ANA HELENA MACEDO PEREIRA

INFLUÊNCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO MEF2C NA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA INDUZIDA POR SOBRECARGA PRESSÓRICA EM CAMUNDONGOS

CAMPINAS - SP
2008

ANA HELENA MACEDO PEREIRA

INFLUÊNCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO MEF2C NA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA INDUZIDA POR SOBRECARGA PRESSÓRICA EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS - SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P414i

Pereira, Ana Helena Macedo
Influência do fator de transcrição MEF2C na hipertrofia miocárdica induzida por sobrecarga pressórica em camundongos / Ana Helena Macedo Pereira. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Kleber Gomes Franchini
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertrofia ventricular esquerda. 2. Fator de transcrição. 3. Silenciamento gênico. 4. RNA – interferência. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Influence of the transcription factor MEF2C in cardiac hypertrophy induced by overload pressure in mice

Keywords:
- Hypertrophy, Left Ventricular
- Transcription factor
- siRNA
- RNA Interference

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior
Profa. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta

Data da defesa: 05 - 08 - 2008

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

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

Membros:
Professor (a) Doutor (a) **Wilson Nadruz Júnior**
Professor (a) Doutor (a) **Beatriz Martins Tavares Murta**
Professor (a) Doutor (a) **Kleber Gomes Franchini**

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

Data: 05/08/2008

DEDICATÓRIA

A meus pais Erasmo e Maria Helena,
aos meus irmãos Francisco e João
e ao Álisson

Agradeço ao meu orientador, Prof. Kleber Gomes Franchini pela oportunidade e confiança no meu trabalho, pelos exemplos e pela amizade. Seus ensinamentos vão muito além da ciência. Muito obrigada.

Agradeço a todos dos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, pelo acolhimento, companheirismo e ensinamentos. Obrigada a Álisson Campos Cardoso, Carolina Clemente, Maria Carolina Guido, Thaís Holtz Theizen, Silvana Rocco, Aline Mara dos Santos, Talita Marin, Rodrigo Marin, Jackeline Lima, Ana Paula Dalla, Ana Carolina Deckman, Carla Judice, Antônio Calixto, Michel Vaz, Thaís Tornatore, Cinira Soledade, Michele Bueno, Mônica Siqueira e Márcia Story, que de alguma maneira foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Genética Molecular, Dra. Íscia Lopes-Cendes, principalmente Vinícius Pascoal pela ajuda nos experimentos.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada,
Caminhando e semeando, no fim
terás o que colher."

(Cora Coralina)

Lista de Abreviaturas xvii
Lista de Tabelas xxi
Lista de Figuras xxii
Resumo xxxi
Abstract xxxv

1. INTRODUÇÃO 39
1.1 Hipertrofia e insuficiência cardíacas - Aspectos fisiopatológicos e moleculares 41
1.2. Importância do Fator de Transcrição MEF2 43

2. OBJETIVOS 49
2.1 Objetivos específicos 51

3. MATERIAL E MÉTODOS 53
3.1 Reagentes, Anticorpos e materais cirúrgicos 55
3.2 Algorítimo para desenho das moléculas interferentes 56
3.3 Síntese de siRNAMEF2C in vitro 57
3.4 Cultura de Células 58
3.5 Ensaio de diferenciação celular 59
3.6 Transfecção das células C2C12 59
3.7 Extrato total de células 60
3.8 Microscopia confocal 60
3.9 Silenciamento do MEF2C no coração de camundongos 61
3.10 Modelo de sobrecarga pressórica crônica em camundongos 62
3.11 Ecocardiografia 62
3.12 Hemodinâmica 63
3.13 Gravimetria do ventrículo esquerdo 63
3.14 Histologia e Morfometria do ventrículo esquerdo 64
3.14.1 Hipertrofia cardíaca 65
3.14.2 Fibrose miocárdica 65
3.14.3 Infiltrado inflamatório 65
3.15 Western blotting 65
3.16 Análise da expressão do transcrito de MEF2C por PCR em tempo real 67

3.17 Análise de ATP, ADP, AMP e ADO por Cromatografia Líquida 69
3.17.1 Tratamento das amostras de tecidos 69
3.17.2 Condições Cromatográficas 69
3.17.3 Derivatização dos nucleosídeos purínicos 70
3.18 Análise estatística 71

4. RESULTADOS 73

4.1 Padronização e otimização do silenciamento gênico de MEF2C 75
4.1.1 Desenho de primers e análise da seqüência do siRNAMEF2C 75
4.2 Silenciamento em células C2C12 80
4.3 Silenciamento do MEF2C no ventrículo esquerdo de camundongos 82
4.3.1 Ensaios dose-resposta 82
4.3.2 Análise da especificidade do silenciamento - siGFP 83
4.3.3 Confirmação do silenciamento por Real Time-PCR 84
4.3.4 Análise da especificidade do silenciamento – MEF2A 86
4.3.5 Confirmação do silenciamento em cardiomiócito isolado 88
4.3.6 Análise do efeito do siRNAMEF2C na expressão de MEF2C em outros órgãos 90
4.3.7 Análise da especificidade do silenciamento – “Off-targets” 91
4.3.8 Curso temporal do silenciamento 91
4.4 Efeito do silenciamento gênico do MEF2C na estrutura e função do ventrículo esquerdo 94
4.4.1 Avaliação da expressão de MEF2 durante a sobrecarga pressórica 94
4.4.2 Efeito do tratamento com siRNAMEF2C na hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica crônica 95
4.4.3 Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo 95
4.4.4 Avaliação hemodinâmica do ventrículo esquerdo 98
4.4.5 Avaliação gravimétrica do ventrículo esquerdo 100
4.4.6 Morfometria do ventrículo esquerdo 101
4.4.6.1 Hipertrofia dos miócitos 102
4.4.6.2 Fibrose miocárdica 103
4.4.6.3 Infiltrado inflamatório 104
4.4.7 Avaliação de marcadores moleculares de hipertrofia 105
4.4.7.1 Avaliação do marcador □-MHC 105
4.5 Efeito do silenciamento do MEF2C nos níveis de ATP/ADP do miocárdio 107

5. DISCUSSÃO 109

6. CONCLUSÃO 121

7. REFERÊNCIAS BLIBLIOGRÁFICAS 125

ANEXO 133

ANP - Fator natriurético atrial

ADP - Adenosina di-fosfato

ADO - Adenosina

AMP - Adenosina mono-fosfato

As - Fita anti-senso

ATP - Adenosina tri-fosfato

β-MHC - cadeia β pesada de miosina

CAM quinase II - proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina. do tipo II

CoAo - Coarctação da aorta

CT - Controle

DDVE - diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE - diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

DMEM - Meio *Eagle* modificado por Dulbelcco

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DTT - 1,4-Dithiothreitol

ECA - enzima conversora da angiotensina

EDTA - Ácido etilenodiamino teracetico

EMSA - Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética

ERK5 - Extracellular signal-regulated kinase

FAK - focal adhesion kinase

FS - fração de encurtamento

GAPDH - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFP - Proteína Fluorescente verde

HDAC-II - Desacetilases de histonas da classe II

JNK - Jun N-terminal kinase

MADS Box - Agamous-Deficiens-Serum response factor

MAP - Mitogen-activated protein

MEF2 - Myocyte enhancer factor 2

P38 - p38-MAPK (subfamília das MAPKs)

pb - pares de base

PBS - Salina tamponada com fosfato

PCR - Reação de polimerização em cadeia

PMSF - Phenylmethylsulphonyl fluoride

PSC - Pressões sistólicas avaliadas na artéria carótida esquerda

PSF - Pressões sistólicas avaliadas na artéria femoral esquerda

RISC - multiprotein RNA induced-silencing complex

RNA - Ácido ribonucléico

RNAi - Ácido ribonucléico de interferência

S - Fita senso

SERCA - *Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium atpase*

SDS - dodecil sulfato de sódio

SHP2 - Src homology 2-containing tyrosine phosphatase

siRNA^{MEF2C} - Small interference RNA para o MEF2C

T7 - promotor que só é reconhecido pela RNA polimerase do bacteriófago T7

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

Tris-HCl - tampão tris-hidroximetilaminometano e ácido clorídrico

Tabela 1: Avaliação ecocardiográfica de ventrículos esquerdos de camundongos submetidos à coarctação da aorta. 97

Tabela 2: Avaliação hemodinâmica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta. 99

Tabela 3: Avaliação gravimétrica do ventrículo esquerdo. Porcentagem de hipertrofia apresentada pelos animais coarctados em relação aos shams. 100

Tabela 4: Análise morfométrica do ventrículo esquerdo 102

Figura 1: Representação estrutural dos fatores de transcrição da família MEF2. 45

Figura 2: Esquema representativo das vias de ativação envolvendo o MEF2. 47

Figura 3: Esquema representativo da síntese de siRNAMEF2C. 57

Figura 4: Gel representativo da quantificação das fitas de RNA. T7= promotor da RNA polimerase III (padrão de quantificação), MEF2Cs = fita de RNA MEF2C senso, MEF2C as = fita de RNA MEF2C antisenso. 58

Figura 5: Ilustração do local onde foi realizada a coarctação da aorta e os aparelhos utilizados para a obtenção da avaliação hemodinâmica. 63

Figura 6: Linha de tendência obtida após construção do gráfico a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado. 68

Figura 7 - Reação de derivatização de adenil purina pelo 2-cloroacetaldeído [1]. 71

Figura 8: Cromatograma representativo de um extrato de coração contendo os derivados purínicos ATP, ADP, AMP e ADO. 71

Figura 9: Seqüência alvo do siRNA do gene MEF2C (em vermelho) comparando com a mesma região dos outros genes da mesma família 77

Figura 10: Resposta gerada pelo programa Strand Analisys/Blast um dos siRNA do gene MEF2C. A) Posição do siRNA na sequência do RNAm; B) Nome da sequência no NCBI com a qual houve identidade da sequência alvo; C) Local na sequência depositada no NCBI; D) Número de nucleotídeos com identidade, ou seja, que existe complemetariedade entre o siRNA e o depósito EST no NCBI. 79

Figura 11: Otimização do silenciamento em cultura de células C2C12. A - Microscopia confocal de células C2C12 no 1º dia de diferenciação. Em verde marcação do fator de transcrição MEF2C com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com FITC. Em vermelho marcação com faloidina e a sobreposição das duas marcações (aumento 400X). B - Microscopia confocal de células C2C12 no 5º dia de diferenciação. Em verde marcação do fator de transcrição MEF2C com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com FITC. Em vermelho marcação com faloidina e a sobreposição das duas marcações (aumento 1000X). C – Exemplo representativo de blot realizado com homogenatos de células C2C12 e anticorpos anti-MEF2, nos 5 dias de diferenciação. São apresentados os valores percentuais médios da quantidade de proteína marcada com MEF2 (n=3). D – Ensaio de padronização do silenciamento em células C2C12. Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de células que receberam 300 ηg de siRNAMEF2C (n=2). 81

Figura 12: Ensaio dose-resposta para siRNAMEF2C. Exemplo representativo de blot realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2, para a dose de 15μg de siRNAMEF2C em 300μl de PBS e 30μg de siRNAMEF2C em 600μl de PBS. Valores percentuais médios da quantidade de proteína marcada com MEF2. CT: n=4, 15□g: n=5, 30□g: n=3, * P <0,05 vs CT PBS..... 83

Figura 13: Teste de especificidade do silenciamento do gene da MEF2C utilizando siRNAGFP. Exemplos representativos de blott realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti- MEF2. Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com anti-MEF2 em miocárdio de camundondos. CT e siGFP (n=5). 84

Figura 14: Gráfico representativo da curva de validação dos primers MEF2C e GAPDH. 85

Figura 15: Confirmação do silenciamento por Real Time PCR. Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm dos grupos de animais que receberam siRNA ou veículo PBS e sofreram sobrecarga pressórica ou apenas cirurgia fictícia. * P <0,05 vs Sham PBS, # P <0,05 vs CoAo PBS (n = 6). 86

Figura 16: Gráfico representativo da curva de Validação dos primers MEF2A e GAPDH. 87

Figura 17: Controle de especificidade do siRNAMEF2C. Gráfico representativo da quantificação de RNAm de MEF2A dos grupos de animais que receberam siRNAMEF2C ou veículo PBS e sofreram sobrecarga pressórica (CoAo) ou apenas cirurgia fictícia (Sham), 3 dias após a injeção (n = 6). 88

Figura 18: Silenciamento em cardiomiócito isolado. A: Microscopia de luz convencional representando os cardiomiócitos a fresco no momento da extração (400X).B: Gel de comassie blue representando o padrão de bandas de proteínas como controle de aplição no gel de poliacrilamida. C: Confirmação do silenciamento em cardiomiócito isolado. Exemplo representativo de blott realizado com homogenatos de cardiomiócito isolado de coração de camundongos e anticorpo anti-MEF2. * P < 0,05 vs CT PBS (n = 3). 89

