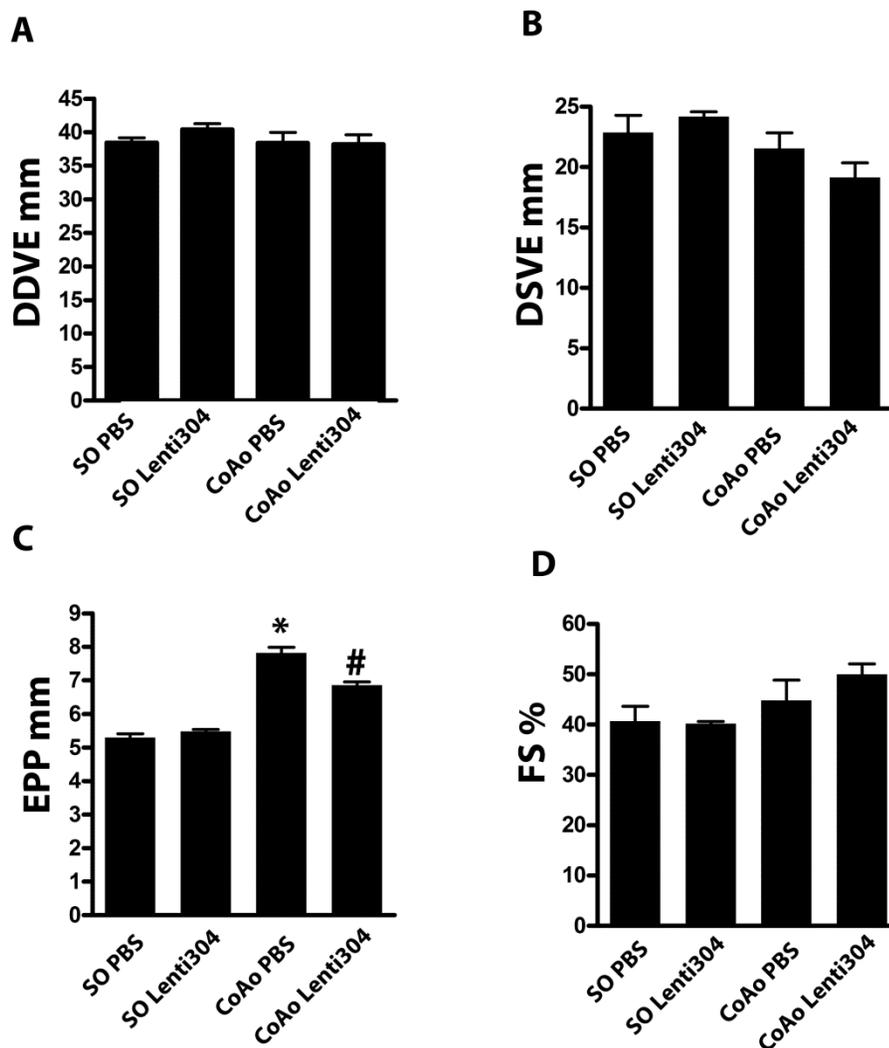


Figura 36: Avaliação ecocardiográfica dos animais com injeção de Lenti#304 shMEF2C. A. Gráfico demonstrando diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. B. Gráfico demonstrando diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo C. Gráfico demonstrando espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo. D. Gráfico demonstrando a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. SO, *sham operated*; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta. DDVE, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; FS fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. \* $p < 0,05$  vs SO PBS; #  $p < 0,05$  vs CoAo PBS.

#### **4.10.4. Avaliação hemodinâmica de animais coarctados por 15 dias e com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C**

Após 15 dias de coarctação da aorta os animais tiveram sua carótida e sua femoral canuladas para aferição da pressão arterial. A Tabela 6 e Figura 37 demonstram os resultados das pressões diastólica e sistólica dos grupos de animais coarctados e *sham operated* (SO) que receberam ou não a injeção de lentivírus #304 shMEF2C. Podemos observar que entre os grupos SO não houve diferenças significativas das pressões bem como entre os grupos coarctados (CoAo). A coarctação da aorta produz um aumento significativo na pressão sistólica da carótida em relação aos grupos SO, esta diferença entre as pressões sistólicas na carótida e na femoral é o chamado gradiente de pressão. Destaca-se que o gradiente de pressão entre a carótida e a femoral no grupo coarctado é de aproximadamente 85mmHg, sendo que não há diferenças de gradiente entre o grupo coarctado PBS e coarctado Lenti304 shMEF2C demonstrando que a coarctação da aorta é igualmente eficiente nos dois grupos. Os grupos SO não apresentam pressões aferidas na artéria femoral uma vez que não há diferenças entre a carótida e a femoral, não apresentando, portanto gradiente de pressão.

Tabela 6. Análise hemodinâmica dos animais com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C e coarctados por 15 dias.

<b>Hemodinâmica</b>				
	<i>Sham</i>		<i>CoAo</i>	
	<b>PBS</b>	<b>Lenti shMEF2C</b>	<b>PBS</b>	<b>Lenti shMEF2C</b>
<b>N</b>	5	8	5	5
<b>PASC (mmHg)</b>	109,9±2,2	123±9	182±12*	180±9*
<b>PADC (mmHg)</b>	80±2,6	86±9	77±10	103±7
<b>PAMC (mmHg)</b>	93±2	109±8	113±11*	131±6*
<b>PASF(mmHg)</b>	-	-	97±11	98±11
<b>PASF (mmHg)</b>	-	-	78±10	77±7
<b>PAMF (mmHg)</b>	-	-	87±11*	86±11*
<b>Gradiente (mmHg)</b>	-	-	85±5*	83±6*

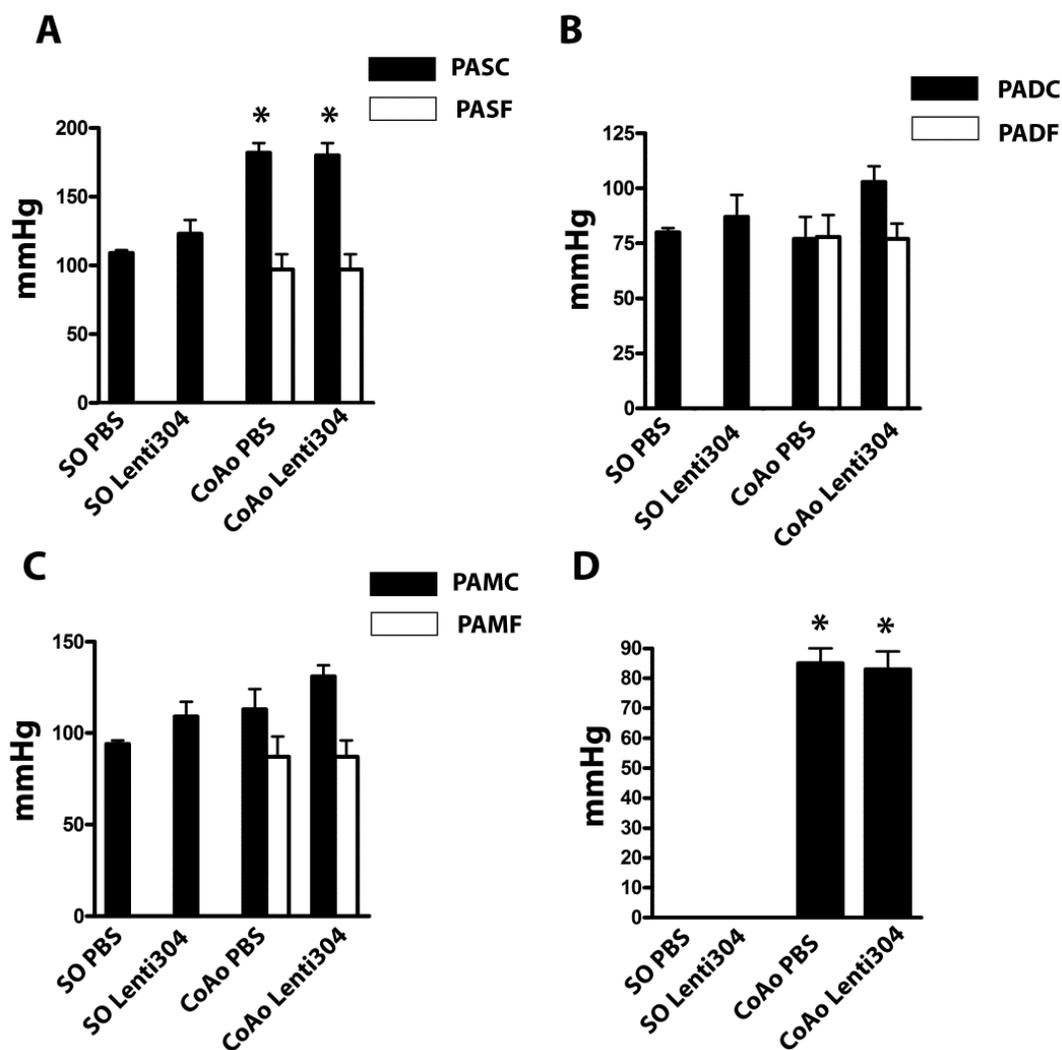


Figura 37: Avaliação hemodinâmica dos animais com injeção de Lenti#304 shMEF2C e coarctados por 15 dias. A. Gráfico representativo da pressão arterial sistólica na artéria carótida e na artéria femoral. B. Gráfico representativo da pressão arterial diastólica na artéria carótida e na artéria femoral. C. Gráfico representativo da pressão arterial média na artéria carótida e na artéria femoral. D. Gráfico representativo do gradiente arterial (diferença entre as pressões na carótida e na femoral). PASC, pressão arterial sistólica na carótida; PASF, pressão arterial sistólica na femoral; PADC, pressão arterial diastólica na carótida; PADF, pressão arterial diastólica na femoral; PAMC, pressão arterial média na carótida; PAMF, pressão arterial média na femoral. SO, *sham operated*; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta. \* $p < 0,05$  vs SO PBS e SO Lenti304.

#### **4.10.5. Gravimetria dos corações de camundongos submetidos a coarctação da aorta e com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C**

Para avaliarmos mais especificamente o peso do ventrículo esquerdo realizamos a análise gravimétrica. Uma vez retirado o coração, o ventrículo direito do coração é separado cuidadosamente do ventrículo esquerdo e ambos são pesados e seus valores divididos pelo peso corporal do animal. Com isso obtemos os valores relativos de cada parte do coração. Também avaliamos o peso relativo dos pulmões onde foi procedido da mesma forma. Conforme demonstrado na Tabela 7 e Figura 38 podemos destacar que a coarctação da aorta por 15 dias leva a um aumento no peso relativo do ventrículo esquerdo comparado aos grupos SO PBS e SO Lenti304 shMEF2C. Este aumento é significativamente atenuado no grupo de animais coarctados que receberam as injeções locais do lentivírus #304 shMEF2C. O peso relativo do ventrículo direito não demonstrou diferenças entre os grupos. Já o peso relativo dos pulmões aumenta significativamente no grupo de animais coarctados PBS, aumento este não observado no grupo coarctado que recebeu injeção de lentivírus #304 shMEF2C (Figura 38).

Tabela 7. Análise gravimétrica dos animais com injeção de Lentivírus #304 shMEF2C e coarctados por 15 dias.

<b>Gravimetria</b>				
	<b>Sham</b>		<b>CoAo</b>	
	<b>PBS</b>	<b>Lenti shMEF2C</b>	<b>PBS</b>	<b>Lenti shMEF2C</b>
<b>N</b>	5	8	5	5
<b>VE relativo(mg/g)</b>	29,8±1,1	30,7±1,5	44,2±1,3*	36,0±0,8 #
<b>VD relativo(mg/g)</b>	8,4±0,2	9,4±0,4	8,7±0,4	7,8±0,2
<b>Pulmão relativo(mg/g)</b>	54,4±2,5	53,2±2	79±3,1*	50,8±0,96#

N, número de animais utilizados; SO, *sham operated*; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta; VE relativo, massa do ventrículo esquerdo dividida pela massa corporal do animal; VD relativo, massa do ventrículo direito dividida pela massa corporal do animal; Pulmão relativo, massa dos pulmões dividida pela massa corporal do animal. \*p < 0,05 vs SO PBS e SO Lenti304; # p < 0,05 vs CoAo PBS

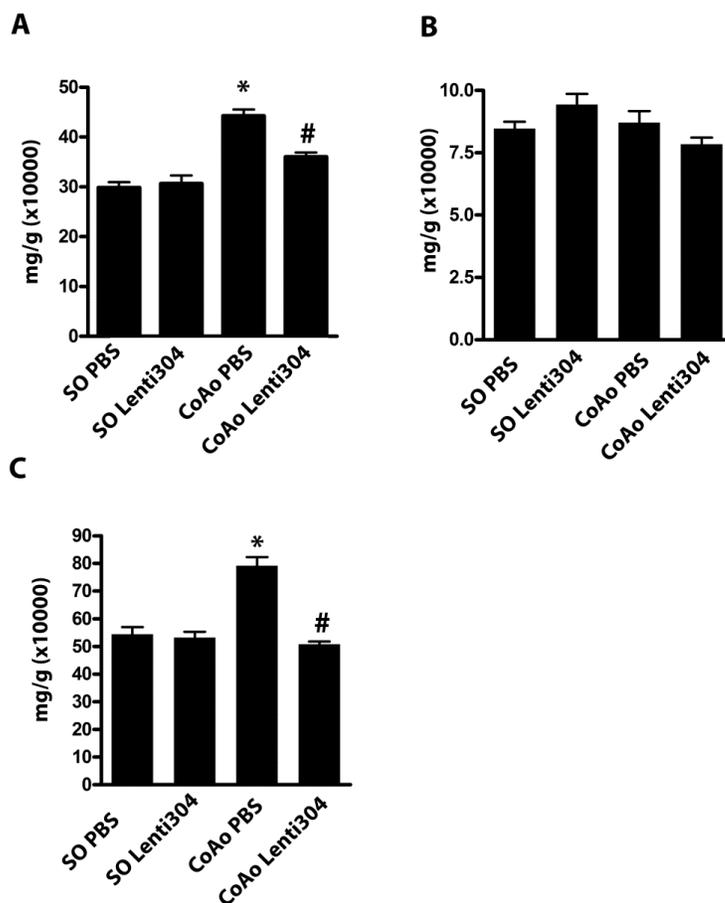


Figura 38: Avaliação gravimétrica dos animais com injeção de Lenti#304 shMEF2C. A. Gráfico demonstrando valor relativo do ventrículo esquerdo (ventrículo esquerdo/peso corporal). B. Gráfico demonstrando valor relativo do ventrículo direito (ventrículo direito/peso corporal). C. Gráfico demonstrando valor relativo dos pulmões (pulmões/peso corporal). SO, *sham operated*; Lenti304, animais com injeção de lentivírus #304 shMEF2C; CoAo, coarctação da aorta. \* $p < 0,05$  vs SO PBS; #  $p < 0,05$  vs CoAo PBS.