Figura 19: Expressão relativa de RNAm do MEF2C em pulmão e rim de animais tratados com siRNAMEF2C ou veículo PBS após 24 horas. * P <0,05 vs CT PBS Pulmão, (n=3). 90

Figura 20: Teste de especificidade do silenciamento do gene da MEF2C utilizando “off-targets”. Exemplo representativo de blott realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2. Valores apresentados como médias e erros padrões (n=3). 91

Figura 21: Curso temporal do silenciamento do MEF2C no período de 1 até 15 dias. Exemplo representativo de blott realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2. Valores apresentados com valores percentuais médios e erros padrões médios. * P <0,05 vs CT (n=3). 92

Figura 22: Representação gráfica da quantificação relativa de RNAm do gene MEF2C em animais que receberam 30μg de siRNAMEF2C , após 7 e 15 dias de injeção do siRNA (n = 3). 93

Figura 23: Expressão de MEF2 em ventrículo esquerdo de camundongos Swiss submetido à coarctação da aorta. A: Exemplos representativos de blott realizados com homogenatos de coração de camundongos e anticorpos anti-MEF2. CT: controle cirurgia fictícia (sham), CoAo: 1 e 2 semanas de coarctação da aorta. B: Gel comassie representando o padrão de bandas de proteínas como controle de aplição no gel de poliacrilamida..... 94

Figura 24: Avaliação ecocardiográfica de ventrículos esquerdos de camundongos submetidos à coarctação da aorta ou sham. sham= animais submetidos a cirurgia fictícia, CoAo = Coarctação transversa da aorta; mm= milímetros, % = porcentagem da fração de encurtamento. A: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. B: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. C: Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo. D: Porcentagem da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. * P <0,05 vs sham, # P <0,05 vs CoAoPBS 7dias, † P <0,05 vs CoAoPBS 15dias. 98

Figura 25: Avaliação hemodinâmica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta. A: Pressão arterial sistólica da carótida em camundongos controles (Sham) e de camundogos coarctados por 7 e 15 dias (CoAo). B: Gradiente de pressão arterial – diferença entre a pressão arterial sistólica na carótida e a pressão arterial sistólica na femoral de animais sham e coarctados por 7 e 15 dias. 100

Figura 26: Avaliação do peso relativo do ventrículo esquerdo. Gráficos representativos da razão peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal de camundongos submetidos à coarctação da aorta ou sham, e com ou sem tratamneto com siRNAMEF2C, por 7 e 15 dias e controle (sham). * P <0,05 comparado ao grupo sham; # P <0,05 comparado ao grupo CoAoPBS 7 dias, n = 12..... 101

Figura 27: Morfometria do ventrículo esquerdo – Hipertrofia dos mióciotos. P <0,05 vs. CT. I: Gráfico representativo da quantificação dos diâmetros dos miócitos. II: Imagens representativas da presença de hipertrofia dos miócitos - Hematoxilina-Eosina (1000X). A: Miócitos proveniente de camundongo sham. B: Miócitos proveniente de camundongo coarctado 15 dias PBS. C: Miócitos proveniente de camundongo coarctado 15 dias siRNAMEF2C. 103

Figura 28: Morfometria do ventrículo esquerdo - Fibrose miocárdica. % = fração de volume de colágeno, * P <0,05 vs CT, # P <0,05 vs CoAo PBS e si 7dias, † P <0,05 vs CoAo si 15 dias. I: Gráfico representativo da quantificação da fração de volume de colágeno. II: Fotomicrográficas do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo corado com Tricômio de Masson sob aumento de 200x. A presença de fibrose (fibras colágenas coradas em azul) é evidente nos animais coarctados PBS com seguimento de 15 dias. A: Miocárdio proveniente de camundongo sham.. B: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 15 dias PBS. C: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 15 dias siRNAMEF2C. 104

Figura 29: Morfometria do ventrículo esquerdo - Inflitrado inflamatório. * P <0,05 vs CT. I: Gráfico representativo da quantificação do infiltrado inflamatório. II: Imagens representativas da presença de infiltrado inflamatório - Hematoxilina-Eosina. A: Miocárdio proveniente de camundongo sham. B: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 7 dias PBS. C: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 7 dias siRNAMEF2C. 105

Figura 30: Avaliação da expressão de □-MHC no miocárdio em animais tratados de modo preventivo com siRNAMEF2C ou PBS e coarctados por 1, 7 e 15 dias. Valores arbitrários médios de produtos de RT-PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para □-MHC normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para GAPDH. * P <0,05 vs CT (n = 3). 106

Figura 31: Cromatograma representativo dos picos de detecção de ATP, ADP AMP e ADO. 107

Figura 32: Gráfico representativo da relação ATP/ADT de animais tratados com PBS ou 30µg de siRNAMEF2C que sofreram a coarctação da aorta ou não (sham). * P<0,05 vs Sham PBS e sham si, # P <0,05 vs CoAo PBS (n = 6). 108

Figura 33: Gráfico representativo da relação ATP/ADP de animais tratados com PBS ou 30µg de siRNAMEF2C que sofreram a coarctação da aorta ou sham. Grupo coarctado 7dias e grupo coarctado 15 dias, (n = 6). 108

Doenças do coração são freqüentemente associadas à hipertrofia miocárdica. Estímulos mecânicos induzem o crescimento hipertrófico e contribuem para a degeneração e morte dos miócitos cardíacos. Dentre os fatores de transcrição envolvidos no processo de hipertrofia miocárdica, estão os da família MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2), que é composto por 4 membros, MEF2A, B, C e D. O MEF2C é descrito como o principal transcrito no miocárdio. Tanto a deleção quanto a hiperexpressão de seu gene causam efeitos deletérios na formação e na função do músculo cardíaco. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que o MEF2 é ativado por estiramento de cardiomiócitos e influencia a expressão de genes do programa hipertrófico. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do silenciamento gênico do MEF2C nas alterações estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica. Para isso, utilizamos a técnica de interferência por RNA para o MEF2C. A padronização constituiu de: 1) avaliação do silenciamento do MEF2C em cultura de células C2C12 e no ventrículo esquerdo de camundongos Swiss; 2) determinação da dose necessária de siRNA para o silenciamento da expressão protéica do MEF2C; 3) determinação do curso temporal do silenciamento; 4) avaliação dos efeitos do tratamento com molécula irrelevante de siRNA direcionada para a proteína exógena GFP; 5) avaliação da especificidade do silenciamento (*off-targets*) pela análise do RNAm para o MEF2A e das proteínas FAK, GAPDH, JNK1/2 e SHP2; 6) avaliação do silenciamento em outros órgãos, como pulmão e rim; 7) avaliação da efetividade do silenciamento de MEF2C em miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos. O tratamento com siRNA diminuiu a expressão protéica do MEF2 em 70% das células C2C12. Também verificamos que o tratamento com siRNA silenciou 85% da expressão protéica e do RNAm do MEF2C no ventrículo esquerdo de camundongos em até 4 dias de seguimento. Não foi verificada alteração na expressão de RNAm para o MEF2A e das proteínas FAK, GAPDH, JNK1/2 e SHP2. O silenciamento foi efetivo no pulmão e nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos tratado com

siRNA^{MEF2C}. Após a padronização do silenciamento, procedeu-se à determinação dos efeitos do silenciamento na estrutura e na função do ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica. Para isso, realizaram-se as análises ecocardiográfica, hemodinâmica, gravimétrica e morfométrica do ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à coarctação da aorta com seguimento de 15 dias. Demonstramos que o tratamento com siRNA^{MEF2C} atenuou a hipertrofia cardíaca nos animais coarctados. Esta conclusão foi baseada em dados de ecocardiografia que revelaram menor espessura da parede posterior (30% menor) e por gravimetria que revelou atenuação de aproximadamente 45% da massa do ventrículo esquerdo. Apesar de ter havido aumento do gradiente sistólico nos animais coarctados, a pressão arterial sistêmica não apresentou diferença estatisticamente significativa com o tratamento do siRNA^{MEF2C}. Morfologicamente, o siRNA atenuou a fração de colágeno no ventrículo esquerdo de camundongos coarctado com 15 dias de seguimento. Entretanto, o diâmetro dos miócitos e o infiltrado de células inflamatórias foram comparáveis dentre os grupos. Somente os animais coarctados por 24 horas tiveram maior expressão de β-MHC, e quando tratados com siRNA^{MEF2C} apresentaram menor razão ATP/ADP. Dessa forma, esses dados sugerem que o MEF2C regula múltiplos aspectos da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica tais como a expressão de genes sarcoméricos e genes envolvidos na adaptação metabólica do músculo cardíaco.

Palavras chave: Hipertrofia ventricular esquerda, Fator de transcrição, Silenciamento gênico, RNA – interferência.

Heart diseases are frequently associated with myocardial hypertrophy. Mechanical stimuli can trigger hypertrophic growth as well as degeneration and death of the cardiac myocytes. The MEF2C family of transcription factors plays a role in the process of myocardial hypertrophy. It is composed by 4 members, MEF2A, B, C and D, and the MEF2C is the main transcript in the heart. Both the deletion and overexpression of *mef2c* induce deleterious effects in the formation and function of the heart. Previous studies of the our laboratory has shown that the transcription factor MEF2C is activated by mechanical stretch in cardiomyocytes and regulates the expression of genes related to cardiac hypertrophy. This study was performed to address the effects of MEF2C gene silencing in the structural and functional changes of the left ventricle (LV) induced by pressure overload in mice. To silence MEF2C, it was employed the RNA interference technique, specific siRNA target to MEF2C was administered through the mice jugular vein. To optimize the MEF2C knockdown, it was necessary to 1) analyze the MEF2C silencing in C2C12 cells, 2) determine the dose required to induce significant MEF2C silencing in LV of mice, 3) determine the time course of gene silencing, 4) assess the effects of the treatment with irrelevant siRNA target to the protein GFP, 5) evaluate the specificity of gene silencing by $siRNA^{MEF2C}$ through the expression analysis of the transcription factor MEF2A and other non-related proteins, 6) analyze of the MEF2C knockdown in other organs, 7) determine the effectiveness of the MEF2C silencing in cardiac myocytes harverst from the LV of mice treated systemically with $siRNA^{MEF2C}$. Treatment with 100ng/mL of $siRNA^{MEF2C}$ induced MEF2C silencing (~70%) in C2C12 cells. Intrajugular delivery of 30µg of $siRNA^{MEF2C}$ in mice induced the reduction in the mRNA and protein levels (~85%) until 4 days after the injection. The treatment with $siRNA^{MEF2C}$ did not affect the expression of MEF2A and other non-related proteins. The MEF2C silencing was effective in lung and in cardiac myocytes harverst from LV of mice treated with $siRNA^{MEF2C}$. After knockdown optimization, echocardiographic, hemodynamic, gravimetric and morphometric analysis was performed to address the effects of MEF2C silencing in the structure and function of the LV from 15 days aortic-banded mice. Myocardial MEF2C silencing attenuated the load-induced hypertrophy in

banded mice, indicated by the reductions of the wall thickness and the mass (~45%) of the LV. An increase in transconstriction gradient was observed in banded mice but the systemic blood pressure did not shown a significant statistically difference with the siRNA^{MEF2C} treatment. The siRNA^{MEF2C} injection reduced the collagen fraction in the LV of 15 days banded mice. On the other hand, the myocytes diameter and inflammatory cells level were comparable between the groups. Only the 24 hours banded mice showed an increase in the β-MHC expression and the treatment with siRNA^{MEF2C} reduced ATP/ADP ratio. This study indicate that MEF2C regulates many aspects of the cardiac hypertrophy induced by pressure overload, like the expression of sarcomeric genes and genes involved in metabolic adaptation of the heart muscle.

Keywords: Hypertrophy, Left Ventricular, Transcription factor, siRNA, RNA Interference

1. Introdução

1.1 Hipertrofia e insuficiência cardíacas - Aspectos fisiopatológicos e moleculares

A hipertrofia cardíaca constitui-se um fator de risco para outras doenças cardiovasculares, como eventos isquêmicos, infartos e arritmias cardíacas. A hipertrofia cardíaca é causada principalmente por hipertensão arterial, e segundo dados de 1995 o Brasil possuía 30 milhões de pacientes hipertensos, com pressão sistólica acima de 140 mmHg e/ou diastólica acima de 90 mmHg, sendo que aproximadamente metade destes pacientes desconheciam a doença. As conseqüências da hipertensão arterial atingiram mais de 1 milhão de internações em 2005 e 27,4% de todos os óbitos em 2003 (NOBRE & LIMA, 2000).

A falência cardíaca é uma síndrome clínica que consiste em grupo de sinais e sintomas principalmente relacionados a congestão de fluidos e diminuição da função ventricular, sendo a hipertrofia patológica um aumento anormal da massa cardíaca, aumento do tamanho dos cardiomiócitos e aumento de fibroblastos (RITTER O, et al, 2003). Sendo assim, as doenças cardiovasculares representam um importante objeto de estudo para o entendimento de possíveis mecanismos de desenvolvimento.

Sobrecargas hemodinâmicas prolongadas são causa e também conseqüência da maior parte das doenças que acometem o coração (KATZ AM, 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.

A hipertrofia cardíaca é um mecanismo compensatório inicial ao aumento de tensão na parede do músculo cardíaco. Entretanto, a hipertrofia também é considerada um fator de risco para morbi-mortalidade cardiovascular, uma vez que predispõe eventos isquêmicos, arritmias e desenvolvimento de insuficiência cardíaca em uma fase mais tardia.

Existem dois tipos de hipertrofia: a hipertrofia excêntrica e a hipertrofia concêntrica. A hipertrofia excêntrica ocorre em casos ou modelos 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.

Já a hipertrofia concêntrica ocorre em casos ou modelos 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 ventricular. Essas modificações estruturais que acometem o ventrículo esquerdo durante a sobrecarga de pressão podem ser explicadas pela Lei de Laplace (Tensão = Pressão x Raio / 2 x Espessura de parede), pois o aumento da espessura de parede e diminuição do raio da cavidade ventricular promove a normalização da tensão de parede e a compensação da sobrecarga hemodinâmica aguda. Entretanto, tardiamente a hipertrofia miocárdica não consegue mais compensar esse aumento da tensão de parede e alterações estruturais como a degeneração e morte celular, a presença de infiltrado inflamatório e de fibrose miocárdica, a ativação de metaloproteinases que contribui para a dilatação das câmaras cardíacas, entre outras, culminam em deterioração estrutural e funcional do ventrículo esquerdo causando a insuficiência e falência cardíacas (MILL JG & VASSALLO DV 2001).

Contudo, as vias moleculares que traduzem o estímulo mecânico em bioquímico e os mecanismos celulares envolvidos na regulação gênica que determina o fenótipo hipertrófico em resposta a sobrecarga de pressão no ventrículo esquerdo e em resposta a sobrecarga hemodinâmica 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 JJ & CHIEN KR, 1999).

O crescimento hipertrófico envolve o controle da expressão gênica em vários níveis: iniciação da transcrição, elongação e tradução do transcrito (HUNTER JJ & CHIEN KR 1999; MOLKENTIN JD & DORN GW, 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 KR et al., 1990; SADOSHIMA J et al 1992). Posteriormente, os genes fetais como a cadeia pesada da β-miosina, fator natriurético atrial e β-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 J & IZUMO S, 1997; YAMAZAKI T 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.

Há também uma depressão variável e tardia da expressão de outros genes que modificam a homeostase iônica intracelular. Por exemplo, pode-se citar a depressão da cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2), com aumento variável na expressão do trocador Na^{+}/Ca^{++} e receptores das vias parassimpática e simpática que são atenuados (ex.: receptor b1-adrenérgico, receptores muscarínicos e aumento na razão dos receptores de Angiotensina II AT1/AT2) (HUNTER JJ & CHIEN KR 1999). Dessa forma, acredita-se que o controle transcricional da expressão gênica tem função central na determinação das características fenotípicas da hipertrofia cardíaca. Portanto, o entendimento do crescimento e da hipertrofia do miocárdio requer informação detalhada da regulação da expressão gênica do coração.

1.2. Importância do Fator de Transcrição MEF2

O aumento do volume cardíaco durante a hipertrofia tem como uma das características o aumento na massa dos miócitos cardíacos. Esse processo é representado pela ativação da maioria dos genes celular, controlado por um evento transcricional complexo e ativado por fatores de transcrição. (OLSON EM & SCHNEIDER MD, 2003).

O músculo esquelético, assim como o cardíaco, também possui o mesmo sistema de regulação fenotípica, sendo que durante o processo hipertrófico também ocorre a ativação do programa gênico. Assim, a formação de diferentes tipos de fibras musculares depende da expressão diferencial de proteínas que controlam a contratilidade e o metabolismo específicos de cada tipo de fibra (SCHIAFFINO S & REGGIANI C, 1996).

Vários são os fatores que controlam a miogênese do músculo cardíaco, entre eles temos: myf-5, MyoD, miogenina e o MEF-2 (myocyte enhancer factor-2 family). Os fatores MEF2 pertencem à família MADS Box (MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor) foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a seqüências 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 BL & OLSON EM, 1998).

A Figura 1 representa os domínios de ligação ao DNA 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 seqüência (C/T)TA(A/T)$_4$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 co-fatores. A região C-terminal dos fatores MEF2 é menos conservada, embora MEF2A, MEF2C e MEF2D apresentem considerável homologia na região C-terminal, indicando assim, a evolução de um gene ancestral comum (JANSON CG, et al., 2001). Já a região C-terminal apresenta o domínio de transativação. 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.

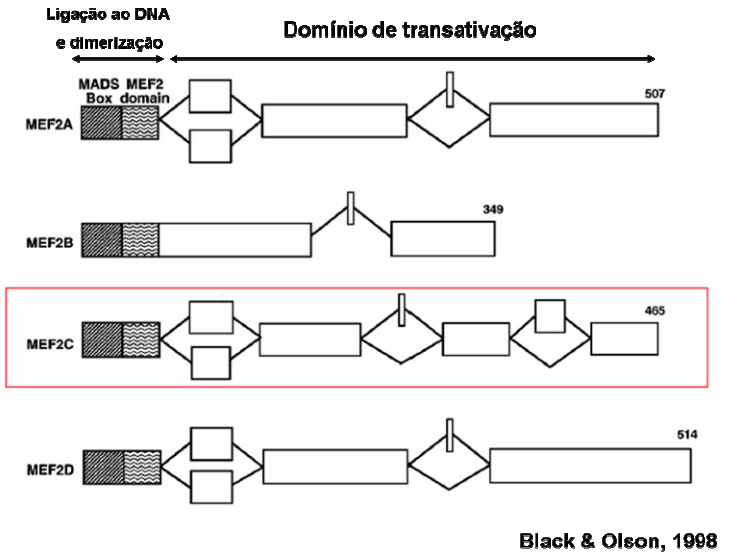


Figura 1: Representação estrutural dos fatores de transcrição da família MEF2.

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 JD & MARKHAM B, 1993; NADRUZ W, 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 (KOLODZIEJCZYK SM, et al, 1999).

Por outro lado, a deleção de *Mef2c* também provoca alterações da expressão gênica no coração. Estudo demonstra que este gene tem um papel crítico no desenvolvimento cardíaco, uma vez que sua deleção promove a morte de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento fetal, devido à parada do desenvolvimento do tubo cardíaco (LIN Q, et al. 1997). Camundongos que expressam um dominante negativo de MEF2C no coração também morrem durante o desenvolvimento pós-natal, sendo encontrado hipodesenvolvimento cardíaco (KOLODZIEJCZYK SM et al, 1999). Camundongos com deleção de *Mef2a* morrem subitamente durante o período perinatal com dilatação do ventrículo direito, desorganização miofibrilar e anormalidades na estrutura de mitocôndrias (NAYA FJ, et al., 2002).

Mais recentemente, também foi demonstrado que a hiper-expressão de MEF2A e MEF2C está associada ao aparecimento espontâneo de cardiomiopatia dilatada em camundongos (XU J et al., 2006). A sobrecarga mecânica por coarctação da aorta produziu efeitos ainda mais deletérios na estrutura e função cardíaca. Os animais geneticamente modificados apresentam alterações na expressão e atividade dos fatores MEF2 durante o desenvolvimento pós-natal. Portanto, a resposta dos corações frente ao estímulo mecânico, não permite a obtenção de dados conclusivos sobre a participação destes fatores na resposta hipertrófica a estímulos mecânicos.

Os fatores da família MEF2 podem ser ativados por cálcio, calcineurina, MAP quinases p38, ERK5 e CaM quinase. Além disso, os fatores MEF2 também são regulados pela associação com desacetilases 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 J & OLSON EN, 2006) (Figura 2).

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que o MEF2 se associa com uma proteína regulatória, Ki-1/57, no núcleo de cardiomiócitos. Essa associação apresenta-se de forma basal em animais controles, porém, quando os animais são submetidos à sobrecarga pressórica essa associação apresenta-se diminuída. Esse dado indica um possível mecanismo regulatório negativo da proteína Ki-1/57 durante a sobrecarga pressórica, uma vez que essa interação pode estar envolvida na atividade do MEF2 durante a hipertrofia cardíaca (KOBARG C, et al, 2005).

Também 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 uma proteína da família MAPK, a ERK5. Essa interação apresentava-se significativamente aumentada em corações de animais submetidos a sobrecarga pressórica. Acompanhando o mesmo aumento da interação ERK5-MEF2, o fator de transcrição MEF2 apresenta um aumento de fosforilação durante o mesmo período experimental.

Paralelamente com esses resultados, experimentos com gene repórter demonstraram que o MEF2 coordena a expressão e ativação de genes de resposta imediata, *c-jun*, em miocárdio submetido a coarctação da aorta (NADRUZ W, et al. 2003). Assim, estes dados indicam a importância dos fatores MEF2 na coordenação do controle gênico em resposta a estímulos mecânicos.

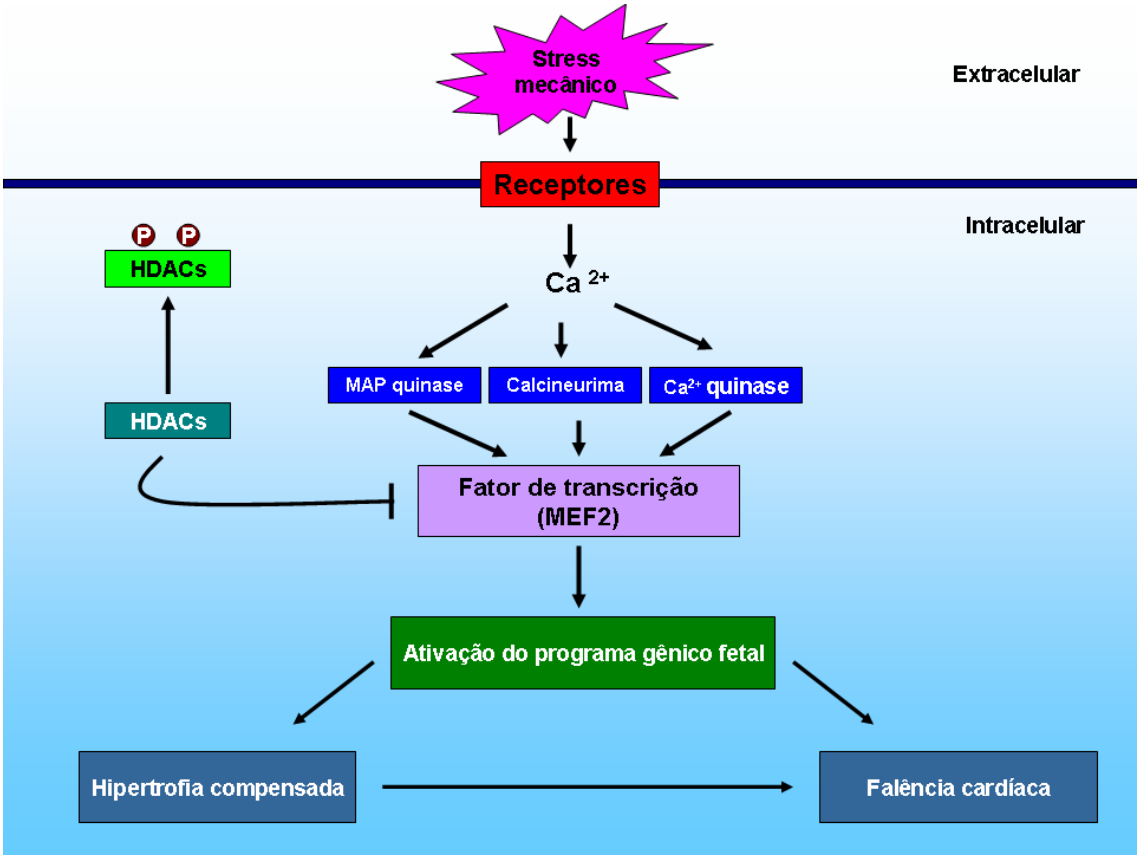


Figura 2: Esquema representativo das vias de ativação envolvendo o MEF2.

Sendo assim, a nossa hipótese é de que o MEF2C influencia de modo crítico a expressão de genes que estão diretamente envolvidos na hipertrofia cardíaca. E que o seu silenciamento poderia estar interferindo no modo como o miocárdio responde a estímulos mecânicos como no caso da coarctação da aorta.

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo é avaliar a importância do fator de transcrição MEF2C no processo de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica em camundongos.

2.1 Objetivos específicos

1. Padronizar e otimizar o silenciamento gênico do fator de transcrição MEF2C em cultura de células C2C12 e corações de camundongos.

2. Determinar os efeitos do silenciamento gênico do fator de transcrição MEF2C na estrutura e na função do ventrículo esquerdo de camundongos submetidos a sobrecarga pressórica crônica.