Com base em todos os resultados apresentados podemos concluir que a injeção de partículas lentivirais #304 shMEF2C é capaz de atenuar a hipertrofia que ocorre em resposta ao estímulo mecânico da coarctação da aorta, uma vez que podemos observar que frente a um mesmo nível de sobrecarga ocorre diminuição da espessura da parede posterior e do peso relativo de ventrículo esquerdo.



## ***5- DISCUSSÃO***



### **5.1. Avaliação gênica e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos**

O presente estudo demonstra que a superexpressão de MEF2C em cultura de cardiomiócitos neonatos provoca aumento da expressão de genes de ciclo celular e diminuição de genes estruturais, com fenótipos de perda e desorganização sarcomérica. Esses achados foram demonstrados por técnicas de microarranjo de DNA (*Microarray*), PCR em tempo real, *western blotting* e microscopias de luz, confocal e eletrônica de transmissão. Esse conjunto de dados dá evidências que a superexpressão de MEF2C leva a desdiferenciação de cardiomiócitos neonatos em cultura.

Nesse contexto, sabe-se que o miócito cardíaco adulto responde ao estímulo de estresse por três maneiras distintas: hipertrofia; morte celular e hiperplasia (BUJA LM e VELA D., 2008). O crescimento no número de miócitos cardíacos no coração de adultos pode ocorrer tanto pela reativação do ciclo celular, como pelo recrutamento e diferenciação de células progenitoras, cardíacas ou circulantes, em miócitos cardíacos funcionais (BUJA e VELA, 2008). Em relação ao crescimento do miócito maduro por divisão celular é necessário um processo de desdiferenciação anterior ao processo de divisão celular (ZHANG et al., 2010).

De fato, a replicação de miócitos cardíacos após lesão do miocárdio em rato ou *zebrafish* é precedida por evidência molecular e/ou morfológica de desdiferenciação, como por exemplo, expressão de marcadores de síntese de DNA e degeneração sarcomérica

(OBERPRILLER & OBERPRILLER, 1974; JOPLING et al., 2010; KIKUCHI et al., 2010; PORRELLO et al., 2011).

Em nossos estudos com superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos, ambas as observações referentes à expressão de marcadores de síntese de DNA e à degeneração sarcomérica foram relatadas, reforçando a hipótese que um processo de desdiferenciação e uma tentativa de reativação do ciclo celular estejam ocorrendo.

Nossos resultados demonstram-se interessantes principalmente por ir contra um dogma antigo de que os cardiomíocitos são células terminalmente diferenciadas e, portanto não entrariam em ciclo celular, sendo que o crescimento celular se daria principalmente por meio de hipertrofia. Sendo assim, durante as fases iniciais do desenvolvimento do coração em mamíferos, os miócitos cardíacos crescem tanto por hiperplasia (aumento no número de células) quanto por hipertrofia (aumento no tamanho da célula), resultando em um aumento global na massa do coração (CLAYCOMB et al., 1992). No entanto, nos primeiros dias após o nascimento, os miócitos cardíacos reduzem drasticamente sua capacidade proliferativa. A diminuição da capacidade proliferativa dos miócitos cardíacos de ratos ocorre entre o terceiro e quarto dia pós-natal, cessando completamente por volta do 17º dia (LI et al., 1996). Todo aumento subsequente no tamanho do coração ocorre, portanto, por hipertrofia (CLAYCOMB et al., 1992). A incapacidade dos miócitos cardíacos adultos de proliferarem é atribuída a um bloqueio dos mecanismos que controlam o ciclo celular. Sendo assim, a maioria dos miócitos adultos encontra-se nas fases G<sub>0</sub> ou G<sub>1</sub> do ciclo celular, o que é consistente com a diferenciação terminal destas células (CAPASSO JM., et al., 1992).

Os resultados do presente estudo demonstraram que miócitos cardíacos em cultura superexpressando MEF2C apresentam um perfil gênico contrário ao apresentado por miócito cardíaco em crescimento hipertrófico. No ensaio de microarranjo de DNA foram identificados 1072 genes diferencialmente expressos (com variação mínima de  $\pm 2$  vezes e valor de  $p < 0,05$ ) entre miócitos cardíacos de ratos neonatos com tratamento com Ad-MEF2C comparados ao controle Ad- $\beta$ Gal. Desses, 49% apresentaram aumento na expressão gênica contra 51% com diminuição. Os genes foram submetidos à análise quanto aos seus aspectos funcionais através do programa *Ingenuity*<sup>TM</sup>. Observou-se que os genes com expressão aumentada estão relacionados à replicação do DNA e progressão do ciclo celular. Por outro lado, os genes com expressão diminuída estão relacionados a proteínas sarcoméricas e estruturais. É descrito que a progressão do fenótipo hipertrófico de miócitos cardíacos é acompanhada com um aumento na expressão de genes estruturais e principalmente sarcoméricos, com formação e disposição de novos sarcômeros em paralelo, levando ao aumento no tamanho do miócito (SADOSHIMA e IZUMO 1997).

O fenótipo do miócito cardíaco superexpressando MEF2C avaliado por microscopia de luz, confocal e eletrônica de transmissão demonstrou um aumento no número de células multinucleadas e uma diminuição considerável de estruturas sarcoméricas, não apresentando fenótipo hipertrófico. Em nosso estudo, a degeneração sarcomérica observada por microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão corroboram com os dados obtidos por microarranjo de DNA, PCR em tempo real e WB, que demonstraram uma diminuição na expressão de genes sarcoméricos, como miosina, actina e desmina. É possível que durante o processo de desdiferenciação ocorra repressão de diversos genes

sarcoméricos, o que justificaria a perda considerável de estruturas sarcoméricas. Essa repressão gênica pode estar associada a um controle epigenético da cromatina levando a um silenciamento gênico relacionados a genes estruturais. No presente estudo observamos alterações no núcleo dos miócitos cardíacos tratados com MEF2C que serão investigados quanto às características da cromatina nessas células.

Outra alteração fenotípica observada nos miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C foi a presença de células binucleadas em miócitos cardíacos é um fenômeno fisiológico, ocorrendo em torno de 10% durante os primeiros dias pós-natal (PASUMARTHI et al., 2005). Em nossos estudos, observou-se que em miócitos cardíacos controle, o número de células binucleadas é de aproximadamente 10-15%. Com o tratamento com Ad-MEF2C por 48 horas, o número de miócitos binucleados foi de 40-45%, um aumento aproximado de três vezes. O aumento no número de células multinucleadas está relacionado ao aumento na síntese de DNA com presença de mitose, porém com ausência de citocinese (AHUJA et al., 2007). Em nosso estudo, observamos algumas evidências que os miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C apresentam aumento na replicação do DNA. Diversos genes identificados diferencialmente aumentados estão relacionados ao processo de replicação do DNA. Os resultados de citometria de fluxo com marcação para iodeto de propídeo indicam que as células tratadas com AdMEF2C apresentam aumento na síntese de DNA. Isso indica que pode haver aumento na proliferação de miócitos decorrente do tratamento com Ad-MEF2C. No entanto estudos adicionais deverão ser realizados a fim de avaliar a proliferação de cardiomiócitos de ratos neonatos tratados com Ad-MEF2C.

Estudos que avaliaram a proliferação em miócitos cardíacos de rato em desenvolvimento determinaram que a síntese de DNA ocorre em duas fases distintas (SOONPAA et al., 1996). A primeira fase ocorre durante a vida intrauterina com 12 dias de vida, na qual se observam cariocinese e citocinese, resultando no aumento no número dos miócitos cardíacos. A segunda fase ocorre no início do período neonatal, atingindo o pico nos dias 4-6 pós-natal. Nesta fase, ocorre cariocinese, mas não citocinese, o que resulta em binucleação dos miócitos ventriculares. Em roedores, até a terceira semana pós-parto, por volta de 85-90% dos miócitos cardíacos são binucleados, já em seres humanos esse valor varia de 25- 57% (CLUBB e BISHOP, 1984; SCHMID et al., 1985; SOONPAA et al., 1996). O significado fisiológico de células binucleadas não é claro. Supõe-se que seja uma resposta adaptativa, que confere aos miócitos cardíacos a capacidade de aumentar a transcrição gênica e a síntese de proteínas.

Estudos em humanos demonstraram que o aumento na síntese de DNA em miócitos cardíacos pós-natal não está relacionado à divisão e proliferação celular. Foi relatado que aproximadamente 93% dos miócitos cardíacos que apresentam aumento na síntese de DNA não apresentam citocinese. A síntese de DNA nessas células pode levar meramente à binucleação (divisão nuclear sem citocinese) ou à poliploidia (maior ou igual a 4N) (STEINHAUSER e LEE, 2011).

Estudos de proliferação celular, utilizando bromodeoxiuridina (BrdU) e incorporação de timidina tritiada indicaram que o número de miócitos cardíacos que entram no ciclo celular é muito baixo, sendo que apenas 0,005% dos miócitos cardíacos ventriculares mostram evidência de síntese de DNA em corações de ratos adultos intactos

(RUMYANTSEV e BORISOV, 1987; SOONPAA e FIELD, 1998). Embora não seja observado um aumento na síntese de DNA no coração de ratos infartados (0,004%) (PASUMARTHI et al., 2005), um índice mitótico de 0,015-0,08% tem sido relatado em miocárdio humano após infarto do miocárdio (KAJSTURA et al., 1998; BELTRAMI et al., 2001). Assim, a capacidade proliferativa intrínseca de miócitos cardíacos adultos é bastante baixa.

Em humanos, foram realizados estudos utilizando medições de incorporação de Carbono 14 no DNA genômico, para avaliar a idade dos miócitos cardíacos. Foi observado que miócitos cardíacos adultos possuem a capacidade de se renovarem, porém com uma diminuição gradual durante a vida, variando de 1% ao ano até os 20 anos de idade a 0,3% ao ano por volta dos 75 anos. Esse estudo concluiu que menos de 50% dos miócitos são renovados durante toda a vida de um indivíduo sadio (BERGMANN O., et al, 2009).

Portanto, baseado nos dados da literatura descrito acima, apesar dos resultados apresentados no presente estudo, que a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos induz a reativação do ciclo celular e aumento na síntese de DNA, não podemos correlacionar diretamente com divisão e proliferação dos miócitos cardíacos. Isso decorre que os miócitos cardíacos podem apresentar um aumento na síntese de DNA ou até mesmo entrar em mitose sem ocorrer a citocinese, portanto sem ocorrer a proliferação celular. Esses mecanismos intrínsecos, de controle da divisão celular, que os miócitos cardíacos apresentam, compromete a proliferação celular e reflete na incapacidade do coração de mamíferos de se regenerar completamente frente a uma injúria, como por exemplo, o infarto do miocárdio.

Os resultados descritos nesse estudo apresenta um novo papel de MEF2C em miócitos cardíacos após o período embrionário. Foi demonstrada a importância da família de fatores de transcrição MEF2 no desenvolvimento embrionário do coração, como um regulador de outros fatores de transcrição necessários para a diferenciação de cardiomioblastos em cardiomiócitos (LIN et al., 1997; MCKINSEY et al., 2002). A deleção de MEF2C em camundongos é acompanhada pela diminuição da expressão de genes estruturais cardíacos e mortalidade embrionária (LIN et al., 1997). Camundongos com deleção de MEF2A morrem subitamente durante o período perinatal com dilatação do ventrículo direito e desorganização miofibrilar (NAYA et al., 2002). Os defeitos estruturais apresentados pelo coração dos animais com deleção de membros da família MEF2 são decorrentes de defeitos na diferenciação dos mioblastos em miócitos cardíacos (LIN et al., 1997). No entanto ainda não está compreendido o papel dos fatores de transcrição MEF2 em miócitos cardíacos pós-natal e os efeitos provocados pela ativação de membros da família MEF2 após o período embrionário.

Várias evidências dão suporte à participação dos fatores da família MEF2 na regulação da expressão gênica do miocárdio em resposta a estímulos hipertróficos. Estímulos mecânicos em miócitos cardíacos ativam rapidamente os fatores de transcrição MEF2 e sua ativação precoce coordena a expressão e ativação de genes de resposta imediata e genes relacionados a proteínas estruturais (NADRUZ et al., 2003). De maneira geral, estes resultados indicam a importância dos fatores MEF2 na coordenação do controle gênico em resposta a estímulos mecânicos (NADRUZ et al., 2003; NADRUZ et al., 2004; NADRUZ et al., 2005).

Por outro lado, alguns dados da literatura vão contra no que diz respeito ao papel do MEF2 na resposta hipertrófica do miócito cardíaco (XU et al., 2006; EL AZZOUZI et al., 2010). Estudos demonstraram que as proteínas pertencentes à família MEF2 não são necessárias para a progressão da resposta hipertrófica do miócito frente a estímulos mecânicos (EL AZZOUZI et al., 2010). Da mesma forma, foi demonstrado que a superexpressão de MEF2A e MEF2C em camundongos transgênicos está associada ao aparecimento espontâneo de cardiomiopatia dilatada. Além disso, esses animais não desenvolvem hipertrofia em resposta a estímulos mecânicos (XU et al., 2006). Nesse contexto, há evidências que a participação dos fatores de transcrição MEF2 na resposta hipertrófica do miócitos pode ocorrer de forma indireta.

Uma das inferências de MEF2 como um mediador hipertrófico foi feita com base em semelhanças conhecidas entre os fatores de transcrição SRF (*Serum Response Factor*) e MEF2, ambos pertencentes à família MADS-box e responsivos a estímulos de estresse, de desenvolvimento e de mitógeno. Camundongos transgênicos com superexpressão de SRF no coração demonstraram um fenótipo de cardiomiopatia hipertrófica (ZHANG et al., 2001). Além disso, a superexpressão de SRF em miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura induziu um fenótipo hipertrófico com aumento na área superficial e de estruturas sarcoméricas (ZHANG et al., 2001). Por outro lado, a superexpressão de MEF2A ou MEF2C nesse mesmo modelo de cultura de células, induziu desorganização sarcomérica e fenótipo alongado dos miócitos compatível com cardiomiopatia dilatada (XU et al., 2006).

Portanto apesar das evidências que MEF2 participa no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, não estava claro quais os mecanismos que levam a desorganização

sarcomérica e o quadro de insuficiência cardíaca encontrada em animais transgênicos para MEF2A ou MEF2C (XU et al., 2006). Da mesma forma que não estava claro qual seria o papel do aumento na expressão e atividade transcricional de MEF2C em estágios avançados de insuficiência cardíaca. Assim os resultados desse trabalho apresentam uma possível explicação para os efeitos fenotípicos e as implicações fisiopatológicas da ativação de MEF2C em miócitos cardíacos após o período embrionário e sua participação no desenvolvimento e progressão de insuficiência cardíaca.

## **5.2. Avaliação gênica e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos adultos**

Uma vez avaliado o fenótipo e as modificações transcricionais ocasionadas pela superexpressão de MEF2C em cultura de cardiomiócitos neonatos passamos a verificar os efeitos da superexpressão também em cardiomiócitos de ratos adultos. Estas observações possuíam como objetivo principal verificar se apenas células com uma maior capacidade proliferativa responderia a superexpressão com a ativação do ciclo celular, ou se também uma células cardíaca adulta e, portanto em diferenciação final responderiam da mesma forma que as células de ratos neonatos.

O primeiro grande desafio a ser enfrentado foi conseguir isolar e cultivar adequadamente estas células cardíacas adultas. Para isso utilizamos diversos protocolos em que devido a não viabilidade celular também não era possível seguir com o cultivo uma vez que as células não aderiam ao substrato. Finalmente testamos o protocolo descrito em ZHANG e colaboradores 2010, onde conseguimos efetivamente o isolamento e o cultivo por

até 12 dias com a presença de células viáveis. Com este protocolo que usa basicamente tampão saturado do íon potássio, as células permanecem em estado cardioplégico até o fim do isolamento quando são colocadas em meio de cultura. Por meio de tal protocolo conseguimos demonstrar células viáveis, com morfologia típica retangular através de microscopia de luz convencional a fresco. Por meio de microscopia confocal e eletrônica de varredura podemos observar o padrão típico de estriação e a presença de dicotomia.

Após o processo de padronização da técnica de isolamento de cardiomiócitos adultos passamos a utilização do tratamento com adenovírus AdMEF2C e a análise da expressão gênica e do fenótipo destas células após o tratamento. Sendo assim podemos demonstrar que após 48 horas de tratamento as células adultas também apresentam aumento na expressão de MEF2C verificada por meio de PCR em tempo real. Para este experimento também utilizamos o controle MEF2C mutado Ad23/24 que também apresentou efetividade no aumento da expressão de MEF2C.

A partir destas conclusões as mesmas amostras de RNA foram também submetidas à análise por PCR em tempo real para os genes relacionados ao ciclo celular e estruturais. Com isso podemos observar que cardiomiócitos adultos também apresentam o mesmo padrão de expressão gênica, ou seja, aumento de genes de ciclo celular e diminuição de genes sarcoméricos.

A desdiferenciação das células de mamíferos pode servir a múltiplos propósitos, incluindo a (1) facilitação da regeneração de tecidos por geração de células progenitoras semelhantes e (2) proteção de células da hipóxia por redução do consumo de ATP devido a alterações no metabolismo de energia (PÖLING et al., 2012).

A desdiferenciação de cardiomiócitos adultos já havia sido reportada anteriormente em KUBIN e colaboradores em 2011, que demonstraram que o tratamento de cardiomiócitos adultos com Oncostatina M levava estas células a desdiferenciação. A Oncostatina M é um tipo de interleucina da família da interleucina 6 e o tratamento com esta interleucina induz a desdiferenciação dos cardiomiócitos e regula positivamente marcadores de células-tronco (KUBIN et al., 2011).

Outro trabalho também reportou que cardiomiócitos adultos quando tratados com FGF (*Fibroblast growth factor*) dentro de dias em cultura perderam suas principais características como as estrias e propriedades eletrofisiológicas e começaram a dividir-se, como confirmado por meio de marcadores de proliferação e a incorporação de BrdU. Muitos cardiomiócitos desdiferenciados passaram a expressar c-kit e os primeiros fatores de transcrição cardíacos GATA4 e Nkx2.5. Este trabalho contraria a visão de que estas células são terminalmente diferenciadas (ZHANG et al., 2010).

A proteína p38 foi relacionada como um regulador negativo da proliferação de miócitos cardíacos (ENGEL et al., 2005). No entanto, a inibição de p38 não foi suficiente para resultar na proliferação de cardiomiócitos. Por outro lado o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) foi confirmado como um regulador positivo da proliferação de cardiomiócitos. Estimulação de miócitos cardíacos com FGF resultou no aumento na síntese de DNA sem ocorrência de proliferação. No entanto, a simultânea inibição de p38 e estimulação com FGF1 é acompanhada pela proliferação de miócitos cardíacos (ENGEL et al., 2005). A desdiferenciação desses miócitos cardíacos adultos foi acompanhada pela diminuição na expressão proteínas inibidoras do ciclo celular, como p21, p53 e 14-3-3,

além da diminuição da expressão de proteínas sarcoméricas e aumento de marcadores de proliferação celular, como Ki67, BrdU e histona H3 fosforilada (ZHANG Y., et al., 2010).

Nossos resultados de PCR em tempo real que demonstraram a mudança da expressão de genes estruturais estão de acordo com dados da literatura. Trabalho recente demonstra da mesma forma a mudança da expressão de diferentes tipos de actina em cardiomiócitos adultos em co-cultura com fibroblastos. Neste trabalho foi demonstrado que em cardiomiócitos adultos a desdiferenciação revela uma degradação do aparato contrátil e re-expressão de actina esquelética (DRIESEN et al., 2009).

O nosso interesse em avaliar a Desdiferenciação em cardiomiócitos adultos está na ligação entre desdiferenciação e estágios mais avançados de insuficiência cardíaca. Pacientes com cardiomiopatia dilatada possuem contractilidade cardíaca reduzida, perda da organização sarcomérica e degeneração dos cardiomiócitos (HEIN et al., 2009). A grande heterogeneidade da doença tem sido associada a genes modificadores ainda desconhecidos que podem promover a desorganização dos sarcômeros em cardiomiócitos ou a fatores ambientais, tais como vírus cardiotrópicos, o que pode causar efeitos citopáticos diretos ou reações adversas no tecido do hospedeiro, o que resulta na acumulação de macrófagos no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia dilatada (SHIOI et al., 1996).

As alterações da estrutura sarcomérica dos cardiomiócitos sob condições patológicas de insuficiência cardíaca são caracterizadas pelo desaparecimento dos padrões altamente organizados de miosinas, titina, e desmina algumas vezes gerando um fenótipo que se assemelha ao estado de cardiomiócitos embrionários e fetal (DRIESEN et al., 2009).

Em pacientes que sofrem de estenose coronariana, encontramos um aumento de expressão de actina esquelética em cardiomiócitos hibernantes com uma diminuição da expressão de actina cardíaca e cardiotina. A diminuição da expressão de cardiotina está associada como um marcador precoce de desdiferenciação nas mesmas amostras de humanos com estenose coronariana e em vários modelos animais de miocárdio hibernante (DISPERSYN et, al., 2002).

Esta mudança de expressão gênica observada em patologias cardíacas também tem sido observada em fibrilação atrial crônica, que é considerado como um modelo altamente adequado para estudar desdiferenciação de miócitos atriais assemelhando-se ao miocárdio ventricular hibernante. Microscopia eletrônica realizada uma semana após fibrilação atrial crônica indicaram uma redistribuição homogênea de heterocromatina ao longo dos núcleos de cardiomiócitos. Os primeiros sinais de miólise e acúmulo de glicogênio ocorreram após 1-2 semanas de fibrilação atrial crônica. Posteriormente, foram identificados estágios progressivos de desdiferenciação em 4 e 16 semanas de fibrilação atrial crônica mostrando aumento gradual acumulação de glicogênio, miólise, alterações da morfologia mitocondrial e uma desorganização do retículo sarcoplasmático (DRIESEN et al., 2009).

A nível ultraestrutural nós demonstramos por meio de microscopia eletrônica de transmissão que as unidades sarcoméricas nas células tratadas com AdMEF2C não se mostraram desorganizadas, mas sim podemos observar estruturas típicas de sarcômeros com banda Z preservada tal como no controle. Isso não condiz com os resultados de PCR em tempo real que demonstrou diminuição da expressão de genes estruturais como desmina e actina cardíaca, isso pode ser explicado pelo fato do cardiomiócito adulto possuir mais

vias reguladoras que impediriam a degradação destas estruturas tão rapidamente, e sendo o *turnover* destas proteínas longo o fenótipo demoraria um tempo maior para se manifestar.

Em relação aos processos de morte e divisão dos miócitos cardíacos no processo de remodelamento, estudos demonstram que fisiologicamente a renovação do miócito cardíaco ocorre em uma taxa de aproximadamente 0,3% a 1% ao ano (BERGMANN et al., 2009). Essa taxa de renovação, apesar de aumentar bastante, em torno de 20 a 30 vezes após situações de injúria, ainda é inferior a taxa de morte dessas células que gira em torno de 25-30% ao ano no coração insuficiente, o que contribui para a deterioração estrutural e funcional do coração (BELTRAMI et al., 2001; BUJA e VELA, 2008).

Assim, após uma lesão grave, tal como ocorre durante o infarto do miocárdio, o miócito maduro é incapaz de gerar miócitos novos em uma taxa de proliferação suficiente para substituir o tecido lesionado. Portanto, o dano miocárdico ocorre devido à perda dos miócitos cardíacos e ao acúmulo de fibrose, o que contribui para a perda da função contrátil do coração (BUJA e VELA, 2008). Sendo assim uma vez provado que a desdiferenciação e a reentrada no ciclo é possível em cardiomiócitos adultos, isso representa uma importante via terapêutica de renovação de tecido cardíaco perdido durante eventos isquêmicos.

### **5.3. Avaliação fenotípica do silenciamento de MEF2C em corações de camundongos coarctados**

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a injeção de partículas lentivirais contendo shRNA para o fator de transcrição MEF2C em corações de camundongos é capaz de atenuar a hipertrofia induzida pela coarctação da aorta por 15 dias. Podemos observar que os animais que receberam injeções de lentivírus shRNA<sup>MEF2C</sup> apresentaram diminuição da espessura da parede posterior e do peso relativo do ventrículo esquerdo e dos pulmões.

Durante o trabalho de mestrado, demonstramos o uso de siRNA<sup>MEF2C</sup> em camundongos sendo que o silenciamento foi efetivo por até 4 dias após a injeção através da veia jugular. Apesar do silenciamento não ter se mostrado efetivo por muito tempo o efeito deste silenciamento pôde ser observado por até 15 dias, uma vez que os animais silenciados para MEF2C apresentaram atenuação da hipertrofia com diminuição da espessura da parede ventricular, melhora na função cardíaca, diminuição da fibrose e diminuição da expressão de marcadores de hipertrofia como o ANP (PEREIRA et al., 2009).

Outro trabalho do nosso laboratório também utilizou sequencia de siRNA injetado na veia jugular para silenciar a FAK (Focal Adesion Kinase) e demonstrou uma diminuição da hipertrofia decorrente de coarctação da aorta. O silenciamento conseguido para esta proteína no coração era de até 15 dias e seus efeitos foram observados por até 21 dias (CLEMENTE, et al., 2007).

Com base nestes resultados encontrados durante o desenvolvimento do mestrado passamos a procurar um método de silenciamento mais prolongado. Com isso a técnica de

shRNA se mostrou a mais indicada e para conseguirmos introduzir este plasmídeo em corações de camundongos utilizamos a técnica de partículas lentivirais. É descrito que shRNA (*Short Hairpin RNAs*) podem fornecer silenciamento gênico estável via RNA de interferência (SNOVE and ROSSI, 2006). Ambos siRNAs e shRNAs, silenciamento transitório e estável de RNA, respectivamente, são semelhantes no processamento intermediário na via microRNA (SNOVE and ROSSI, 2006).

Sendo assim o próximo passo foi a clonagem de uma sequência de shRNA específica de MEF2C em plasmídeo próprio para silenciamento. Com o uso de shRNA<sup>MEF2C</sup> em cardiomiócitos em cultura demonstramos que houve um silenciamento de MEF2C verificado por meio de western blotting e PCR em tempo real.

A primeira demonstração *in vivo* de shRNA foi via injeções hidrodinâmicas na veia da caudal em camundongos do shRNA anti-vírus da hepatite C e posteriormente este grupo mostrou que a replicação viral da hepatite B humana poderia ser inibida no fígado de camundongos tratados (MCCAFFREY et al., 2003).

Uma vez verificada a eficiência do silenciamento em cultura de cardiomiócitos nos deparamos com outro problema que foi o de introduzir um plasmídeo tão grande no coração de camundongos para dar prosseguimento ao estudo. Para isso passamos a utilizar métodos de sub-clonagem para construção de plasmídeo lentiviral. O lentivírus #304shRNA<sup>MEF2C</sup> foi então produzido pelo Laboratório de Vetores Virais, LNBio e passamos a testa-lo primeiramente em cultura de células. Por meio do marcador fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) podemos mensurar, ainda que indiretamente, a efetividade de transfecção e leitura por citometria de fluxo. Ou seja, cardiomiócitos em cultura tratados com lentivírus shRNA<sup>MEF2C</sup> apresentaram aproximadamente 50% de marcação positiva

para GFP. Com o tratamento do lentivírus #304 shMEF2C podemos observar um silenciamento de até 75% no nível de RNAm de MEF2C.