3. Determinar os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos do silenciamento gênicos do fator de transcrição MEF2C no ventrículo esquerdo de camundongos submetidos a sobrecarga pressórica.

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes, Anticorpos e materais cirúrgicos

Reagentes: Trizol.

Anticorpos: anti-MEF (C-21) policlonal da Santa Cruz Biotechnology, anti-GAPDH policlonal da Santa Cruz Biotechnology.

Anestésicos: Xilazina 2% (Farmabase), Cloridrato de Cetamina 50mg/ml e Tiopental sódico 1,0g ambos do Laboratório Cristália.

Kits: SuperSinal west Pico Chemiluminescent Substrate, Ampliscribe T7 high yield transcription da Epicentre.

Oligonucleotideos: da IDT:

- T7- Seqüência: 5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'
- MEF2C 1187s- Seqüência: 5' CCC ACC UGG CAG CAA GAA CAC 3'
- MEF2C 1187as- Seqüência: 5' GUU CUU GCU GCC AGG UGG GAU 3'
- GFPs- Seqüência: 5' GTG TCT TGT AGT TCC CGT CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'
- GFPas- Sequência: 5' ATG ACG GGA ACT ACA AGA CAC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'

Primers e reagentes para PCR em tempo real: Applied Biosystems

MEF2C: MN 00600423_M1

MEF2A: MN 00488969_M1

Controle endógeno: GAPDH (VIC/MGB)

Materiais cirúrgicos: agulha 26G (diâmetro de 0,45mm), fio cirúrgico de algodão 8.0, fio de sutura 3.0 de algodão (Polycot* 3-0 Ethicon, Jonhson & Jonhson, Brasil), tubo de polietileno PE50 (Clay Adams; USA).

3.2 Algorítimo para desenho das moléculas interferentes

Trabalhos na literatura apresentam siRNAs com graus de eficiência bem diferentes. O desenho de siRNAs não se limita única e exclusivamente a escolher uma seqüência qualquer de 21nt baseado na seqüência do RNA mensageiro. Alguns dos vários parâmetros que determinam essa eficiência são conhecidos. A identificação de alvos para RNAi foi baseada no protocolo de Thomas Tuschl (ELBASHIR et al., 2001; http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html) com algumas modificações.

Resumidamente, as seqüências foram selecionadas com as seguintes características:

- o alvo deve estar localizado na região codificante, excluindo os 100 primeiros nucletídeos após o *start codon* e os 100 últimos nucleotídeos antes do *stop codon*. Isso devido à possibilidade dessas regiões estarem complexadas a proteínas regulatórias da tradução, dificultando o acesso do siRNA. *5'* e *3' untranslated regions* (UTR) geralmente não são consideradas devido à mesma questão.
- conteúdo de GC entre 30% e 55%
- sabe-se que siRNA que apresentam TT nas extremidade 3' são mais estáveis
- análise da energia livre das duas extremidades dos siRNAs, realizado pelo programa Strand Analysis desenvolvido em nosso laboratório.
- não apresentar estruturas secundárias (hairpins, duplexes ou loops). Essa análise foi conduzida no programa *Gene Runner*, subprograma *oligo*, sempre trabalhando com o formato *RNA* da seqüência.
- não apresentar identidade com nenhuma outra seqüência no genoma, sendo que mesmo identidades baixas como 16/21 não foram aceitas.

A busca por essa identidade foi realizada através do programa Strand Analysis to Blast (http://lgm.fcm.unicamp.br:9001/cgi-bin/SA/SA2blast.cgi) (PEREIRA T, *et al,* 2007) usando sempre o oligo antisenso do siRNA (que foi a molécula funcional) contra o banco EST (seqüências expressas) do organismo em questão. Sabe-se que a

clivagem do RNA alvo por *slicer* ocorre quando há um pareamento perfeito do oligo anti-senso com o alvo (100% de complementaridade). A existência de apenas um *mismatch* reduz drasticamente a atividade de *slicer* (menos de 10%), prejudicando o silenciamento gênico, mesmo assim o padrão de busca aceitara seqüências que possuam complementaridade menor que 16 nucleotídeos com outro gene evitando assim silenciamento inespecífico.

3.3 Síntese de siRNA^{MEF2C} in vitro

Para a síntese de siRNA de MEF2C foi utilizado um molde de DNA correspondente a posição 1187 no mRNA do gene do MEF (*AK009139*). Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma seqüência irrelevante (GFP), sem homologia com genes de camundongo. A síntese *in vitro* do siRNA^{MEF2C} e siRNA^{GFP} foi realizada sob domínio do promotor da RNA polimerase III T7, utilizando o kit Ampliscribe T7 high yield transcription (Epicentre), de acordo com o protocolo do fabricante e representado na Figura 2. 1μL dos RNAs e 1 e 3μg de T7, utilizados como padrão para a quantificação, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), e visualizados com luz UV.

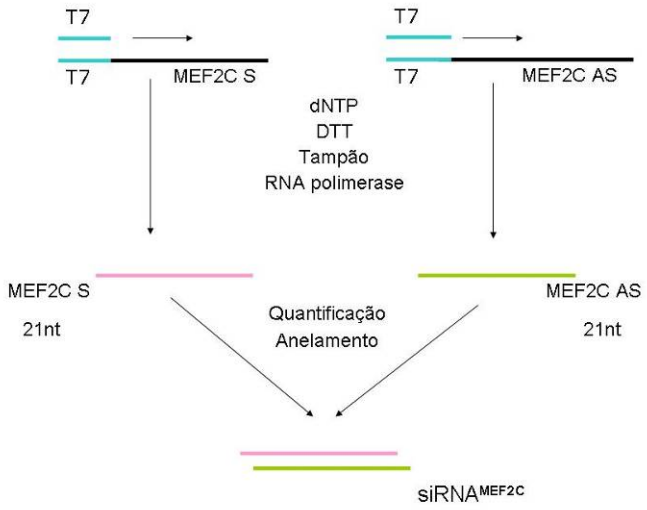
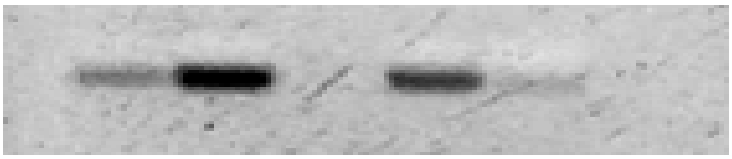


Figura 3: Esquema representativo da síntese de siRNA^{MEF2C}.

As bandas dos géis foram quantificadas por densitometria óptica através do software *Image J* e a concentração dos RNAs foi determinada com base no padrão de T7, como mostra o gel representativo da Figura 3.



1μg T7 3μg T7 MEF2Cs MEF2Cas

Figura 4: Gel representativo da quantificação das fitas de RNA. T7= promotor da RNA polimerase III (padrão de quantificação), MEF2Cs = fita de RNA MEF2C senso, MEF2C as = fita de RNA MEF2C antisenso.

Após quantificação, quantidades iguais (μg) das fitas senso e antisenso foram incubadas por 5 minutos a 95°C e aneladas por resfriamento lento durante a noite. O siRNA resultante foi armazenado a -20°C (CLEMENTE CF, et al, 2007).

3.4 Cultura de Células

Para testar o silenciamento do MEF2C em cultura de células, foi utilizada a linhagem celular C2C12 (ATCC#CRL-1772) proveniente de músculo esquelético de camundongo C3H.

As células C2C12 foram cultivadas em meio de cultura composto por DMEM (Nutricell) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Nutricell), em garrafas de cultura mantidas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C.

Ao atingirem 70% de confluência, para não perder a população mioblástica pela confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm. O pellet foi homogeneizado em meio de cultura, as células foram contadas, com o corante de

exclusão azul de tripan, em câmara de Newbauer e plaqueadas na densidade de 10^4 céls/mL (CLEMENTE CF, et al, 2005).

3.5 Ensaio de diferenciação celular

Caracteristicamente as células C2C12 diferenciam-se em miotubos quando cultivadas em meio pobre de fatores de crescimento. No presente estudo, as células C2C12 foram plaqueadas em placas de cultivo de células, na densidade de 10^4 céls/mL. Após 48 horas de plaqueamento, quando os mioblastos atingiram 70% de confluência, o meio de cultura foi aspirado. As células foram lavadas com PBS 0,2M e adicionou-se meio de diferenciação (MD) composto por DMEM (Nutricell) acrescido de 2% soro eqüino (Gibco) e 0,5% de penicilina-steptomicina (Nutricell). As células foram mantidas neste meio de diferenciação por períodos variando de 8 horas a 6 dias. O meio de cultura foi trocado diariamente (CLEMENTE CF, et al, 2005).

3.6 Transfecção das células C2C12

As células foram plaqueadas em placas de cultivo de células, na densidade de 10^4 céls/mL. Após 3 dias de plaqueamento, as células foram transfectadas. Para cada placa de 5 cm de diâmetro, foram incubados 300ηg (100ηg/ml de meio) de siRNA, 2μL de Lipofectamina (Invitrogen) e completados para 50μL com OPTMEM sem antibiótico por 45 minutos, em temperatura ambiente, para a formação dos complexos siRNA-lipossoma. Durante este período, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 1000μL de DMEM sem antibiótico em cada placa. Após a incubação, adicionaram-se 50μL da solução de transfecção em cada poço, diretamente sobre as células, e a transfecção prosseguiu por 2 horas, de acordo com Dodds, Dunckley, Naujoks et al., 1998; em estufa de CO_2 a 37°C. Para finalizar a transfecção, foram adicionados 2mL de DMEM acrescido de 15% SFB e 1,5% de antibióticos em cada poço, sem a remoção da solução de transfecção.

3.7 Extrato total de células

Para avaliar o nível de expressão de MEF2, foi realizado a extração de proteínas. Para isso, as células foram lavadas com PBS e removidas das placas de cultivo 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; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) e em seguida foram lisadas pela passagem em agulha ultra fina. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4ºC, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi 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 Laemmli (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 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

3.8 Microscopia confocal

Para avaliar a localização e distribuição do MEF2C nas células C2C12 foi realizada a microsopia confocal. As células C2C12 foram lavadas rapidamente com PBS 0,2M e fixadas diretamente nas placas de cultivo Flexercell em 1mL de solução de paraformaldeído 4% e sacarose 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após o período de fixação, foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M a temperatura ambiente. Para o bloqueio das reações inespecíficas e permeabilização das células, as lamínulas foram incubadas em solução de leite desnatado 3% e triton 0,6% por 1 hora. Logo após foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M a temperatura ambiente.

Para a imunomarcação, as células foram incubadas com anticorpos primários policlonais anti-MEF (Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:50; em solução de leite desnatado 1%, durante toda a noite a 4°C. Após 24 horas, as lamínulas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M a temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit biotinilado (Amersham), na diluição 1:250, em solução

de leite desnatado 1% por 2 horas. Após este período, as lamínulas foram relavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M e incubadas com faloidina conjugada a rodamina (Sigma) na diluição 1:500 em PBS, por 45 minutos.

Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,2M e montadas em lâminas de vidro utilizando-se Vectashield (Vecta). As lâminas foram observadas com microscópio confocal a laser modelo Zeiss LSM 510 (NADRUZ WJ, et al, 2005).

3.9 Silenciamento do MEF2C no coração de camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 20-30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp. Foram realizados experimentos preliminares para avaliação do silenciamento do MEF2C no ventrículo esquerdo de camundongos em resposta a diferentes doses de siRNA.

O siRNA diluído em PBS foi injetado através da veia jugular. Para tanto, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e de Xilazina (5mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, a região do pescoço foi aberta, a jugular direita dissecada e introduziu-se uma cânula de polietileno (PE-10 estirada) de forma que a solução de PBS ou de siRNA foram infundidas lentamente (40μL, intervalo de 5 segundos, mais 40μL e assim por diante). Uma segunda injeção foi realizada com 80μL de PBS para lavagem da cânula. Ao final da injeção, a cânula foi retirada, a jugular ocluída e a região da ferida cirúrgica fechada. Após a recuperação anestésica, os animais foram devolvidos às suas gaiolas. Animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto foi injetado apenas PBS.

As dose de 15ug e 30ug de siRNA foram testadas para a verificação da melhor dose a ser utilizada para o silenciamento do MEF2C. Também foi verificado o curso temporal do silenciamento nos períodos de 1, 4, 7 e 15 dias após a injeção do siRNA. Em seguida, os animais foram sacrificados e os ventrículos esquerdo foram submetidos a extração de proteínas e *western blotting* (CLEMENTE CF, et al, 2007)

3.10 Modelo de sobrecarga pressórica crônica 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 38ºC. 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 constricção da crossa da aorta. A sobrecarga pressórica foi acompanhada por 1, 7 e 15 dias (FRANCHINI KG et al, 2000)

3.11 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 tranversais 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 CF, 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.

3.12 Hemodinâmica

Após a ecocardiografia os camundongos foram anestesiados e monitorados hemodinamicamente para obtenção da pressão arterial e da freqüência cardíaca. Para isso, utilizou-se 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 (Figura 4). 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 constricção da aorta (CLEMENTE CF, et al, 2007).