Vetores Lentivirais tornaram-se alguns dos mais amplamente utilizados vetores para a pesquisa biológica fundamental, genômica funcional, e terapia gênica. A capacidade do lentivírus para transduzir células que não se dividem, como no caso de cardiomiócitos e neurônios, levou a muitas aplicações de terapia gênica diferentes. A transdução estável foi relatada em diferentes tecidos com diferentes eficiências de transdução dependendo do tecido alvo. Em particular, a administração local de lentivírus para o cérebro ou retina resultou na transdução estável de células terminalmente diferenciadas (MÁTRAI et al., 2010).

Como uma alternativa para a entrega direta de genes por via intramuscular, lentivírus pode converter diferentes tipos de células-tronco do músculo que podem diferenciar-se e/ou fundir-se com as fibras musculares *in vivo*. Vetores lentivirais são bem adequados para a disponibilização de genes terapêuticos em mesoangioblastos que pode funcionalmente reparar músculo distrófico após a injeção sistêmica em camundongos distróficos (SAMPAOLESI et al., 2006).

Sendo assim o próximo passo foi verificar a capacidade de infectividade das partículas lentivirais em tecido muscular cardíaco. Para isso procedemos com a injeção das partículas diretamente no músculo cardíaco. A injeção intramiocárdica direta de lentivírus em ratos adultos ignora a barreira endotelial e resulta em estabilidade, mas em geral causa modesta transdução, ficando confinada principalmente para a área perto do local da injeção (<5%). Já a técnica de difusão forçada no miocárdio aumenta a eficiência de transdução do lentivírus (BONCI et al., 2003). Sendo assim com a técnica de injeção local podemos

observar que após 7 dias já obtemos a marcação para GFP positiva no músculo cardíaco e por isso passamos a utilizar este meio de transdução para os próximos experimentos.

Outros trabalhos já citaram o uso de partículas lentivirais injetadas diretamente em órgãos alvos. Como por exemplo, a injeção de shRNA diretamente na massa tumoral de carcinoma epidermoide de laringe foi capaz de diminuir o tamanho do tumor. O estudo demonstra que a aplicação de tecnologia de RNAi baseado em vetor é uma modalidade terapêutica promissora na terapia gênica humana (WANG et al., 2008).

Outros tipos de partícula virais também já foram utilizados. Trabalho da literatura descreve a utilização de partículas de adenovirus associado (AdA-GFP) com cardiotropismo. Foi demonstrado que a injeção deste tipo de partícula viral possui afinidade pelo coração uma vez injetado através da veia caudal. Estes animais apresentaram melhora na função cardíaca e demonstraram ser possível detectar fortemente a marcação para GFP positiva no coração de camundongos que receberam a injeção de vírus (SUCKAU et al., 2009).

O modelo de sobrecarga pressórica utilizado nesse trabalho já foi amplamente realizado em nosso laboratório e tem demonstrado eficiência na indução de hipertrofia cardíaca (FRANCHINI et al., 2000; TORSONI et al., 2003). Esse modelo de coarctação da aorta foi eficiente em produzir o efeito esperado de hipertrofia cardíaca, uma vez que os grupos estudados apresentaram diferenças no peso e na espessura da parede do ventrículo esquerdo. O gradiente trans-constricção encontrado foi de aproximadamente 50 mmHg em todos os seguimentos do estudo, sendo que os animais coarctados tratados com lentivírus shRNA<sup>MEF2C</sup> não apresentaram diferença nesse gradiente.

Um dos principais processos adaptativos que ocorrem no remodelamento cardíaco é a hipertrofia do miócito. O estresse hemodinâmico é detectado pelo miócito, via deformação da membrana e alteração do citoesqueleto culminando na ativação de diversas vias, tais como: modificação de canais iônicos sensíveis ao estiramento; ativação de proteínas sinalizadoras, como integrinas e enzimas tirosino quinases e a produção e/ou secreção de fatores de crescimento (SADOSHIMA e IZUMO, 1997). Essas alterações ativam diversas vias de sinalização intracelular que culminam no núcleo, onde ocorre modificação da expressão gênica levando a alterações no fenótipo do miócito. O miócito hipertrófico apresenta-se com seu tamanho aumentado, devido a um aumento das unidades contráteis (sarcômeros), dispostos em paralelo (hipertrofia concêntrica) ou em série (hipertrofia excêntrica) (SADOSHIMA e IZUMO, 1997).

Sendo MEF2C um fator de transcrição importante na cardiogênese, os trabalhos com *knockout* para MEF2C não conseguem concluir seus estudos nas fases mais avançadas do desenvolvimento pelo fato de não haver embriões viáveis após o 10º dia gestacional (LIN et al., 1997). Sendo assim avaliar as funções de MEF2C em animais adultos e analisar a importância da ausência deste fator de transcrição nos pareceu bastante razoável. Para este estudo a princípio utilizando vetor lentiviral que carrega um shRNA para MEF2C podemos observar que a ausência de MEF2C atenua os efeitos da coarctação da aorta com diminuição da espessura da parede posterior e peso relativo do ventrículo esquerdo.

A importância dos fatores de transcrição MEF2 são ainda pouco entendida e por vezes controversa. Corroborando com nossos resultados podemos citar um trabalho de KIM e colaboradores (2008) que apresentou animais *knockout* para o MEF2D. Animais controles

tratados com isoproterenol ou submetidos à sobrecarga pressórica apresentaram dilatação cardíaca e diminuição da fração de encurtamento, porém, animais *knockout* para MEF2D a dilatação foi menor e a função cardíaca, avaliada através da fração de encurtamento, foi preservada. Desse modo, pode-se dizer que o MEF2D é importante na sinalização tanto por sobrecarga mecânica quanto por estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Por outro lado, camundongos *knockout* para o MEF2A apresentaram dilatação dos ventrículos esquerdo e direito sem evidências de hipertrofia, sendo que a morte súbita foi responsável por 13% das perdas nos animais adultos viáveis (NAYA et al., 2002). Também podemos destacar o trabalho em que MEF2C é superexpresso em coração de camundongos e foi observado que estes animais possuem baixa tolerância à superexpressão e morrem após a coarctação da aorta. Ao mesmo tempo a razão do peso de ventrículo esquerdo pelo peso corporal dos camundongos que hiperexpressam MEF2C também estava aumentada após 3 meses do nascimento (XU et al., 2006).

Com base em todo o conhecimento adquirido durante o mestrado e o doutorado em relação a mecanismos de silenciamento, podemos avançar para técnicas mais específicas e mais promissoras. Uma vez verificada a efetividade do silenciamento com o uso do shRNA, no futuro nosso objetivo é produzir um modelo de animal transgênico com a utilização da mesma sequência de shRNA<sup>MEF2C</sup> em outro vetor lentiviral. O vetor lentiviral carregando a sequência de silenciamento de MEF2C será microinjetado em zigotos para a geração de um animal transgênico. Por meio de cruzamentos com animais Mhy6-merCremer, o animal transgênico expressará o shRNA de MEF2C especificamente no miocárdio após a ativação de CRE por tamoxifeno (VENTURA et al., 2004). Com a geração

deste animal teremos uma excelente ferramenta de estudo, pois poderemos ativar o silenciamento de MEF2C durante a vida adulta do animal sem prejuízos no desenvolvimento cardíaco embrionário. Com este animal transgênico poderemos ativar a expressão do shRNA<sup>MEF2C</sup> em diferentes momentos de sobrecarga pressórica após a coarctação da aorta, crônica ou aguda, com a vantagem do silenciamento ser condicional para o coração do camundongo.



## ***6-CONCLUSÃO***



Os efeitos fenotípicos observados com a superexpressão de MEF2C que resultam em desdiferenciação e ativação do ciclo celular provavelmente contribuem para a perda da função contrátil cardíaca. Essas alterações podem contribuir tanto para a sobrevivência celular em situações de stress quanto para a deterioração funcional do coração em situações fisiopatológicas. Estes dados explicariam o papel patogênico de MEF2C em estágios avançados de insuficiência cardíaca.

Por outro lado o silenciamento de MEF2C no coração de camundongos demonstrou-se eficiente na atenuação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica.



## ***7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



1. INGWALL JS, WEISS RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res.* 2004; 95: 135 – 145.
2. Ahuja P, Sdek P, Maclellan WR. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev.* 2007; 87: 521–544.
3. Bajgelman MC, Constanzi-Strauss E, Strauss BE. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *Journal of biotechnology,* 2003; 103(2), 97-106.
4. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans *Science.* 2009; 324 (5923), 98-102.
5. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998; 14: 167-96.
6. Bonci, D, Cittadini, A, Latronico, MV, Borello, U, Aycock, JK, Drusco, A. Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 2003, 10: 630–636.
7. Buja LM e Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol.* 2008; 17(6):349-74.
8. Capasso JM, Bruno S, Cheng W, Li P, Rodgers R, Darzynkiewicz Z, Anversa P. Ventricular loading is coupled with DNA synthesis in adult cardiac myocytes after acute and chronic myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1992; 71:1379–1389.
9. Chien K R. Stress pathways and heart failure. *Cell.* 98: 555-558, 1999.
10. Clarke PG. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1990; 181(3): 195–213.
11. Claycomb WC. Control of cardiac muscle cell division. *Trends Cardiovasc Med.* 1992; 2: 231–236.
12. Clemente CFMZ, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I, Souza JRM, Franchini KG. Targeting Focal Adhesion Kinase With Small

- Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circ Res.* 2007; 101: 1339 - 1348.
13. Clubb FJJ e Bishop SP. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest.* 1984; 50: 571–577.
  14. Dispersyn GD, Geuens E, Ver Donck L, Ramaekers FCS, Borgers M. Adult rabbit cardiomyocytes undergo hibernation-like dedifferentiation when co-cultured with cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2001; 51: 230–40.
  15. Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, Maes A, Mortelmans L, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *Eur Heart J.* 2002; 23: 849–957.
  16. Driesen RB, Verheyen FK, Debie W, Blaauw E, Babiker F. A., Cornelussen R. N.M., Ausma J, Lenders MH, Borgers M, Chaponnier C, Ramaekers F. C. S.. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 2009; 13: 896–908.
  17. El Azzouzi H, Van Oort RJ, Van der Nagel R, Sluiter W, Bergmann MW, De Windt LJ. MEF2 transcriptional activity maintains mitochondrial adaptation in cardiac pressure overload. *Eur J Heart Fail.* 2010; 12(1):4-12.
  18. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 2005; 19:1175-87.
  19. Fleury S., Simeoni E, Zuppinger C, Déglon N, Von Segesser LK., Kappenberger L, Vassalli G. Multiply attenuated, self-inactivating lentiviral vectors efficiently deliver and express genes for extended periods of time in adult rat cardiomyocytes in vivo. *Circulation,* 2003, 107:2375-2382.
  20. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res.* 2000; 87: 558-565.

21. He J, Ye J, Cai Y, Riquelme C, Liu JO, Liu X, Han A, Chen L. Structure of p300 bound to MEF2 on DNA reveals a mechanism of enhanceosome assembly. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 4464-4474.
22. Hein S, Amon E, Kostin S, Schönburg M, Elässer A, Polyakova V, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation.* 2003; 107: 984-91.
23. Hunter JJ & Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* 1999, 21,341(17):1276-83.
24. Jopling C, Sleep E, Raya M, Marti M, Raya A, Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature.* 2010; 464: 606–609.
25. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 8801– 8805.
26. Katz AM. The cardiomyopathy of overload: A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1990, 322:100-110.
27. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature.* 2010; 464: 601–605.
28. Kim Y, Phan D, Van Rooij E, Wang Dz, Mcanally J, Qi X, Richardson Ja, Hill Ja, Bassel-Duby R, Olson En. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J. Clin. Invest.* 2008, 118(1):124-32.
29. Kubin T, Pöling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, Wietelmann A, Tanaka M, Lörchner H, Schimanski S, Szibor M, Warnecke H, Braun T. Oncostatin M Is a Major Mediator of Cardiomyocyte Dedifferentiation and Remodeling. *Cell Stem Cell* 2011, 9, 420–432.

30. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. J Mol Cell Cardiol. 1996; 28:1737–1746.
31. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. Science. 1997; 276:1404-1407.
32. Liu F, Song Yk, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene Therapy, 1999, 6, 1258–1266.
33. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science. 2002; 295(5556):868-72.
34. Ma K, Chan JKL, Zhu G, Wu Z. Myocyte Enhancer Factor 2 Acetylation by p300 Enhances Its DNA Binding Activity, Transcriptional Activity, and Myogenic Differentiation. Mol Cell Biol. 2005; 9: 3575-3582.
35. Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013; 14(1): 38-48.
36. Mátrai J, Chuah Mkl, Vandendriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. Molecular Therapy, 2010, 18 no. 3, 477–490.
37. Mccaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar Fh, Xu H, Wieland Sf, Marion PL, Kay Ma. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nat. Biotechnol 2003; 21:639–644.
38. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. Trends Bioch Science. 2002; 27:40-47.
39. Molkentin J D and Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. Annual Review of Physiology. 2001; 63: 391-426.

40. Nadruz Jr W, Kobarg CB, Constancio SS, Corat PD, Franchini KG. Load-induced transcriptional activation of *c-jun* in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. Circ Res. 2003; 92: 243-251.
41. Nadruz JrW, Corat MA, Marin TM, Guimaraes Pereira GA, Franchini KG. Focal Adhesion Kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. Cardiovasc Res. 2005; 68: 87-97.
42. Nadruz JrW, Kobarg CB, Kobarg J, Franchini KG. C-Jun is regulated by a combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286:H760-H767.
43. Naya FJ, Black BL, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson JA, Hill JA, Olson EN. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. Nat Med. 2002; 8(11): 1303-9.
44. Nobre F, Lima, Nereida kC. Hipertensão Arterial: Conceito, Classificação e Critérios Diagnósticos. IN Manual de Cardiologia SOCESP - Cap. 70, pág. 303 - Atheneu – 2000.
45. Oberpriller JO, Oberpriller JC. Response of the adult newt ventricle to injury. J Exp Zoology. 1974; 187:249-259.
46. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. Genes Dev. 2003; 17(16):1937–1956.
47. Olson EN. Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. Science. 2006; 313: 1922-1927.
48. Pereira AHM, Clemente CF, Cardoso AC, Theizen TH, Rocco SA, Judice, CC, Guido MC, Pascoal VD, Lopes-Cendes I, Souza JR, Franchini KG. MEF2C silencing attenuates load-induced left ventricular hypertrophy by modulating mTOR/S6K pathway in mice. PLoS One., 2009, 29;4(12):e8472.