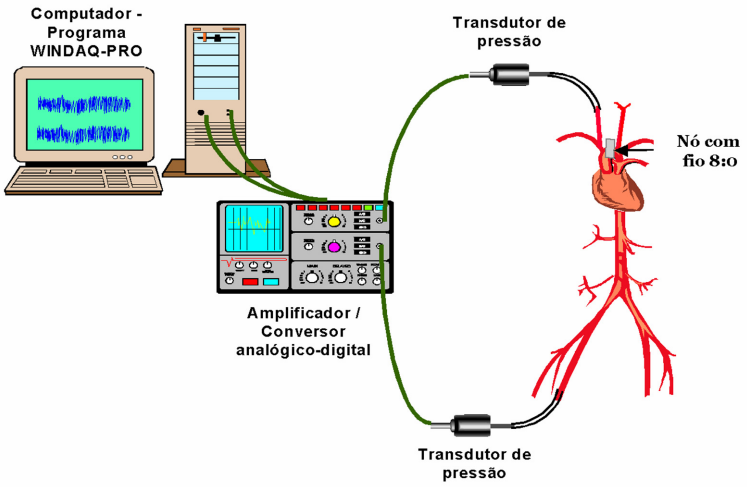


Figura 5: Ilustração do local onde foi realizada a coarctação da aorta e os aparelhos utilizados para a obtenção da avaliação hemodinâmica.

3.13 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).

3.14 Histologia e Morfometria do ventrículo esquerdo

Após a obtenção da massa do ventrículo esuqerdo, uma fatia transversal do miocárdio na porção equatorial do ventrículo foi processada em parafina e dela obtidos cortes histológicos de 5 μm de espessura. Lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e Tricrômio de Mansson, conforme etapas abaixo:

Coloração Hematoxilina-eosina

- hematoxilina de Ehlrich – 5 minutos
- lavagem em água – 12 minutos
- eosina – 5 minutos

Coloração Tricrômico de Masson

- Hematoxilina de Groat – 5 a 10 minutos
- Lavar em água corrente e depois em água acidificada 1%
- Rouge Malloty – 10 a 15 minutos
- Lavar em água acidificada 1%
- Passar em ácido fosfomolíbdico 10%
- Passar em água acidificada 1%
- Verde luz – 13 a 15 minutos

As secções foram desidratadas, montadas em bálsamo sintético Entellan e as medidas morfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Leica Q500iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems ltd, Cambridge, UK).

3.14.1 Hipertrofia cardíaca

Para a avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), sob aumento de 400x. A hipertrofia foi medida pelo diâmetro dos miócitos em torno do núcleo (μm). Foram selecionados apenas miócitos da parede do ventrículo esquerdo com disposição longitudinal e núcleos ovalados e centralizados (GUIDO MC, et al, 2007).

3.14.2 Fibrose miocárdica

Para a avaliação da fibrose miocárdica foram utilizados cortes corados com Tricômio de Masson, sob aumento de 200x. A fibrose foi estimada pela fração de volume do colágeno (%), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em azul, e a área total do miocárdio. Para estas análises, 20 campos foram examinados (GUIDO MC, et al, 2007).

3.14.3 Infiltrado inflamatório

Para a estimativa de infiltrado inflamatório (número de células/mm^2), lâminas foram coradas com HE sob aumento de 400x. As células foram identificadas morfologicamente pelo aspecto nuclear e citoplasmático. As células com aspecto morfológico de fibroblastos, células endoteliais ou miócitos foram excluídas da contagem (KOIKE MK, et al, 2007).

3.15 Western blotting

Para a análise da expressão protéica, os camundongos foram anestesiados com uma dose letal de Tiopental. A cavidade torácica foi aberta e o coração foi rapidamente removido, congelado em nitrogênio líquido ou homogeneizado 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; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C usando o homogeneizador tipo

Polytron. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4ºC, 11000 rpm, por 20 minutos 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 biureto.

Após quantificação das proteínas, 50μL de amostra acrescida de 100μL de tampão de Laemmli (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 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 10% em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

As membranas foram incubadas por 45minutos em temperatura ambiente com tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos. Em seguida, foram lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-MEF (diluição 1:1000) em tampão de anticorpo (3% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante 12 horas, a 4°C. Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas utilizando o kit de detecção *SuperSinal west Pico Chemiluminescent Substrate* de acordo com o protocolo do fabricante, as bandas correspondentes as proteínas específicas foram detectados por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

As bandas dos filmes foram quantificadas por densitometria óptica através do software ImajeJ.

3.16 Análise da expressão do transcrito de MEF2C por PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi utilizado para confirmar a análise do RNAmno ventrículo esquerdo e nos tecidos, como pulmão e rim. Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados e a cavidade torácica e abdominal foram abertas e o coração, rim esquerdo e pulmão foram rapidamente removidos e o RNA total extraído utilizando Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada incubando-se 2µg de RNA total do ventrículo esquerdo de camundongos com iniciadores randômicos (*Randon Primer* 250ng - Invitrogen), 50U da enzima *SuperScriptIII*^{TM} *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e os seguintes ciclos: 25^{o}C por 5 min., 50^{o}C por 1 h e 70^{o}C por 15 min.

O PCR em tempo real, nos propiciou uma quantificação relativa da expressão dos genes através da comparação da amplificação do RNAm entre os grupos controles e o tratado com o siRNA. Isso foi importante para termos certeza que os fenótipos gerados realmente são derivados da diminuição da expressão dos genes durante a fase aguda do modelo.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan^{TM} (Applied Biosystems), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene *GAPDH* (TaqMan^{TM} - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPDH* foi marcada com o fluoróforo VIC enquanto o gene alvo foi marcado com o fluoróforo FAM.

Para a quantificação relativa dos genes, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicatas a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x; 0,625µL da solução de *primers* e sonda; 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (40ng no total). No controle negativo foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50^{o}C por 2 minutos, 95^{o}C por 10 minutos e depois 40 ciclos de 95^{o}C por 15 segundos e 60^{o}C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems).

A validação do sistema gene de interesse/controle endógeno (*GAPDH*), para verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes foram realizadas e

apresentam-se semelhantes e próximas a 100%. Essa etapa foi essencial para que o controle endógeno pudesse ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* do gene de interesse, quanto do controle endógeno dos cDNAs de triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir qual foi a amplitude de concentrações para as quais o sistema foi eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. Em seguida, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual foi possível verificar o valor da inclinação da mesma.

Para que o sistema fosse considerado eficiente, o valor da inclinação deveria ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência foram considerados validados.

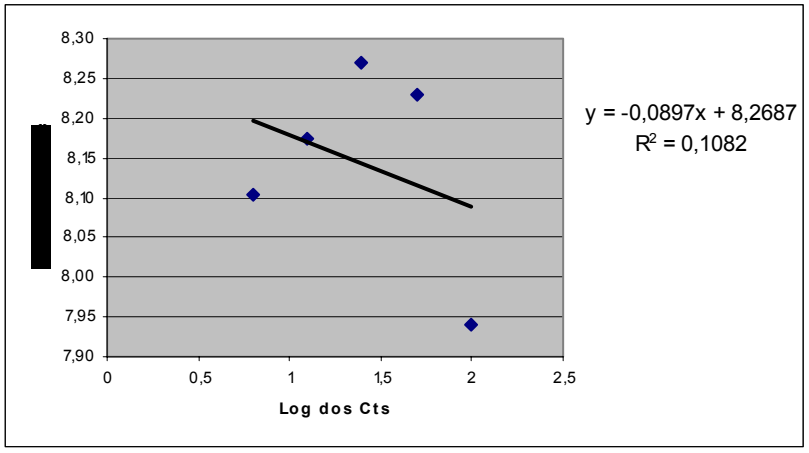


Figura 6: Linha de tendência obtida após construção do gráfico a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Com a validação realizada passou-se para a fase de realização dos ensaios de quantificação relativa, utilizando a melhor concentração de cDNA para ambos os primers, que foi de 50ηg.

3.17 Análise de ATP, ADP, AMP e ADO por Cromatografia Líquida

3.17.1 Tratamento das amostras de tecidos

Após serem anestesiados, os camundongos foram sacrificados, e o ventrículo esquerdo foi coletado, lavado com salina e imediatamente imerso em um gral com nitrogênio líquido para congelamento e homogeneização. Em seguida, deixou-se o nitrogênio do gral secar e, rapidamente, transferiu-se o homogenato de tecido para um tubo plástico (Eppendorfs) previamente congelado. Estas amostras de tecido foram mantidas a -80°C até o dia da análise, utilizando um método de cromatografia líquida.

Antes da injeção no cromatógrafo, os nucleotídeos (ATP, ADP, AMP e ADO) foram extraídos dos tecidos de acordo com o procedimento seguinte: pesou-se entre 1,5 a 3,0 mg do homogenato de corações em um tubo de ensaio que continha 1 mL de solução de KH_2PO_4 (50 mmol L^{-1}) e ácido cítrico (25 mmol L^{-1}) em pH 4,5. A mistura foi colocada em banho-maria a 85ºC durante 2 minutos para desativar qualquer processo biológico que pudesse degradar os nucleotídeos. Em seguida, foram adicionados mais 3 mL de tampão fosfato-citrato. 1 mL desta solução foi levado à centrífuga (8000 rpm, 5 min.). Desta solução, retirou-se 200 μL e a derivatização foi conduzida acrescentando-se 20 μL de 2-cloroacetaldeído (agente de derivatização) (KATAYAMA M, et al, 2001 e KAWAMOTO Y, et al, 1998). A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80ºC por 20 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram injetados 25 μL para análise no cromatógrafo.

3.17.2 Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Alliance série Waters 2695 (Milford, Mass, USA), equipado com bomba quaternária, injetor e desgaseificador automáticos, e detector de fluorescência série Waters 2475. Os

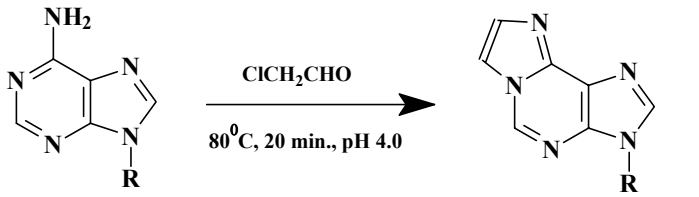
comprimentos de onda para a excitação e emissão foram 280/420 nm para os derivados N^1,N^6-etenopurínicos (ATP, ADP, AMP e ADO) após a derivatização com 2-cloroacetaldeído (KATAYAMA, M. et al, 2001 e KAWAMOTO, Y. et al, 1998). A separação dos compostos foi realizada, à temperatura ambiente, em uma coluna cromatográfica de fase reversa Cosmosil 5C18-MS (150 x 4,6 mm i.d.; 5 μm de tamanho das partículas) protegida com uma pré-coluna (Cosmosil 5C18-MS 10 x 4,6 mm) (ambas adquiridas da Phenomenex).

A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica foi composta por KH_2PO_4 (50 mmol L^{-1}), ácido cítrico (25 mmol L^{-1}) em pH 4,5 e de metanol, preparada diariamente e filtrada em um sistema a vácuo através de um filtro de 0,45 μm (Millipore, Milford, Mass, USA). A coluna foi eluida com uma solução gradiente em um fluxo de 1.0 mL/min. O gradiente foi o seguinte: fase isocrática em 2% de metanol por 4 minutos, 15% de metanol por 12 minutos e, finalmente, 2% de metanol por 4 minutos para voltar às condições iniciais. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 20 minutos.

O controle do sistema, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados através de um computador PC-Pentium IV da Dell, que operou com o programa Microsoft Windows versão 2003 e com o programa cromatográfico Empower 2002.

3.17.3 Derivatização dos nucleosídeos purínicos

A reação da adenina e de seus compostos correlatos (ATP, ADP, AMP e ADO) com 2-cloroacetaldeído produziu os derivados N^1,N^6-etenopurínicos (Figura 7) que são altamente fluorescentes (KATAYAMA M et al, 2001 e KAWAMOTO Y et al, 1998). Para a obtenção de derivados N^1,N^6-etenopurínicos, foram adicionados 10% da solução aquosa de 2-cloroacetaldeído às amostras que continham os nucleosídeos ATP, ADP, AMP e ADO. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 minutos, sendo a reação bloqueada por imersão do frasco reacional em banho de gelo.



Adenil purina N^1,N^6**-eteno purina**

Figura 7 - Reação de derivatização de adenil purina pelo 2-cloroacetaldeído [1].

Conforme as condições cromatográficas descritas no item acima, a Figura 8 apresenta um cromatograma representativo de um extrato de coração. Sendo assim, a seletividade entre os compostos pode ser verificada através da forma e resolução simétricas dos picos dos derivados N^1,N^6-etenoadeninas. O tempo total de corrida cromatográfica foi relativamente curto (20 minutos) em comparação com uma média de tempo de 30 minutos reportado na literatura (KATAYAMA, M. et al, 2001). Os tempos de retenção (t_R) dos derivados de ATP, ADP, AMP e ADO foram de aproximadamente 4,78, 6,29, 10,35 e 15,50 minutos, respectivamente. Esses tempos de retenção alteram-se com a variação da temperatura ambiente. Os valores de comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 280 e 420 nm.