49. Pöling J., Gajawada P., Lörchner H., Polyakova V., Szibor M., Böttger T, Warnecke H., Kubin T, and Braun T.. The Janus face of OSM-mediated cardiomyocyte dedifferentiation during cardiac repair and disease. Cell Cycle 2012, 11:3, 439-445.
50. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. Science. 2011; 331: 1078-1080.
51. Romyantsev PP, Borisov A. DNA synthesis in myocytes from different myocardial compartments of young rats in norm, after experimental infarction and in vitro. Biomed Biochim Acta. 1987; 46: S610 –S615.
52. Sadoshima J e Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol. 1997; 59:551-571.
53. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik Tj, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. J. Biol. Chem. 1992, 25, 267(15):10551-60.
54. Sampaolesi, M, Blot, S, D'Antona, G, Granger, N, Tonlorenzi, R, Innocenzi, A. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. Nature 2006, 444: 574–579.
55. Schmid G, Pfitzer P. Mitoses and binucleated cells in perinatal human hearts. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1985; 48: 59 – 67.
56. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. Circulation. 1996; 1;94(11):2930-7.
57. Snove O. Jr and Rossi J J. Toxicity in mice expressing short hairpin RNAs gives new insight into RNAi. Genome Biology 2006, Volume 7, Issue 8, Article 231.
58. Soonpaa MH e Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. Circ Res. 1998; 83: 15–26.

59. Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1996; 271: H2183–H2189.
60. Steinhauser ML. e Lee RT. Regeneration of the heart. EMBO Mol Med. 2011; 3: 701–712.
61. Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kockska¨mper J et al. Chronic cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. Circulation 2009; 119:1241–1252.
62. Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz. JrW, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. Circ Res. 2003; 93: 140 – 147.
63. Ventura A, Meissner A, Dillon C. P., McManus M, Sharp P. A. Parijs., L. V, Jaenisch R, and Jacks T. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. PNAS, 2004, vol. 101; 28,10380–10385.
64. Wang Y, Tao Z, Chen S, Xiao B, Zhou X and Liu J. Application of combination of short hairpin RNA segments for silencing VEGF, TERT and Bcl-xl expression in laryngeal squamous carcinoma. Cancer Biology & Therapy, 2008,7:6, 896-901.
65. Xu J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH, Molkenin JD. Myocyte Enhancer Factors 2A and 2C Induce Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice. J Biol Chem. 2006. 281: 9152.
66. Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, and Yazaki Y. The molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999, 30,874:38-48.
67. Zhang X, Azhar G, Chai J, Sheridan P, Nagano K, Brown T, Yang J, Khrapko K, Borrás AM, Lawitts J, Misra RP, Wei JY. Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280(4): H1782–H1792.

68. Zhang Y, Li TS, Lee ST, Wawrowsky KA, Cheng K, Galang G, Malliaras K, Abraham MR, Wang C, Marban E. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. PLoS One. 2010; 5(9):e12559.

## ***8. APÊNDICE I***



Lista completa dos genes diferencialmente expressos (com variação mínima de  $\pm 2$  vezes e valor de  $p < 0,05$ ) entre AdMEF2C e Ad $\beta$ Gal, classificados em ordem alfabética.

Gene ID	GENE	Descrição	Diferença
10762740	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,038
10932917	PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	2,783
10850015	LOC100360676	a disintegrin and metallopeptidase domain 33 (predicted)-like	-2,075
10702660	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	-2,055
10762792	ACACB	acetyl-CoA carboxylase beta	-2,807
10731047	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	-2,217
10795736	ACTN2	actinin, alpha 2	-2,286
10841348	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	-2,256
10726371	ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	-3,008
10915933	ADAMTS15	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 15	-2,156
10869737	ADAMTSL1	ADAMTS-like 1	-2,717
10834670	ADAMTSL2	ADAMTS-like 2	-4,204
10833985	ADAMTSL4	ADAMTS-like 4	-2,094
10767771	ADORA1	adenosine A1 receptor	-2,253
10701825	ADAT2	adenosine deaminase, tRNA-specific 2	2,060
10817943	AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1	2,009
10709880	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3	-2,479
10870261	AK4	adenylate kinase 4	2,364
10906643	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	3,042
10857430	ARL6IP5	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5	-2,582
10775805	ART3	ADP-ribosyltransferase 3	-3,469
10866507	ART4	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	-2,376
10781207	ADRA1A	adrenergic, alpha-1A-, receptor	-4,360
10892330	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	-2,412
10745095	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate	-3,564
10884292	AGMO	alkylglycerol monooxygenase	-3,120
10905819	A4GALT	alpha 1,4-galactosyltransferase	-2,888
10804945	ALPK2	alpha-kinase 2	-4,201
10856888	ALMS1	Alstrom syndrome 1	2,087
10749681	ALYREF	Aly/REF export factor	2,008
10835654	ANGPTL2	angiopoietin-like 2	-3,593
10813969	ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse)	-2,079
10832715	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	-2,001
10937709	ASB11	ankyrin repeat and SOCS box containing 11	-3,072
10938488	ASB12	ankyrin repeat and SOCS box containing 12	-2,364
10891888	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box containing 2	-5,070
10820108	ANKRD32	ankyrin repeat domain 32	2,344
10848042	ANO3	anoctamin 3	3,808

10726408	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	2,266
10901538	LOC100310874	antisense RNA overlapping MCH	2,302
10779811	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	2,220
10921380	APOBEC2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	-2,560
10708011	AEN	apoptosis enhancing nuclease	2,100
10855701	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	-2,804
10864848	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	2,013
10772863	ARAP2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	2,448
10802023	ARSI	arylsulfatase family, member I	-2,589
10877540	LOC100361323	astrotactin 2-like	-2,173
10746583	ATP5G1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)	-2,461
10770996	ATP5I	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	-2,196
10903864	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	3,061
10736557	ATAD5	ATPase family, AAA domain containing 5	4,306
10758555	ATP2A2	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	-2,122
10939958	ATP11C	ATPase, class VI, type 11C	2,068
10831152	ATP6V1G2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2	-2,211
10769998	ATP1A2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 polypeptide	-2,439
10719728	ATP1A3 (includes EG:232975)	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide	-5,679
10769476	ATP1B1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	-2,100
10853347	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	-3,217
10866724	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	-2,890
10829082	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	-2,255
10855862	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	4,501
10734853	AURKB	aurora kinase B	2,709
10727683	BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1	2,008
10822864	BBS7	Bardet-Biedl syndrome 7	3,308
10857610	BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	-2,694
10721834	BAX	BCL2-associated X protein	2,148
10935890	BGN	biglycan	-2,234
10840138	BMP2	bone morphogenetic protein 2	2,059
10935038	BEX4	brain expressed, X-linked 4	2,875
10765293	Brp44	brain protein 44	-2,182
10718102	BRP44L	brain protein 44-like	-2,115
10928684	BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	2,412
10745850	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	3,944
10747640	BRCA1	breast cancer 1, early onset	2,888
10759805	BRCA2	breast cancer 2, early onset	3,462
10889965	BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	2,571
10828364	BRD2	bromodomain containing 2	2,045
10752758	BTG3	BTG family, member 3	2,482

10849737	BUB1 (includes EG:100307076)	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	2,716
10838647	BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	2,818
10909442	C1QTNF5	C1q and tumor necrosis factor related protein 5	-3,866
10808274	CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)	-2,675
10783607	CDH24	cadherin 24, type 2	2,214
10807525	CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	-3,036
10846762	CALCRL	calcitonin receptor-like	3,243
10912917	CACNA2D2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	-4,003
10845306	CACNB4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	2,443
10746327	CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	-4,802
10741422	CACNA1H	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	-2,185
10769959	CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	-2,241
10817881	CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	-2,238
10838745	CASC5	cancer susceptibility candidate 5	3,391
10888872	CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	2,760
10822242	CA3	carbonic anhydrase III, muscle specific	-2,703
10705034	CEACAM4	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4	-2,094
10906302	CPT1B	carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)	-2,482
10721563	CPT1C	carnitine palmitoyltransferase 1C	2,147
10791652	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	2,224
10868007	CASP8AP2	caspase 8 associated protein 2	2,620
10857663	CAV3	caveolin 3	-3,116
10887901	CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta	2,140
10812775	CD180	CD180 molecule	-2,074
10751091	CD200	CD200 molecule	-2,925
10923799	CD28	CD28 molecule	-2,151
10766869	CD34	CD34 molecule	-2,590
10777232	CD38	CD38 molecule	-3,491
10754176	CD80 (includes EG:12519)	CD80 molecule	3,528
10788125	CDKN2AIP	CDKN2A interacting protein	2,568
10802416	CIDEA	cell death-inducing DFFA-like effector a	-2,364
10803824	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	2,634
10755992	CDC45	cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae)	2,204
10738118	CDC6 (includes EG:23834)	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	4,334
10775231	CDC7 (includes EG:12545)	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae)	2,455
10784729	CDCA2	cell division cycle associated 2	2,688
10728440	CDCA5	cell division cycle associated 5	2,578
10836945	Cdca7	cell division cycle associated 7	3,787
10887802	CDCA7L	cell division cycle associated 7-like	2,125
10869695	CNTLN	centlein, centrosomal protein	2,246
10710179	CCP110	centriolar coiled coil protein 110kDa	2,595
10819145	CENPE	centromere protein E, 312kDa	2,324

10934891	CENPI	centromere protein I	3,248
10784074	CENPJ	centromere protein J	2,213
10812823	CENPK	centromere protein K	3,567
10765044	CENPL	centromere protein L	2,144
10810703	CENPT	centromere protein T	2,337
10776370	CEP135	centrosomal protein 135kDa	2,568
10895167	CEP290	centrosomal protein 290kDa	2,337
10788016	CEP44	centrosomal protein 44kDa	2,212
10715107	CEP55	centrosomal protein 55kDa	2,130
10914923	CEP57	centrosomal protein 57kDa	2,004
10702505	CEP72	centrosomal protein 72kDa	2,969
10799622	CDNF	cerebral dopamine neurotrophic factor	-2,036
10937725	FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	-3,409
10916110	CHEK1	checkpoint kinase 1	3,383
10736712	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-5,297
10924780	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	-2,237
10736702	CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-2,478
10858165	CXCL12 (includes EG:20315)	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-3,680
10925291	CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	-2,883
10764069	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	-2,226
10926642	CLIC5	chloride intracellular channel 5	-3,094
10854544	CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2	-2,544
10931498	CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	3,039
10750391	CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	2,021
10808536	CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	4,174
10769441	C1orf112	chromosome 1 open reading frame 112	3,483
10874860	C1orf170	chromosome 1 open reading frame 170	-2,928
10858160	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	-3,355
10726604	C10orf125	chromosome 10 open reading frame 125	-2,163
10790352	C10orf71	chromosome 10 open reading frame 71	-3,712
10723689	C11orf82	chromosome 11 open reading frame 82	4,750
10780491	C14orf21	chromosome 14 open reading frame 21	2,016
10884826	C14orf28	chromosome 14 open reading frame 28	3,063
10708099	C15orf42	chromosome 15 open reading frame 42	3,345
10917916	C15orf60	chromosome 15 open reading frame 60	-2,093
10738538	C17orf53	chromosome 17 open reading frame 53	2,033
10750688	C3orf26	chromosome 3 open reading frame 26	3,149
10818946	C4orf21	chromosome 4 open reading frame 21	2,423
10816014	C4orf46	chromosome 4 open reading frame 46	4,570
10813191	C5orf34	chromosome 5 open reading frame 34	3,900
10813510	C5orf42	chromosome 5 open reading frame 42	2,556
10926390	C6orf108	chromosome 6 open reading frame 108	2,927
10855472	C7orf46	chromosome 7 open reading frame 46	2,115
10794353	C9orf89	chromosome 9 open reading frame 89	-2,801
10918600	CGNL1	cingulin-like 1	-2,152
10872057	CLSPN	claspin	2,457
10782020	CLDN10	claudin 10	2,185
10818708	F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	-2,705
10788180	CCDC111	coiled-coil domain containing 111	2,172
10833470	CCDC138	coiled-coil domain containing 138	2,243

10775084	CCDC18	coiled-coil domain containing 18	2,001
10838373	CCDC34	coiled-coil domain containing 34	2,186
10818606	CCDC76	coiled-coil domain containing 76	-3,551
10907992	CCDC82	coiled-coil domain containing 82	2,102
10832482	CHCHD10	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	-2,249
10896263	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	-2,596
10737532	COL1A1 (includes EG:1277)	collagen, type I, alpha 1	-2,309
10923052	COL3A1	collagen, type III, alpha 1	-2,260
10929396	Col4a4	collagen, type IV, alpha 4	-2,403
10929766	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	-2,167
10750685	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	-2,756
10896558	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	-2,200
10829378	COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	-2,075
10897428	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-2,610
10931717	C3	complement component 3	-2,138
10821666	C7	complement component 7	-2,751
10861171	CTTNBP2	cortactin binding protein 2	3,242
10862677	CRHR2	corticotropin releasing hormone receptor 2	-2,498
10892265	CKB	creatine kinase, brain	-2,811
10704831	CKM	creatine kinase, muscle	-4,133
10865960	CLEC2A	C-type lectin domain family 2, member A	-2,343
10859108	Clec2d (includes others)	C-type lectin domain family 2, member d	-2,035
10822852	CCNA2	cyclin A2	2,864
10727260	CCND1	cyclin D1	-2,676
10721176	CCNE1	cyclin E1	5,017
10867614	CCNE2	cyclin E2	5,909
10741028	CCNF	cyclin F	2,652
10894857	CDK17	cyclin-dependent kinase 17	2,279
10899901	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	2,417
10722241	CSRP3	cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	-5,210
10887615	CRIP2	cysteine-rich protein 2	-3,499
10808377	Crispld2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	-2,174
10726114	COX6A2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	-2,095
10726669	Cox8b	cytochrome c oxidase, subunit VIIIb	-4,186
10887947	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-2,738
10805986	CIAPIN1	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	-2,285
10912908	CISH	cytokine inducible SH2-containing protein	-2,797
10710026	CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	4,098
10793675	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	-3,733
10785867	DZIP1	DAZ interacting protein 1	3,189
10860584	DBF4 (includes EG:10926)	DBF4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,316
10791604	DCTD	dCMP deaminase	3,058
10763428	DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6	2,460
10925839	DDX11/DDX12P	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11	3,200
10895075	DCN	decorin	-2,371