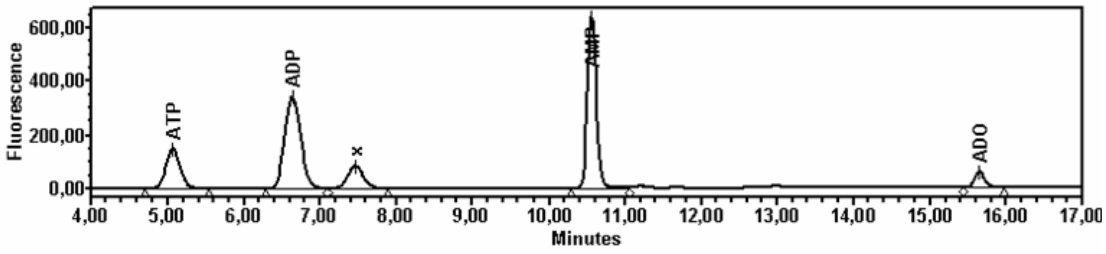


Figura 8: Cromatograma representativo de um extrato de coração contendo os derivados purínicos ATP, ADP, AMP e ADO.

3.18 Análise estatística

Os resultados estão expressos em médias ± erro padrão. O programa utilizado para a análise dos dados foi Prisma 4.0. Diferenças entre os valores médios foram testadas pelo teste-t e pela análise de variância (ANOVA) para dados repetidos. O teste de Bonferroni foi aplicado para análise *post hoc*. Valores de P <0,05 foram considerados com estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1 Padronização e otimização do silenciamento gênico de MEF2C

4.1.1 Desenho de *primers* e análise da seqüência do siRNA^{MEF2C}

O desenho dos *primers* e identificação *in silico* da seqüência de RNA utilizada para a produção do siRNA foi um importante passo para o planejamento experimental com a tecnologia de RNAi. Para esse desenho foram utilizados os seguintes parâmetros:

- número de acesso: AK009139. Mus musculus adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 2310004H24 product:myocyte enhancer factor 2C;
- cálculo da energia livre de gibbs para verificação da efetividade *in silico* do siRNA (Programa Strand Analisys).

POSITION: 1187
Target: ATCCCACCTGGCAGCAAGAACAC
RNA sequences in 5'-3' direction:
RNA Sense: CCCACCUGGCAGCAAGAACAC
RNA Antisense: GUUCUUGCUGCCAGGUGGGAU
RESULTS: Value: 3.20 kcal/mol => ACTIVE Guide Strand

Na avaliação da Estrutura Secundária do RNAm do gene alvo para identificação das regiões de maior acessibilidade para o complexo RISC, utilizamos o programa *mfold* (*M. Zuker, 2003*) disponível no site: http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi (Anexo 1).

O gene *mef2c* pertence a uma família de fatores de transcrição com alto grau de homologia entre si, por isso, decidimos analisar a proximidade estrutural existente entre os membros da família MEF2. Assim, utilizamos o banco de dados da internet, com o número do gene NM_025282.2. A seqüência do siRNA foi desenhada na posição 1187 do RNA mensageiro alvo para MEF2C, como citado acima.

Com o intuito de compararmos a seqüência do *mef2C* com os RNAs mensageiro da mesma família, realizou-se um alinhamento de genes pertencente a essa família gênica, com o MEF2A(NM_001033713), MEF2B1(NM_133665), MEF2B2(NM_008578), e MEF2C (AK009139.1) e MEF2D(NM_001045484). Observa-se na Figura 9, pelas cores indicativas das bases nitrogenadas, que os membros da família MEF2 (A, B1, B2 E D) possuem respectivamente, 52, 36, 44 e 48% de similaridade em relação ao alvo do siRNA do MEF2C. Entretanto, essa similaridade não é considerada importante quanto à especificidade do silenciamento.

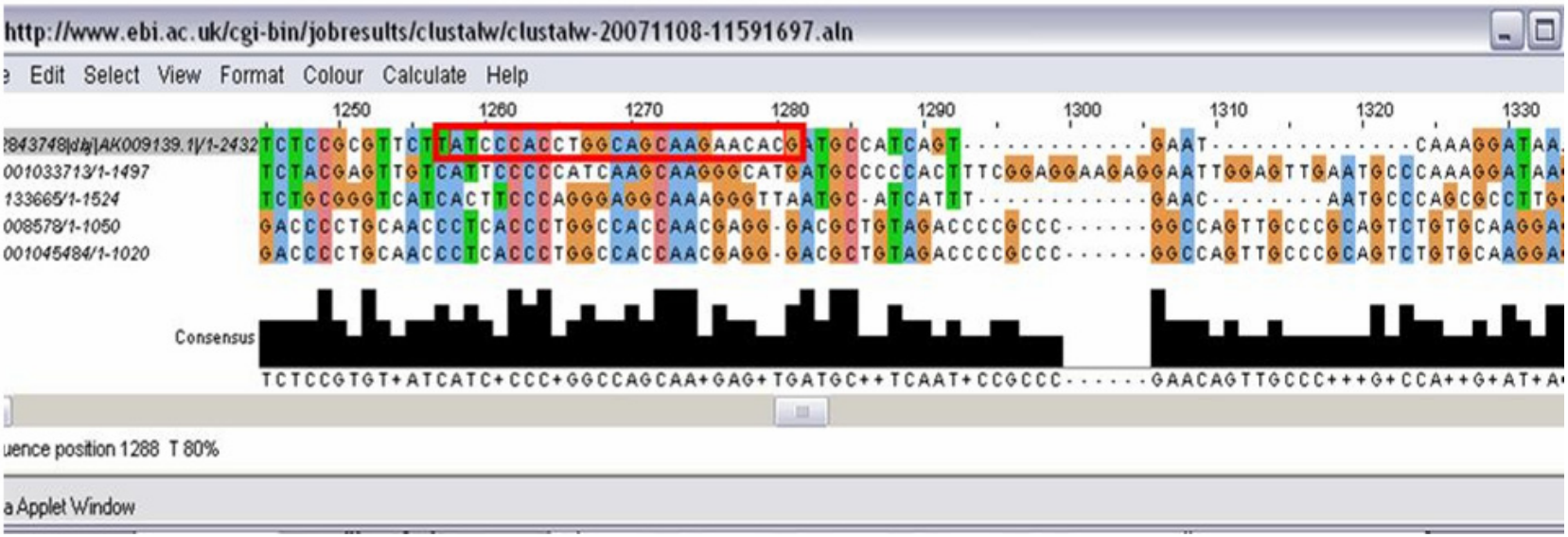


Figura 9: Seqüência alvo do siRNA do gene MEF2C (em vermelho) comparando com a mesma região dos outros genes da mesma família

A procura por similaridade entre o gene alvo e a especificidade contra o genoma EST da espécie utilizada foi realizada uma análise utilizando-se o Programa *Strand Analisys/Blast*. O resumo do *Blast* da sequência anti-senso do siRNA mostrou complementariedade de 21 nucleotídeos com o gene alvo e apenas 14 nucleotídeos de identidade com outra sequência depositada no banco de dados EST, o que minimiza a possibilidade de silenciamento inespecífico (Figura 10).

A	B	C	D		
Query	Subject	Subject Length	Identities	Score	E value
POSITION: 1187	UI-M-GV0-clo-l-06-0-UI.r1 NIH_BMAP_GV0 Mus musculus cDNA clone IMAGE:3062	810	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	K0510E11-5N NIA Mouse Hematopoietic Stem Cell cDNA Library	546	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	UI-M-GV0-clt-l-11-0-UI.r1 NIH_BMAP_GV0 Mus musculus cDNA clone IMAGE:30617	782	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	AGENCOURT_11362543_updated NIH_MGC_137 Mus musculus cDNA clone IMAG	916	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	BY287639 RIKEN full-length enriched, visual cortex Mus musculus cDNA clone K530	433	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	AGENCOURT_10334139 NIH_MGC_144 Mus musculus cDNA clone IMAGE:658936	704	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	H4072H02-5 NIA Mouse 7.4K cDNA Clone Set Mus musculus cDNA clone H4072H0	544	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	ic39e01.y1 Melton Normalized Mixed Mouse Pancreas 1 N1-MMS1 Mus musculus c	573	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	va34h04.r1 GuayWoodford Beier mouse kidney day 7 Mus musculus cDNA clone IM	364	21	42.1	0.002
POSITION: 1187	CJ320244 RIKEN full-length enriched mouse cDNA library, Rathke's pouches 14.5 da	449	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	CJ315309 RIKEN full-length enriched mouse cDNA library, Rathke's pouches 14.5 da	410	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	CJ313647 RIKEN full-length enriched mouse cDNA library, Rathke's pouches 14.5 da	427	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	CJ311787 RIKEN full-length enriched mouse cDNA library, Rathke's pouches 14.5 da	454	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	CJ310124 RIKEN full-length enriched mouse cDNA library, Rathke's pouches 14.5 da	408	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	CJ303629 RIKEN full-length enriched mouse cDNA library, Rathke's pouches 14.5 da	414	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	BP768902 mouse pancreatic islet library with recombination-based method Mus mus	578	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	BP756246 mouse pancreatic islet library with recombination-based method Mus mus	596	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	BP755249 mouse pancreatic islet library with recombination-based method Mus mus	556	15	30.2	6.7
POSITION: 1187	BP755066 mouse pancreatic islet library with recombination-based method Mus mus	426	15	30.2	6.7

Figura 10: Resposta gerada pelo programa *Strand Analisys/Blast* um dos siRNA do gene MEF2C. A) Posição do siRNA na sequência do RNAm; B) Nome da sequência no NCBI com a qual houve identidade da sequência alvo; C) Local na sequência depositada no NCBI; D) Número de nucleotídeos com identidade, ou seja, que existe complemetariedade entre o siRNA e o depósito EST no NCBI.

4.2 Silenciamento em células C_2C_{12}

Anterior ao silenciamento do MEF2C em cultura de células C2C12, foi demonstrado a localização nuclear desse fator de transcrição nas fases de proliferação e diferenciação das células. A Figura 12A e 12B demonstra fotografias de células C_2C_{12} marcadas com anticorpo anti-MEF2 e faloidina. Pode-se observar intensa marcação de MEF2 principalmente nas regiões nucleares.

Já a Figura 11C demonstra que as células C2C12 em processo de diferenciação apresentam maior expressão protéica do MEF2 que varia aproximadamente 5 vezes nos 1º, 2º e 5º dias a aproximadamente 10 vezes nos 3º e 4º dias.

Em seguida, com o intuito de padronizarmos o silenciamento das células C2C12, estas foram plaqueadas, induzida à diferenciação e após 3 dias realizou-se a transfecção utilizando 100ηg de siRNA por ml de meio. Após 1 dia da transfecção, avaliou-se a expressão protéica do MEF2 por *western blotting* após a transfecção com RNAi. A Figura 11D demonstra que aproximadamente 75% da expressão protéica de MEF2 foi diminuída após silenciamento quando comparada as células controles que receberam apenas lipofectamina.