10936377	DOCK11	dedicator of cytokinesis 11	3,197
10903790	DSCC1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)	2,860
10836588	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	-2,152
10794453	DEK	DEK oncogene	2,453
10770728	DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)	4,033
10776026	DCK	deoxycytidine kinase	6,183
10765280	DPT	dermatopontin	-2,432
10924507	DES	desmin	-2,753
10785479	DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	2,049
10724967	DKK3	dickkopf 3 homolog (Xenopus laevis)	-2,039
10812456	DHFR	dihydrofolate reductase	3,072
10917245	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	-2,055
10812886	DIMT1	DIM1 dimethyladenosine transferase 1 homolog (S. cerevisiae)	2,200
10785565	DIS3	DIS3 mitotic control homolog (S. cerevisiae)	2,451
10782956	DLGAP5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	2,073
10915437	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	3,120
10892939	Prim1	DNA primase, p49 subunit	2,596
10829840	DNA2	DNA replication helicase 2 homolog (yeast)	3,567
10853110	DNAJC2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	2,637
10779162	DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	2,331
10778486	DDC	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	-3,197
10824091	DCLK2	doublecortin-like kinase 2	2,619
10753172	DONSON	downstream neighbor of SON	3,677
10851251	DSN1 (includes EG:100002916)	DSN1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	2,570
10732652	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-2,022
10792035	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	-3,109
10767503	DYRK3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	2,136
10856797	DYSF	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive)	-2,374
10872069	LOC100294508	dyslexia susceptibility 2-like	-2,532
10822258	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	2,214
10895344	E2F7	E2F transcription factor 7	3,317
10722247	E2F8	E2F transcription factor 8	4,378
10938540	EDA2R	ectodysplasin A2 receptor	2,167
10774638	EFEMP1	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-5,455
10889923	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)	-2,348
10848733	EHD4	EH-domain containing 4	-2,111
10757726	ELN	elastin	-2,602
10888953	EMILIN1	elastin microfibril interfacier 1	-2,250
10813152	EMB	embigin	2,202
10797857	EDN1	endothelin 1	-2,062
10862338	EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	2,704
10744081	EFNB3	ephrin-B3	-3,088
10822558	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	2,060
10746387	EPN3	epsin 3	-2,299

10715519	ERLIN1	ER lipid raft associated 1	2,223
10746416	EME1	essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)	2,753
10852464	EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	-2,246
10778579	ETAA1	Ewing tumor-associated antigen 1	2,061
10938719	ERCC6L	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like	3,648
10765996	EXO1 (includes EG:26909)	exonuclease 1	2,968
10788497	ERI1 (includes EG:361159)	exoribonuclease 1	2,562
10835396	EXOSC2	exosome component 2	2,411
10823184	EXOSC8	exosome component 8	2,895
10899499	ESPL1	extra spindle pole bodies homolog 1 (S. cerevisiae)	2,447
10765600	F11R	F11 receptor	-2,076
10744995	FAM101B	family with sequence similarity 101, member B	2,111
10714106	FAM111A	family with sequence similarity 111, member A	2,089
10939805	FAM122B	family with sequence similarity 122B	2,904
10936823	FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	2,469
10813949	FAM134B	family with sequence similarity 134, member B	-2,783
10843935	FAM163B	family with sequence similarity 163, member B	-2,240
10812656	FAM169A	family with sequence similarity 169, member A	3,107
10837310	FAM171B	family with sequence similarity 171, member B	2,058
10771360	FAM175A	family with sequence similarity 175, member A	2,231
10741629	FAM195A	family with sequence similarity 195, member A	-2,700
10844283	FAM78A	family with sequence similarity 78, member A	-2,108
10811768	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	3,001
10937691	FANCB	Fanconi anemia, complementation group B	3,059
10857838	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	3,230
10714890	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	2,122
10780393	FITM1	fat storage-inducing transmembrane protein 1	-2,787
10713857	FADS1	fatty acid desaturase 1	-3,166
10918342	Fbxl22	F-box and leucine-rich repeat protein 22	-6,164
10903896	FBXO32	F-box protein 32	-2,209
10751393	FBXO40	F-box protein 40	-4,468
10717779	FBXO5	F-box protein 5	2,521
10769788	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)	-2,027
10769771	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-2,130
10718111	LOC683722	Fgfr1 oncogene partner	2,157
10860231	FGL2	fibrinogen-like 2	-2,063
10804127	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	-3,899
10934569	FGF16	fibroblast growth factor 16	-2,879
10764050	FMOD	fibromodulin	-4,339
10723284	FSD2	fibronectin type III and SPRY domain containing 2	-5,124
10702913	FNDC1	fibronectin type III domain containing 1	-2,103
10857278	FBLN2	fibulin 2	-3,686
10891780	FBLN5	fibulin 5	-2,067
10881124	FBLIM1	filamin binding LIM protein 1	-2,208
10831940	FKBP5	FK506 binding protein 5	2,140
10733102	FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	-2,707
10927692	FHL2	four and a half LIM domains 2	-2,102
10706509	Fv1	Friend virus susceptibility 1	3,054
10853469	FZD1	frizzled family receptor 1	-2,466

10701817	FUCA2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma	-2,379
10720878	FXYD1	FXYD domain containing ion transport regulator 1	-2,518
10760663	GPR146	G protein-coupled receptor 146	-2,481
10866410	GPR19	G protein-coupled receptor 19	2,279
10809216	GPR56	G protein-coupled receptor 56	-3,504
10770807	GOS2	G0/G1switch 2	-2,624
10898382	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	2,914
10915843	GLB1L2	galactosidase, beta 1-like 2	-2,482
10742171	GABRA1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	2,672
10732824	GABRB2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2	2,499
10830189	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	-2,371
10852378	GATA5	GATA binding protein 5	-2,019
10889199	GEN1	Gen endonuclease homolog 1 (Drosophila)	3,241
10809122	GINS3	GINS complex subunit 3 (Psf3 homolog)	2,343
10789052	GINS4	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)	2,155
10835037	GLE1 (includes EG:2733)	GLE1 RNA export mediator homolog (yeast)	2,016
10771049	GLMN	glomulin, FKBP associated protein	2,086
10864121	GRIP2	glutamate receptor interacting protein 2	-2,267
10831849	GRM4	glutamate receptor, metabotropic 4	-2,362
10733680	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	-2,538
10926958	GSTA1	glutathione S-transferase alpha 1	-2,482
10825915	GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	-2,630
10855449	GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb	-2,081
10932459	GLOD5	glyoxalase domain containing 5	-2,999
10842657	Gnas (rat)	GNAS complex locus	-3,821
10826082	GPSM2	G-protein signaling modulator 2	2,210
10848281	GREM1	gremlin 1	-2,005
10918586	GCOM1	GRINL1A complex locus 1	-3,307
10741208	GFER	growth factor, augmenter of liver regeneration	2,053
10800122	Greb1l	growth regulation by estrogen in breast cancer-like	2,966
10729314	GDA	guanine deaminase	-2,654
10809428	GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	-3,007
10790002	GNL3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	2,242
10783868	GMPR2	guanosine monophosphate reductase 2	2,034
10726991	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)	-3,755
10909480	H2AFX	H2A histone family, member X	2,538
10728697	H3F3C	H3 histone, family 3C	2,646
10773553	HAUS3	HAUS augmin-like complex, subunit 3	2,738
10783572	HAUS4	HAUS augmin-like complex, subunit 4	2,393
10720745	LOC100362495	HAUS augmin-like complex, subunit 5	2,426
10799087	HEATR1	HEAT repeat containing 1	2,082
10761128	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	-2,349
10917290	HSPB2	heat shock 27kDa protein 2	-2,554
10821389	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3	-2,738
10873732	HSPB7	heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	-3,602
10892184	HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A	2,033

		member 1	
10862765	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	2,692
10914424	HHATL	hedgehog acyltransferase-like	-4,059
10715200	HELLS	helicase, lymphoid-specific	3,980
10741302	HN1L	hematological and neurological expressed 1-like	2,012
10717014	HEBP2	heme binding protein 2	2,001
10817547	HFE2	hemochromatosis type 2 (juvenile)	-2,583
10741756	HBA1/HBA2	hemoglobin, alpha 1	-5,620
10720829	Hamp	hepcidin antimicrobial peptide	-4,645
10863430	HK2	hexokinase 2	-2,922
10812015	Hmgb1 (includes EG:25459)	high mobility group box 1	4,847
10750876	HMGB2	high mobility group box 2	3,270
10880408	Hmgn2 (includes others)	high mobility group nucleosomal binding domain 2	2,044
10706792	HRC	histidine rich calcium binding protein	-3,000
10836815	HAT1	histone acetyltransferase 1	2,130
10795203	HIST1H1A	histone cluster 1, H1a	2,746
10798507	HIST1H2AD	histone cluster 1, H2ad	2,264
10795196	HIST1H2AG (includes others)	histone cluster 1, H2ag	2,298
10733938	HIST1H2BB	histone cluster 1, H2bb	2,527
10798475	HIST1H2BJ/HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk	3,267
10817539	HIST2H2BF	histone cluster 2, H2bf	2,317
10825144	HIST2H3C (includes others)	histone cluster 2, H3c	2,088
10795297	Hist2h4 (includes others)	histone cluster 2, H4	3,386
10741804	HMP19	HMP19 protein	-4,400
10711566	HTRA1	HtrA serine peptidase 1	-2,421
10812399	HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	-2,233
10722897	HAPLN3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	2,031
10770795	HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	-4,019
10752535	RGD1308065	hypothetical LOC287935	2,232
10818958	LOC100363957	hypothetical protein LOC100363957	3,977
10744597	LOC691995	hypothetical protein LOC691995	-2,209
10913186	IMPDH2	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2	2,343
10924593	INHA	inhibin, alpha	-5,130
10777958	Inpp5j	inositol polyphosphate 5-phosphatase J	-2,481
10894695	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-4,310
10928837	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	-2,353
10934394	ITGB1BP2	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	-3,253
10799684	ITGA8	integrin, alpha 8	-2,361
10782187	ITGBL1	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	-3,360
10712171	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	-2,078
10834109	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	-2,147
10922857	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	-5,151
10937292	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	-2,350
10714745	IL33	interleukin 33	-2,269
10753784	IFT57	intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)	2,225

10796838	IRX4	iroquois homeobox 4	-2,534
10915910	JAM3	junctional adhesion molecule 3	2,021
10836606	KBTBD10	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10	-2,199
10857423	KBTBD8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8	2,370
10911745	KLHL31	kelch-like 31 (Drosophila)	-2,040
10752205	KLHL6	kelch-like 6 (Drosophila)	-2,123
10747262	Krt19	keratin 19	-3,330
10907524	KRT8	keratin 8	-2,740
10911010	KIAA0101	KIAA0101	3,583
10868416	KIAA1045	KIAA1045	-2,644
10723383	KIAA1199	KIAA1199	-5,479
10914833	KIAA1377	KIAA1377	3,132
10753839	KIAA1524	KIAA1524	2,540
10915071	KIAA1731	KIAA1731	3,155
10938849	KIAA2022	KIAA2022	2,704
10715078	KIF11	kinesin family member 11	2,498
10914481	KIF15	kinesin family member 15	3,070
10838331	KIF18A	kinesin family member 18A	2,831
10747959	KIF18B	kinesin family member 18B	2,140
10714913	KIF20B	kinesin family member 20B	2,758
10918031	KIF23	kinesin family member 23	2,186
10876131	KIF24	kinesin family member 24	4,518
10878969	KIF2C	kinesin family member 2C	2,352
10934239	KIF4A	kinesin family member 4A	2,082
10821207	KIF2A	kinesin heavy chain member 2A	2,437
10761810	KNTC1	kinetochore associated 1	2,909
10895152	KITLG	KIT ligand	2,698
10781829	KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	2,226
10770396	LBR (includes EG:368360)	lamin B receptor	2,249
10801821	LMNB1	lamin B1	2,145
10766809	LAMB3	laminin, beta 3	-5,356
10891165	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	-3,015
10779673	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	-2,326
10745292	LGALS9B	lectin, galactoside-binding, soluble, 9B	-2,054
10754676	LMLN	leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)	2,003
10822269	LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	2,289
10895583	LRRCC10	leucine rich repeat containing 10	-5,101
10734045	LRRCC48	leucine rich repeat containing 48	-2,968
10706559	LRRCC4B	leucine rich repeat containing 4B	-2,346
10850170	LRRN4	leucine rich repeat neuronal 4	-2,766
10704312	LIG1	ligase I, DNA, ATP-dependent	2,222
10800696	LIMS2	LIM and senescent cell antigen-like domains 2	-3,383
10790490	LDB3	LIM domain binding 3	-3,192
10772807	LIN9	lin-9 homolog (C. elegans)	2,382
10889269	LPIN1	lipin 1	-2,154
10844331	LCN2	lipocalin 2	-2,870
10841693	LBP	lipopolysaccharide binding protein	-3,379
10936346	LONRF3	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	3,238
10908521	LDLR	low density lipoprotein receptor	-2,295
10895083	LUM	lumican	-2,240

10904528	LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	-3,619
10763604	LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	-2,467
10904590	Ly6c (includes others)	Ly6-C antigen	-3,368
10712477	LSP1 (includes EG:16985)	lymphocyte-specific protein 1	-2,137
10717571	LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	2,335
10902547	Lyz1/Lyz2	lysozyme 2	-2,183
10917883	LOXL1	lysyl oxidase-like 1	-2,470
10913043	MST1R	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	-2,250
10856043	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	2,226
10773481	MFSD10	major facilitator superfamily domain containing 10	2,184
10831099	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	3,507
10831620	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	-2,080
10708544	ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	-2,007
10890210	MDGA2	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2	3,694
10751948	Masp1	mannan-binding lectin serine peptidase 1	-2,352
10868643	MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	3,318
10866512	MGP	matrix Gla protein	-5,256
10907869	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	-3,222
10874728	MXRA8	matrix-remodelling associated 8	-2,254
10895600	MDM1 (includes EG:17245)	Mdm1 nuclear protein homolog (mouse)	2,164
10902564	MDM2	Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	2,027
10896605	MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) binding protein, 104kDa	3,064
10911419	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1	3,862
10824010	MND1 (includes EG:295160)	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)	2,675
10798199	MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	2,326
10741486	MSLN	mesothelin	-2,178
10931247	METRNL	meteorin, glial cell differentiation regulator-like	-2,214
10885382	MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	2,081
10707721	MCEE	methylmalonyl CoA epimerase	-2,716
10769301	METTL13	methyltransferase like 13	2,412
10858499	MFAP5	microfibrillar associated protein 5	-4,483
10734242	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	-2,988
10804710	mir-145	microRNA 145	-3,192
10745931	mir-21	microRNA 21	-2,405
10735887	mir-22	microRNA 22	-3,230
10854542	mir-490	microRNA 490	-3,247
10815308	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	-3,821
10769629	MGST3	microsomal glutathione S-transferase 3	-2,107
10709951	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	-2,002
10799999	MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-	2,989

		like	
10839135	MAP1A	microtubule-associated protein 1A	-2,141
10796347	MCM10 (includes EG:307126)	minichromosome maintenance complex component 10	4,262
10863950	MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	2,330
10926930	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	3,432
10752603	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	3,225
10806129	MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	4,099
10767338	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	3,276
10760824	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	3,103
10840112	MCM8	minichromosome maintenance complex component 8	2,339
10890190	MIS18BP1	MIS18 binding protein 1	2,090
10753017	MIS18A	MIS18 kinetochore protein homolog A ( <i>S. pombe</i> )	2,723
10821004	MRPS36	mitochondrial ribosomal protein S36	-2,038
10867979	MAP3K7 (includes EG:172842)	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	2,078
10791661	MLF1IP	MLF1 interacting protein	2,334
10867919	MMS22L	MMS22-like, DNA repair protein	2,303
10857130	MGLL	monoglyceride lipase	-2,337
10722566	MPHOSPH10	M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)	2,052
10880913	MRT04	mRNA turnover 4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,023
10868999	MURC	muscle-related coiled-coil protein	-5,185
10882812	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 ( <i>E. coli</i> )	2,002
10753533	MINA	MYC induced nuclear antigen	2,024
10743652	MYOCD	myocardin	-2,275
10820223	MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	4,225
10905153	MB	myoglobin	-2,566
10792621	MYOM2 (includes EG:17930)	myomesin (M-protein) 2, 165kDa	-7,836
10925991	MYOM1	myomesin 1, 185kDa	-2,358
10721361	MYBPC2	myosin binding protein C, fast type	-2,589
10818347	MYBPHL	myosin binding protein H-like	-2,709
10806461	MYLK3	myosin light chain kinase 3	-2,152
10911593	MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)	2,676
10783686	MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	-3,269
10783715	MYH7	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	-2,743
10928614	MYL1	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	-2,333
10762067	MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	-2,754
10778247	MYL7	myosin, light chain 7, regulatory	-4,514
10826534	MYOZ2	myozenin 2	-3,214
10810299	NDUFB7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa	-2,136
10847283	NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	-2,080
10778859	NDUFS5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5,	-2,402

		15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	
10821991	NPR3 (includes EG:18162)	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atriuretic peptide receptor C)	-2,286
10873895	Nppb	natriuretic peptide type B	-4,112
10930488	NDC80	NDC80 kinetochore complex component homolog (S. cerevisiae)	2,469
10783213	NDRG2	NDRG family member 2	-2,789
10851219	NDRG3	NDRG family member 3	2,380
10809100	NDRG4	NDRG family member 4	-2,381
10799848	NEBL	nebulette	-2,004
10788059	NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	3,610
10826148	NTNG1	netrin G1	2,231
10851667	NEURL2	neuralized homolog 2 (Drosophila)	-2,037
10889779	NOVA1	neuro-oncological ventral antigen 1	2,318
10855506	NPY	neuropeptide Y	-2,208
10806436	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	5,337
10808959	NRP1 (includes EG:18186)	neuropilin 1	-2,802
10908127	LOC690209/Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	2,230
10865630	NCAPD2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	2,400
10777182	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	3,385
10887719	NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	2,563
10858827	NOP2	NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)	2,663
10839857	NOP56	NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast)	2,173
10923670	NOP58	NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast)	2,574
10910015	NPAT	nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	2,196
10725778	NUPR1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1	-2,097
10904769	NRBP2	nuclear receptor binding protein 2	-2,036
10880267	NR0B2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	-2,868
10810539	NR3C2 (includes EG:110784)	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	-2,052
10770351	NVL	nuclear VCP-like	2,160
10715721	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	2,129
10797631	NOL8	nucleolar protein 8	3,918
10874245	NOL9	nucleolar protein 9	2,180
10902584	NUP107	nucleoporin 107kDa	2,124
10794511	NUP153	nucleoporin 153kDa	2,314
10813472	NUP155	nucleoporin 155kDa	2,516
10837648	NUP160	nucleoporin 160kDa	2,626
10837232	NUP35	nucleoporin 35kDa	2,005
10739568	NUP85 (includes EG:287830)	nucleoporin 85kDa	2,694
10799539	NUDT5	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5	2,038
10769657	NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	2,739
10743027	OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	-3,324
10820953	Ocln	occludin	2,039
10709687	OLFML1	olfactomedin-like 1	-2,339
10848589	OIP5	Opa interacting protein 5	2,260
10927041	OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1	2,283

10870791	ORC1 (includes EG:18392)	origin recognition complex, subunit 1	5,214
10809856	ORC6 (includes EG:23594)	origin recognition complex, subunit 6	2,450
10797648	OGN	osteoglycin	-2,489
10726836	PIDD	p53-induced death domain protein	2,923
10835257	PRRX2	paired related homeobox 2	-2,105
10725480	PALB2	partner and localizer of BRCA2	2,070
10929995	PASK	PAS domain containing serine/threonine kinase	2,641
10852694	PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	2,113
10877860	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	2,063
10822007	PDZD2	PDZ domain containing 2	-2,333
10815785	PTX3	pentraxin 3, long	-2,585
10821149	PPWD1	peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1	2,744
10898359	PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-3,249
10804678	PPARGC1B	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	-2,762
10709200	PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	-3,334
10818823	PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	2,075
10898968	PFKM	phosphofructokinase, muscle	-2,006
10881669	PGD	phosphogluconate dehydrogenase	2,052
10778220	PGAM2	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	-2,055
10830174	PLN	phospholamban	-2,464
10880872	PLA2G5	phospholipase A2, group V	-9,125
10713538	PLA2G16	phospholipase A2, group XVI	-2,002
10866459	PLBD1	phospholipase B domain containing 1	-2,006
10935204	PRPS1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	2,031
10743825	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase	3,134
10713382	PYGM	phosphorylase, glycogen, muscle	-3,049
10729096	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	2,322
10799558	PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	-2,159
10752576	PKP2 (includes EG:287925)	plakophilin 2	-2,148
10918981	PHIP	pleckstrin homology domain interacting protein	2,240
10710627	PLK1	polo-like kinase 1	2,000
10815120	PLK4	polo-like kinase 4	2,921
10919928	PARP3	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3	-2,123
10821511	PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	2,129
10730624	PCGF6	polycomb group ring finger 6	2,463
10896405	PKHD1L1	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1	-2,030
10774151	PKD1L1	polycystic kidney disease 1 like 1	-2,324
10820649	POLK	polymerase (DNA directed) kappa	3,629
10938346	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit	2,474
10778236	POLD2	polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit 50kDa	2,070
10890252	POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	3,755
10877443	POLE3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	2,609
10921751	POLH	polymerase (DNA directed), eta	2,840
10754260	POLQ	polymerase (DNA directed), theta	2,432

10723943	POLD3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	2,063
10839751	POLR1B	polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa	2,154
10820206	POLR3G	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)	2,262
10754179	POPDC2	popeye domain containing 2	-2,193
10722005	KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	-2,963
10915998	KCNJ5	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	-3,760
10753211	KCNE1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	-7,214
10712530	KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	-3,660
10853905	KCND2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	3,123
10852934	KCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	-2,650
10816807	PBXIP1	pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1	-2,275
10781733	Gm5465	predicted gene 5465	2,425
10927213	PRIM2	primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)	3,007
10795027	Prl8a9	prolactin family8, subfamily a, member 9	-3,753
10850131	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	2,170
10746022	PRR11	proline rich 11	2,326
10767763	PRELP	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	-4,844
10818358	PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil 1	2,613
10834005	PTGFR	prostaglandin F receptor (FP)	-4,365
10851947	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-3,382
10835817	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	-2,623
10775862	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	-2,208
10852144	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	-2,120
10723576	PRSS23	protease, serine, 23	-2,401
10783553	PRMT5	protein arginine methyltransferase 5	2,038
10704536	PRKD2	protein kinase D2	2,231
10909918	PPP2R1B	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, beta	2,101
10919574	PPP2R3A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', alpha	-2,035
10804225	PPP2R2B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	-3,262
10737068	PPM1D	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1D	3,079
10891530	PTPN21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21	2,154
10929128	PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	-2,082
10908990	PUS3	pseudouridylate synthase 3	2,090
10769812	Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	-2,447
10746469	PDK2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	-2,482
10790912	RAB3A	RAB3A, member RAS oncogene family	-2,125
10870847	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	-3,279
10813664	RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	2,071
10864572	RAD18	RAD18 homolog (S. cerevisiae)	3,713

10838762	RAD51	RAD51 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	3,351
10746042	RAD51C	RAD51 homolog C ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,391
10867642	RAD54B	RAD54 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	3,139
10871151	RAD54L	RAD54-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,518
10836169	RIF1 (includes EG:295602)	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	3,446
10864874	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	-2,495
10888404	RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	-3,299
10805646	RRAD	Ras-related associated with diabetes	-2,297
10905316	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	-2,537
10924326	RQCD1	RCD1 required for cell differentiation1 homolog ( <i>S. pombe</i> )	2,087
10882829	LOC100360342	rCG61559-like	2,160
10925365	RAMP1	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1	-2,771
10774115	RAMP3	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	-2,281
10900511	REEP6	receptor accessory protein 6	2,351
10870190	ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	-2,810
10856488	REG1A	regenerating islet-derived 1 alpha	-2,909
10863410	REG3A	regenerating islet-derived 3 alpha	-5,592
10856474	REG3G	regenerating islet-derived 3 gamma	-4,329
10753214	Rcan1	regulator of calcineurin 1	-2,266
10926658	RCAN2	regulator of calcineurin 2	-2,044
10885769	RGS6	regulator of G-protein signaling 6	-2,736
10911431	RFX7	regulatory factor X, 7	2,053
10823819	RXFP1	relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	-3,461
10761255	RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	2,433
10759752	RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	3,417
10751973	RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	2,836
10758883	RFC5	replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	2,503
10744918	RPA1	replication protein A1, 70kDa	2,359
10880361	RPA2	replication protein A2, 32kDa	2,288
10826764	RRH	retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog	2,154
10800173	RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	2,392
10851280	RBL1	retinoblastoma-like 1 (p107)	2,259
10912439	RBP1	retinol binding protein 1, cellular	-2,188
10927538	REV1 (includes EG:316344)	REV1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,002
10806198	LOC296778 (includes others)	RGD1562877	-2,257
10866526	ARHGDI1B	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	-2,489
10779832	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4	-2,271
10865321	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK-like family member B	4,861
10784805	Rpl7a	ribosomal protein L7a	-2,038
10921527	RPL7L1	ribosomal protein L7-like 1	2,006
10939093	RPS6KA6	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 6	2,398
10829176	RRP1B	ribosomal RNA processing 1 homolog B ( <i>S.</i>	2,080

		cerevisiae)	
10862178	2210010C04Rik	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	-2,162
10877669	2310002L09Rik	RIKEN cDNA 2310002L09 gene	-3,363
10719665	2310033E01Rik	RIKEN cDNA 2310033E01 gene	2,262
10797442	LOC100365086	RIKEN cDNA 4732471D19-like	2,465
10800442	RNF138	ring finger protein 138, E3 ubiquitin protein ligase	2,280
10881989	RNF207	ring finger protein 207	-4,515
10797774	RBM24	RNA binding motif protein 24	-2,164
10861429	RBM28	RNA binding motif protein 28	2,019
10853515	RBM48	RNA binding motif protein 48	2,485
10826216	RNPC3	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3	2,042
10795796	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	-3,586
10817057	S100A4	S100 calcium binding protein A4	-2,470
10817065	S100A6	S100 calcium binding protein A6	-3,245
10731795	SRL	sarcalumenin	-2,669
10784346	SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-2,004
10910047	Sln	sarcolipin	-6,395
10859641	SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	-3,496
10745595	SLFN13	schlafen family member 13	3,026
10871054	STIL	SCL/TAL1 interrupting locus	2,513
10786495	SFMBT1	Scm-like with four mbt domains 1	2,484
10734486	SCO1	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1 (yeast)	2,122
10792344	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	-4,234
10816144	SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	-4,236
10851581	Slpi (includes others)	secretory leukocyte peptidase inhibitor	-2,209
10765195	SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	-3,451
10759173	SELPLG	selectin P ligand	-2,443
10773716	SELM	selenoprotein M	-2,348
10814119	SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	-2,502
10743318	SHMT1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	2,991
10880095	SERINC2	serine incorporator 2	-3,902
10913538	SPINK8	serine peptidase inhibitor, Kazal type 8 (putative)	-2,498
10828823	SRSF3	serine/arginine-rich splicing factor 3	2,145
10935418	MST4	serine/threonine protein kinase MST4	2,114
10798135	SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	-2,052
10744939	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	-3,418
10815962	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	2,050
10927900	SDPR	serum deprivation response	-3,428
10863104	SMYD1	SET and MYND domain containing 1	-2,712
10937839	SCML2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	2,732
10773390	SH3TC1	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	-2,335
10802133	SH3TC2	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2	-2,127
10750479	SH3BGR (includes	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein	-2,568