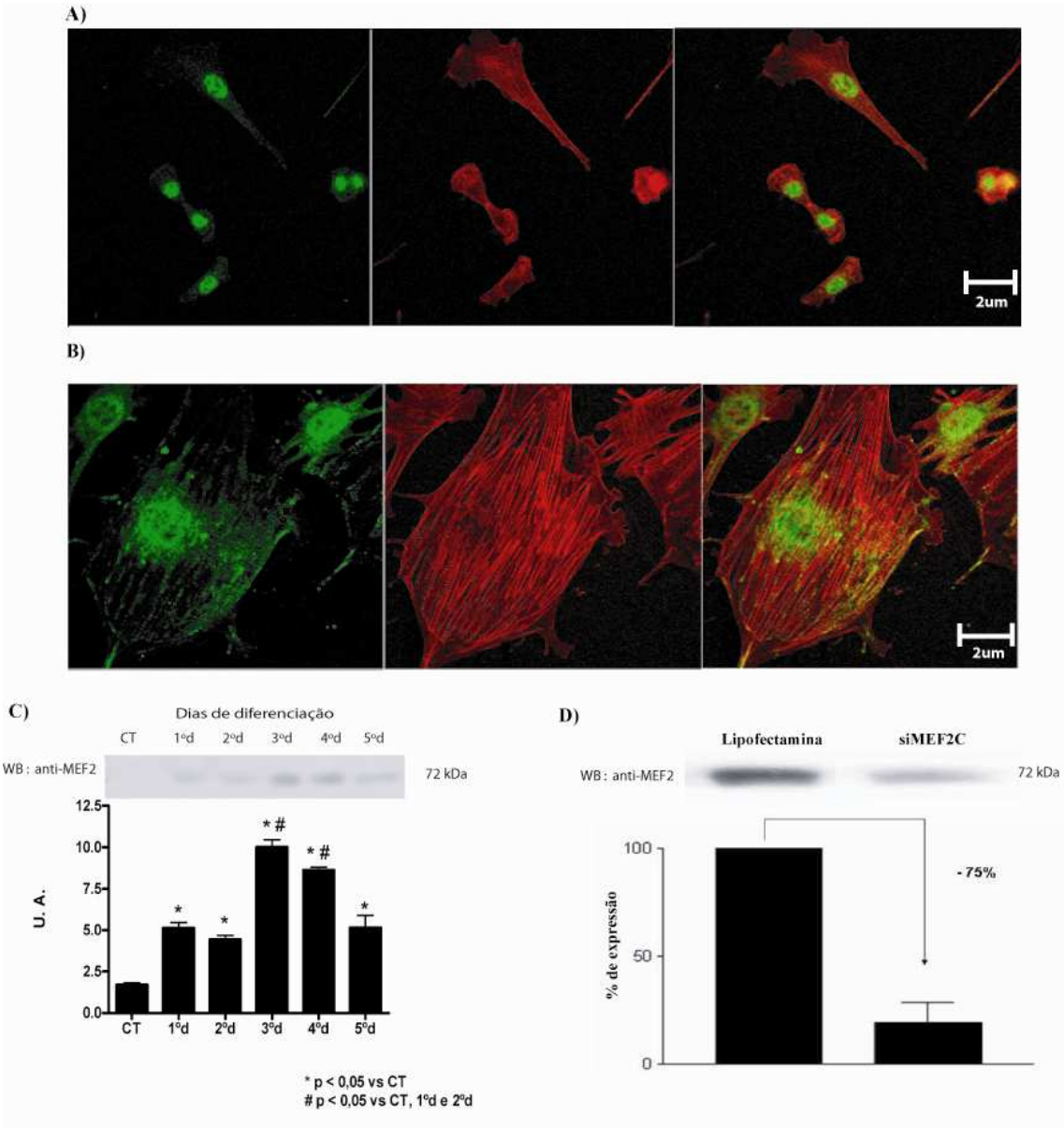


Figura 11: Otimização do silenciamento em cultura de células C_2C_{12}.
A - Microscopia confocal de células C_2C_{12} no 1º dia de diferenciação. Em verde marcação do fator de transcrição MEF2C com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com FITC. Em vermelho marcação com faloidina e a sobreposição das duas marcações (aumento 400X).
B - Microscopia confocal de células C_2C_{12} no 5º dia de diferenciação. Em verde marcação do fator de transcrição MEF2C com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com FITC. Em vermelho marcação com faloidina e a sobreposição das duas marcações (aumento 1000X).
C – Exemplo representativo de blot realizado com homogenatos de células C_2C_{12} e anticorpos anti-MEF2, nos 5 dias de diferenciação. São apresentados os valores percentuais médios da quantidade de proteína marcada com MEF2 (n=3).
D – Ensaio de padronização do silenciamento em células C_2C_{12}. Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de células que receberam 300 ηg de $siRNA^{MEF2C}$ (n=2).

4.3 Silenciamento do MEF2C no ventrículo esquerdo de camundongos

4.3.1 Ensaios dose-resposta

Para avaliar a dose adequada de siRNA^{MEF2C} para o silenciamento do MEF2C no miocárdio realizamos ensaios do tipo dose-resposta. Para isso, camundongos foram submetidos à canulação da veia jugular direita e foram tratados com injeções lentas de 15 ou 30μg de siRNA^{MEF2C} diluídos em 300μL e 600μL de PBS, respectivamente. Animais controle foram tratados somente com o veículo PBS.

Após 1 dia da injeção, os animais foram sacrificados e a expressão de MEF2C foi avaliada no miocárdio por *western blotting*. A Figura 12 mostra os resultados de dose-resposta de siRNA^{MEF2C} no silenciamento do MEF2C.

Após 1 dia, a administração de 15μg de siRNA^{MEF2C} levou 27% de silenciamento da expressão protéica de MEF2, enquanto que a injeção de 30μg de siRNA^{MEF2C} levou a um silenciamento da expressão protéica em cerca de 85%, comparados aos animais controles. Com base nestes resultados a dose de 30μg de siRNA^{MEF2C} em 600μL de PBS foi escolhida para futuros experimentos de silenciamento do MEF2C em camundongos.

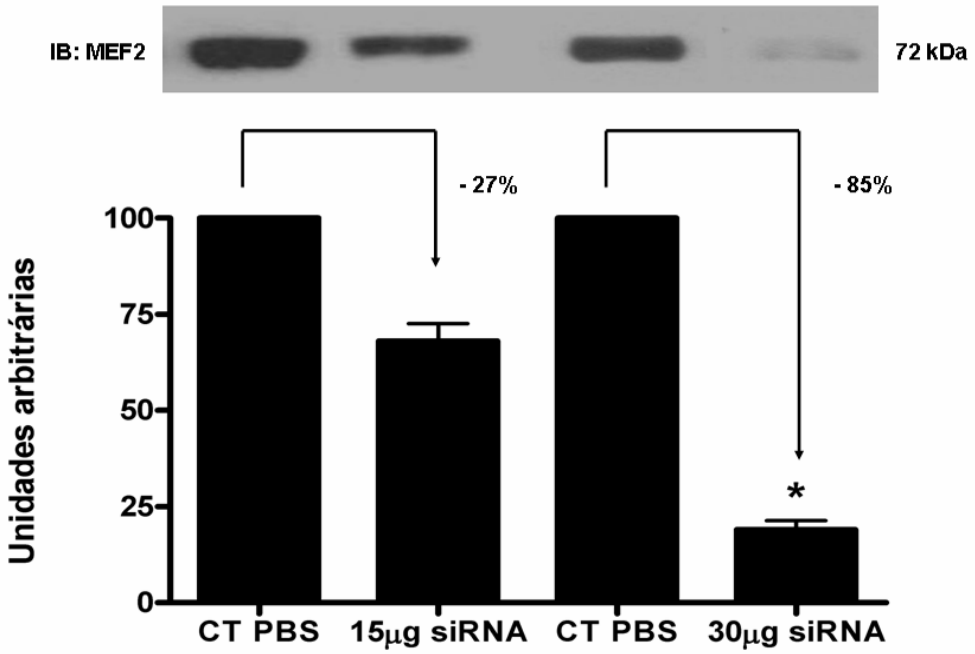


Figura 12: Ensaio dose-resposta para siRNA^{MEF2C}. Exemplo representativo de blot realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2, para a dose de 15μg de siRNA^{MEF2C} em 300μl de PBS e 30μg de siRNA^{MEF2C} em 600μl de PBS. Valores percentuais médios da quantidade de proteína marcada com MEF2. CT: n=4, 15μg: n=5, 30μg: n=3, * P <0,05 vs CT PBS.

4.3.2 Análise da especificidade do silenciamento - siGFP

A especificidade do siRNA do MEF2C foi avaliada pelo efeito do siRNA irrelevante. Utilizamos como controle negativo ou irrelevante siRNA construído com base na seqüência de GFP. Após 1 dia da injeção de 30μg de siRNA^{GFP} diluídos em 600μl de PBS os animais foram sacrificados e os ventículos esquerdos extraídos para análise. Os resultados demonstrados na Figura 13 indicam que o tratamento com siRNA^{GFP} não proporciona alteração na expressão protéica do MEF2C. Assim, podemos afirmar que o siRNA^{MEF2C} atua de modo sequência-específico.

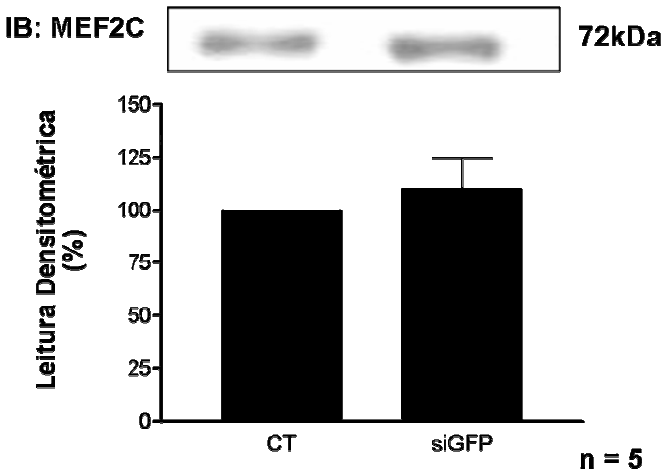


Figura 13: Teste de especificidade do silenciamento do gene da MEF2C utilizando siRNA^{GFP}. Exemplos representativos de *blott* realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2. Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com anti-MEF2 em miocárdio de camundondos. CT e siGFP (n=5).

4.3.3 Confirmação do silenciamento por Real Time-PCR

Após confirmação do silenciamento da expressão protéica de MEF2C verificou-se os níveis de RNA mensageiros presentes nos ventrículos esquerdos de camundongos que receberam injeção de 30μg de siRNA^{MEF2C}. Inicialmente realizou-se a validação do *primer* MEF2C em relação ao controle endógeno GAPDH. Para isso, realizaram-se diluições seriadas do cDNA que foi utilizado como molde. A Figura 14 demonstra a linearidade das duas reações, tanto para o gene alvo, MEF2C, quanto para o controle endógeno, GAPDH. Esse resultado demonstra que os dois *primers* foram igualmente eficientes e foi selecionada a diluição de 40ηg de cDNA para os ensaios posteriores.

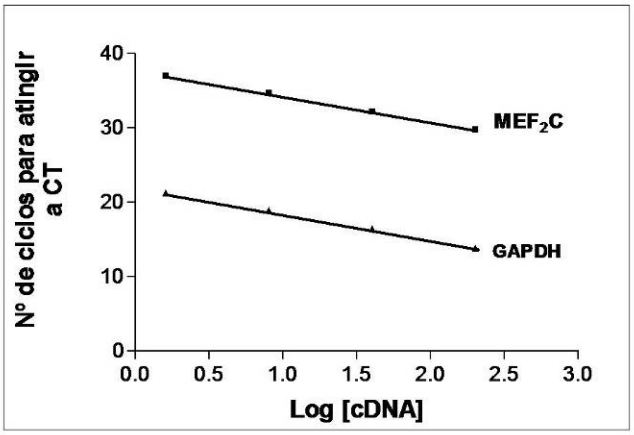


Figura 14: Gráfico representativo da curva de validação dos *primers* MEF2C e GAPDH.

Procedeu-se então para a confirmação do silenciamento dos transcritos em amostras de ventrículo esquerdo de camundongos tratados 30µg de siRNA^{MEF2C}. Após 1 dia da administração do siRNA os animais foram sacrificados, o ventrículo esquerdo retirado e o RNA total extraído para posterior confecção de cDNA. Para esses experimentos foram utilizados animais coarctados e sham, tratados com veículo PBS ou o siRNA^{MEF2C}. A Figura 15 demonstra a diminuição de aproximadamente 80% no nível de RNAm nos animais que receberam 30µg de siRNA comparados com os animais que receberam somente o veículo PBS. Nota-se também que a coarctação da aorta não influenciou o nível de silenciamento e que os animais Sham apresentaram o mesmo nível de silenciamento dos animais submetidos à coarctação da aorta. Desta forma, pode-se confirmar o silenciamento efetivo do MEF2C no modelo experimental de coarctação da aorta.

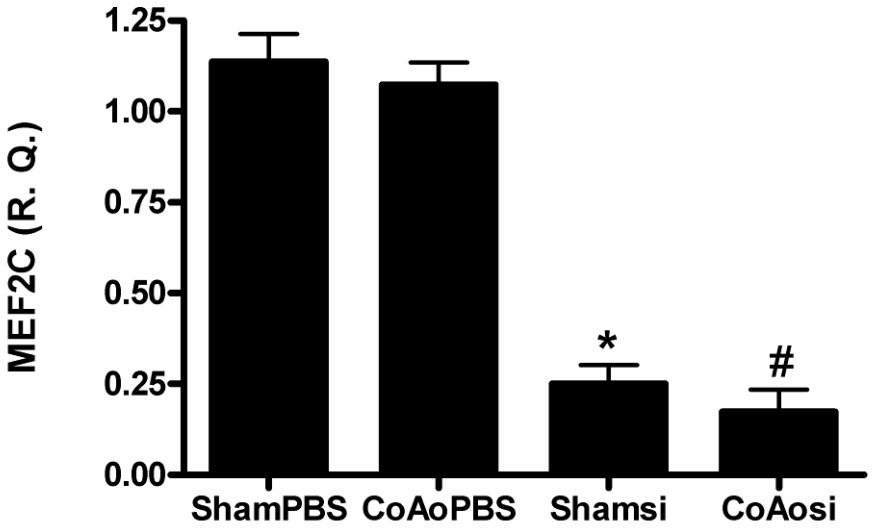


Figura 15: Confirmação do silenciamento por Real Time PCR. Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm dos grupos de animais que receberam siRNA ou veículo PBS e sofreram sobrecarga pressórica ou apenas cirurgia fictícia. * P <0,05 vs Sham PBS, # P <0,05 vs CoAo PBS (n = 6).