	EG:445130)		
10921232	SGOL1	shugoshin-like 1 ( <i>S. pombe</i> )	2,792
10923385	SGOL2	shugoshin-like 2 ( <i>S. pombe</i> )	2,546
10821008	LOC681185	similar to centromere autoantigen H	2,109
10708065	LOC683179	similar to CG13745-PA	2,663
10772847	LOC685792 (includes others)	similar to Discs large homolog 5 (Placenta and prostate DLG) (Discs large protein P-dlg)	2,088
10904787	LOC686567	similar to Epiplakin	-2,298
10761446	LOC689257	similar to G protein-coupled receptor 133	-2,163
10795265	LOC680322	similar to Histone H2A type 1	2,148
10888608	LOC683626	similar to limb-bud and heart	-3,278
10844136	LOC499770	similar to LOC495800 protein	2,044
10935031	MGC109340	similar to Microsomal signal peptidase 23 kDa subunit (SPase 22 kDa subunit) (SPC22/23)	2,063
10784566	LOC691979	similar to N-acetyltransferase ESCO2 (Establishment of cohesion 1 homolog 2) (ECO1 homolog 2)	3,384
10918776	LOC681849	similar to Protein C6orf142 homolog	-2,967
10834046	LOC304239	similar to RalA binding protein 1	2,496
10930632	LOC501224	similar to RIKEN cDNA 2610042L04	2,602
10917998	RGD1566296	similar to RIKEN cDNA B230114P05	-2,573
10792751	MGC112830	similar to transcription factor	2,208
10800323	RGD1562997	similar to Transcription initiation factor TFIID 105 kDa subunit (TAFII-105)	2,233
10778108	LOC685322	similar to ubiquinol-cytochrome c reductase complex 7.2kDa protein isoform b	-2,229
10858083	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	2,254
10781966	SLITRK5	SLIT and NTRK-like family, member 5	2,159
10938060	SMPX	small muscle protein, X-linked	-3,225
10720907	SCN1B	sodium channel, voltage-gated, type I, beta subunit	-2,656
10909328	SCN3B	sodium channel, voltage-gated, type III, beta subunit	-3,438
10909621	SCN4B	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta subunit	-3,307
10920868	SCN5A	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit	-3,390
10729795	SLC16A12	solute carrier family 16, member 12 (monocarboxylic acid transporter 12)	-3,031
10744324	SLC2A4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	-2,538
10930790	SLC25A23	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	-2,978
10824611	SLC27A3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	2,105
10910038	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2	2,664
10920122	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	2,769
10779863	SLC39A2	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 2	-2,927
10908391	SLC44A2	solute carrier family 44, member 2	-2,001
10857314	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-2,870
10912614	SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	-3,514
10722818	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family,	-2,046

		member 3A1	
10867225	SLCO5A1	solute carrier organic anion transporter family, member 5A1	-2,402
10730065	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	-2,517
10791750	Sorbs2	sorbin and SH3 domain containing 2	-2,164
10889944	SNX6	sorting nexin 6	2,019
10771210	SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)	-2,513
10924517	SPEG	SPEG complex locus	-2,124
10871004	SPATA6	spermatogenesis associated 6	2,211
10933651	Sms/Sms-ps1	spermine synthase	2,079
10821840	SKP2 (includes EG:27401)	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase	3,317
10755672	SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)	2,186
10826235	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	-3,472
10929458	SPHKAP	SPHK1 interactor, AKAP domain containing	-2,153
10784172	SKA3	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	4,096
10818615	SASS6	spindle assembly 6 homolog (C. elegans)	3,002
10804993	SPIRE1	spire homolog 1 (Drosophila)	3,536
10710067	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein	-2,235
10904189	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	-2,089
10781273	STC1	stanniocalcin 1	-3,023
10860597	STEAP4	STEAP family member 4	-2,141
10730349	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	-2,368
10715546	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	-2,442
10716704	SAMD5	sterile alpha motif domain containing 5	-2,225
10791500	SCRG1	stimulator of chondrogenesis 1	2,055
10869050	SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	2,635
10716087	SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	2,099
10815888	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	2,320
10837393	SSRP1	structure specific recognition protein 1	2,484
10839320	Sqrdl	sulfide quinone reductase-like (yeast)	-2,184
10777108	SOD3	superoxide dismutase 3, extracellular	-2,115
10901996	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-2,134
10749372	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	-2,351
10783253	SUPT16H	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	2,453
10796405	SUV39H2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)	2,676
10706059	SBSN	suprabasin	-2,002
10939538	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	2,380
10799133	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	2,187
10779068	SYNPO2L	synaptopodin 2-like	-3,273
10715904	TAF5	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 100kDa	2,274
10798471	TAF5L	TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa	2,588
10918415	TLN2	talin 2	-2,251
10908089	TAF1D	TATA box binding protein (TBP)-associated factor,	2,575

		RNA polymerase I, D, 41kDa	
10701853	TXLNB	taxilin beta	-2,262
10810341	TBC1D9	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)	2,043
10874940	TERF1	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	2,791
10928855	TNS1	tensin 1	-2,392
10876688	TEX10	testis expressed 10	2,152
10847562	TSPAN18	tetraspanin 18	-2,149
10712349	TSPAN4	tetraspanin 4	-2,113
10800098	THOC1	THO complex 1	2,040
10718217	THBS2	thrombospondin 2	-2,300
10909407	THY1	Thy-1 cell surface antigen	-2,383
10930510	TYMS	thymidylate synthetase	2,740
10702519	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	3,303
10893035	TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)	3,814
10930531	TIPIN	TIMELESS interacting protein	2,393
10749484	TIMP2 (includes EG:21858)	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	-2,015
10846429	Ttn	titin	-2,074
10827484	TNNI3K	TNNI3 interacting kinase	-6,823
10905051	TONSL	tonsoku-like, DNA repair protein	2,399
10746976	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	2,144
10912640	TOPBP1	topoisomerase (DNA) II binding protein 1	2,974
10840910	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	2,109
10913078	TRAIP	TRAF interacting protein	2,387
10914385	TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	-2,751
10928307	TRAK2	trafficking protein, kinesin binding 2	-2,037
10772147	TECRL	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	-2,705
10752050	TRA2B	transformer 2 beta homolog (Drosophila)	2,205
10711364	TGFB11	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	-2,000
10797138	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	-2,010
10777770	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	2,208
10783880	TGM1	transglutaminase 1 (K polypeptide epidermal type I, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	-2,220
10851350	TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	-2,759
10823278	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	-2,191
10708327	TM6SF1	transmembrane 6 superfamily member 1	-2,547
10855416	TMEM176A	transmembrane protein 176A	-3,792
10862415	TMEM176B	transmembrane protein 176B	-3,128
10922923	TMEM182	transmembrane protein 182	-3,007
10790651	TMEM38A	transmembrane protein 38A	-2,247
10881253	TMEM51	transmembrane protein 51	-2,021
10904151	TMEM71	transmembrane protein 71	-2,615
10743961	TMEM88	transmembrane protein 88	2,115
10800426	TTR	transthyretin	-2,144
10867447	TGS1	trimethylguanosine synthase 1	2,007
10888852	TRIM54	tripartite motif containing 54	-2,978

10814415	TRIM55	tripartite motif containing 55	-2,865
10823591	TRIM59	tripartite motif containing 59	2,597
10711260	TRIM72	tripartite motif containing 72	-6,087
10755604	TRMT2A	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,013
10899073	TROAP	trophinin associated protein (tastin)	2,016
10868817	TMOD1	tropomodulin 1	-2,093
10764233	TNNI1	troponin I type 1 (skeletal, slow)	-3,355
10704062	TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)	-2,775
10764244	TNNT2 (includes EG:21956)	troponin T type 2 (cardiac)	-2,081
10723822	TSKU	tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	-2,641
10911947	TTK	TTK protein kinase	2,540
10924392	TTL4	tubulin tyrosine ligase-like family, member 4	2,460
10830369	TUBE1	tubulin, epsilon 1	2,547
10880074	TINAGL1	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	-2,644
10765096	TNFSF18	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	-4,329
10781321	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	2,095
10841339	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	-3,331
10705874	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	-2,329
10870098	USP1	ubiquitin specific peptidase 1	2,532
10720965	UBA2	ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	2,120
10931457	UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	2,729
10764495	B3GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	-4,041
10724950	GALNTL4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4	-2,587
10745074	UNC119	unc-119 homolog ( <i>C. elegans</i> )	-2,140
10736764	UNC45B	unc-45 homolog B ( <i>C. elegans</i> )	-3,285
10734967	LOC284023	uncharacterized LOC284023	2,087
10774171	UPP1	uridine phosphorylase 1	-2,877
10761101	UPK3B	uroplakin 3B	-4,297
10820748	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,023
10717295	VNN1	vanin 1	-3,210
10921772	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	-2,054
10863215	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	-2,784
10889213	VSNL1	visinin-like 1	-2,683
10841974	MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	3,715
10808348	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	-3,920
10855637	WIPF3	WAS/WASL interacting protein family, member 3	-2,061
10782927	WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	4,221
10928446	WDR12	WD repeat domain 12	2,146
10888662	WDR43	WD repeat domain 43	2,005
10896935	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	-2,220
10842043	WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	-2,160
10777731	WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	2,608
10882933	XDH	xanthine dehydrogenase	-2,307

10920977	XIRP1	xin actin-binding repeat containing 1	-2,205
10836504	XIRP2	xin actin-binding repeat containing 2	-4,673
10772564	YIPF7	Yip1 domain family, member 7	-3,455
10793495	ZNF367	zinc finger protein 367	3
10721475	ZNF473	zinc finger protein 473	2,125
10934720	ZNF711	zinc finger protein 711	2,022
10939570	ZDHHC9	zinc finger, DHHC-type containing 9	-2,036
10918191	ZWILCH	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	3,352

## ***9. ANEXO I***



## MetaCore™ Quick Reference

### User Data

**Networks**

- Up-regulated (+)**  
Object has user data with positive value
- Down-regulated (-)**  
Object has user data with negative value
- Mixed-signal (+/-)**  
Object has user data with both positive and negative values

**Maps**

### Interactions Between Objects

**Effects**

- Positive / activation
- Negative / inhibition
- Unspecified

**Mechanisms**

**PHYSICAL INTERACTIONS**

- B** Binding  
Compound binds the enzyme or receptor
- C** Cleavage  
Cleavage of a protein at a specific site yielding discrete peptide fragments. Proteolytic cleavage can be derived out by both enzymes and compounds
- CM** Covalent modifications  
Protein activity regulation by covalent binding of a small chemical group to the substrate of an active site.
- +P** Phosphorylation  
Protein activity is altered via addition of a phosphate group
- P** Dephosphorylation  
Protein activity is altered via removal of a phosphate group
- T** Transformation  
Protein activity regulation by binding & hydrolysis of GTP
- Tr** Transport  
Transport of a protein or a compound between organelles
- Z** Catalysis  
Catalysis of an enzymatic reaction
- Tr** Transcription regulation  
Physical binding of a transcription factor to target gene's promoter
- M** MicroRNA binding  
Regulation of gene expression by binding of microRNA to target mRNA.

**FUNCTIONAL INTERACTIONS**

- EE** Influence on expression  
Compound(s) change the expression level of target genes indirectly, for instance by binding to upstream receptors
- Co** Competition  
Protein activity regulation by competition at the substrate binding site
- ?** Unspecified interactions  
Mechanism is unknown or/and effect is indirect
- PE** Drug-Drug interactions. Pharmacological effect  
Drugs change pharmacological effects of other drugs, for instance by competing for drug metabolism enzymes or organic transporters
- TE** Drug-Drug interactions. Toxic effect  
Drugs change toxic effects of other drugs, for instance by competing for drug metabolism enzymes or organic transporters

**LOGICAL RELATIONS**

- GR** Group relation  
Object belongs to a generic group of related objects
- CS** Complex subunit  
Protein is a subunit of a protein complex
- SR** Similarity relation  
Chemically similar compounds with chosen Tanimoto similarity score

### Links on Networks

- Incoming interaction  
When the mouse is over object, yellow line indicates direction to object
- Outgoing interaction  
Cyan line indicates direction FROM the object

**Interactions from custom list (MetaLink™)**

- Interaction is in the network  
Interaction is represented by a thin solid line and is highlighted in blue
- Interaction is in the base, but not in network  
Interaction is highlighted in yellow
- Interaction is in the network  
Interaction is highlighted in magenta

**Canonical pathways**

- Canonical pathway  
The line is highlighted in a thick cyan or magenta line

### Links on Maps

- Disrupts in disease
- Weakens in disease
- Emerges in disease
- Enhances in disease
- Species specific interactions

### Network Objects

**Enzymes**

**KINASE**

- Generic kinase
- Protein kinase
- Lipid kinase

**PHOSPHATASE**

- Generic phosphatase
- Protein phosphatase
- Lipid phosphatase

**PHOSPHOLIPASE**

- Generic phospholipase

**PROTEASE**

- Generic protease
- Metalloprotease

**GTPases**

- G-alpha
- RAS - superfamily

**Generic Classes**

- Receptor ligand
- Transcription factor
- Protein
- Compound
- Predicted metabolite or user's structure
- Inorganic ion
- Reaction
- DNA
- RNA
- Generic binding protein

**G protein Adaptor/Regulators**

- G beta/gamma
- Regulators (GDI, GAP, GEF, etc.)

**Channels/Transporters**

- Generic channel
- Ligand-gated ion channel
- Voltage-gated ion channel
- Transporter

**Receptors**

- Generic
- GPCR
- Receptors with kinase activity

**Groups of Objects**

- A complex or a group  
Proteins physically connected into a complex or related as a family
- Logical association  
Proteins linked by logical relations or physical interactions
- Custom association  
Group of collapsed objects chosen by user

### Objects on Maps

**Localization**

- Mitochondria
- EPR
- Golgi
- Nucleus
- Lysosome
- Peroxisome
- Plasma membrane

**Other Map Objects**

- Note
- Normal process
- Pathological process
- Normal map
- Disease map
- Species specific object
- Path start

(888) 592-3124  
(858) 756-7996  
[www.genego.com](http://www.genego.com)