4.3.4 Análise da especificidade do silenciamento – MEF2A

Outra forma de verificarmos a especificidade do silenciamento do MEF2C foi através da avaliação do nível de expressão de proteínas da mesma família. Assim, optamos por realizar quantificação relativa, por meio de PCR em tempo real do gene MEF2A. Para isso, inicialmente realizamos o ensaio de validação da reação de PCR em tempo real, que consistiu em fazer uma reação com diluições seriadas de cDNA controle e assim avaliar a eficiência de reação do *primer* alvo (MEF2A) e do controle endógeno (GAPDH). A Figura 16 representa um gráfico com linearidade. Podemos verificar igual eficiência de amplificação para ambos *primers* independente da concentração de cDNA. Novamente, a quantidade de cDNA escolhida para posteriores ensaios foi a de 50ηg.

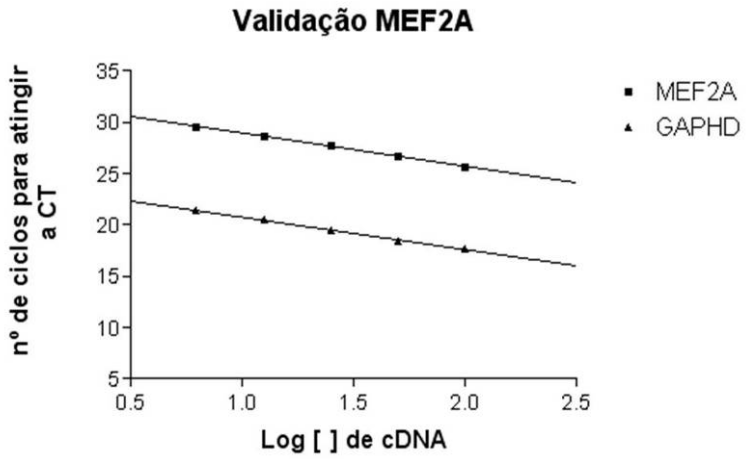


Figura 16: Gráfico representativo da curva de Validação dos primers MEF2A e GAPDH.

Com os p*rimers* validados, realizou-se testes em animais silenciados. Para isso, camundongos receberam uma injeção de 30µg de siRNA^{MEF2C} e após 1 dia foram submetidos ao modelo de coarctação da aorta ou cirurgia fictícia (sham). Os animais foram anestesiados, sacrificados e seu ventrículos esquerdos retirados 1 e 7 dias após a cirurgia. Extraiu-se o RNA e confeccionou-se o cDNA. A Figura 17 apresenta a quantificação relativa de RNA mensageiro do gene MEF2A. Observa-se que a quantidade de RNAm não variou com a injeção do siRNA^{MEF2C}, comprovando a especificidade do siRNA^{MEF2C} . O nível da expressão gênica também não modificou-se independente do tipo de cirurgia à qual os animais foram submetidos, coarctados ou sham.

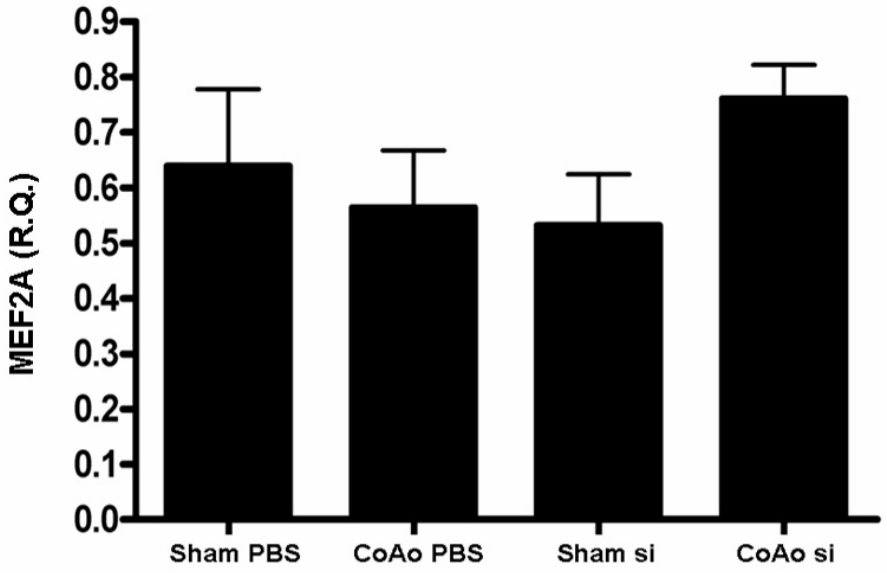


Figura 17: Controle de especificidade do siRNA^{MEF2C}. Gráfico representativo da quantificação de RNAm de MEF2A dos grupos de animais que receberam siRNA^{MEF2C} ou veículo PBS e sofreram sobrecarga pressórica (CoAo) ou apenas cirurgia fictícia (Sham), 3 dias após a injeção (n = 6).

4.3.5 Confirmação do silenciamento em cardiomiócito isolado

Com o intuito de verificarmos se o silenciamento do MEF2C no miocárdio ocorreu de modo efetivo nos cardiomiócitos, avaliamos a expressão protéica de MEF2C através de *western blotting* em cardiomiócitos isolados de ventrículo esquerdo de camundongos após 1 dia do tratamento com siRNA^{MEF2C}. As células isoladas foram mantidas em cultura por 30 minutos e após esse período foram extraídas as proteínas para a realização do *western blotting*. A Figura 18A demonstra uma ilustração dos cardiomiócitos em microscopia de luz convencional antes da extração das proteínas. Já na Figura 18C a técnica de *western blotting* demonstrou que os animais que receberam a siRNA^{MEF2C} tiveram menor expressão protéica, que foi de aproximadamente 75% quando comparados aos animais que receberam somente o veículo PBS. A Figura 18B demonstra o gel corado com *Comassie Blue* que foi utilizado como normalizador das proteínas resolvidas em gel de poliacrilamida 8%. Assim, esse resultado confirma o silenciamento específico da célula em questão, o cardiomiócito.

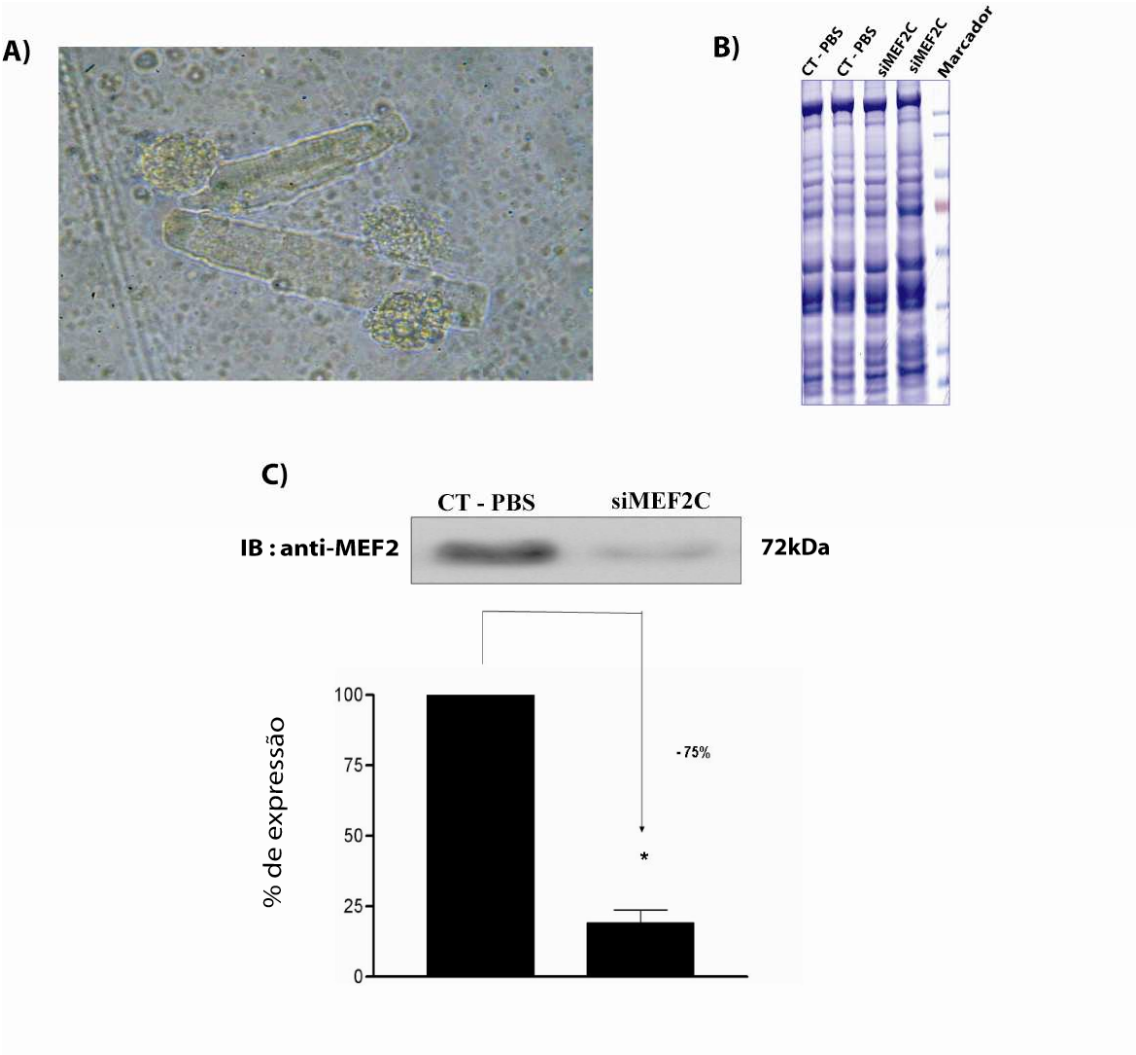


Figura 18: Silenciamento em cardiomiócito isolado.
A: Microscopia de luz convencional representando os cardiomiócitos a fresco no momento da extração (400X).
B: Gel de comassie blue representando o padrão de bandas de proteínas como controle de aplição no gel de poliacrilamida.
C: Confirmação do silenciamento em cardiomiócito isolado. Exemplo representativo de *blott* realizado com homogenatos de cardiomiócito isolado de coração de camundongos e anticorpo anti-MEF2. * P < 0,05 vs CT PBS (n = 3).

4.3.6 Análise do efeito do siRNA^{MEF2C} na expressão de MEF2C em outros órgãos

Animais foram tratados com dose de 30μg de siRNA^{MEF2C} e após 1 dia foram coletados fragmentos de tecidos do pulmão e rim para a avaliação do efeito do siRNA^{MEF2C} na expressão de RNA mensageiro de MEF2C. Para essa análise foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Como demonstrado na Figura 19, em relação aos animais controle, houve um silenciamento estatisticamente significante do gene do MEF2C no pulmão, em torno de 75% após a injeção de 30 μg de siRNA^{MEF2C}. Também podemos observar que a expressão de MEF2C no rim, comparada ao pulmão foi significativamente reduzida. Do mesmo modo, o silenciamento no rim foi de aproximadamente 50% em relação aos animais controle, porém não se apresentou tão evidente quanto no pulmão.

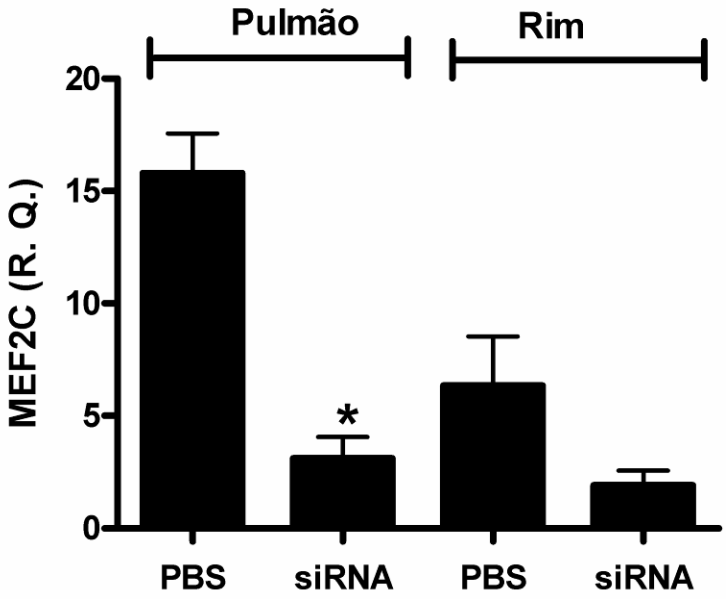


Figura 19: Expressão relativa de RNAm do MEF2C em pulmão e rim de animais tratados com siRNA^{MEF2C} ou veículo PBS após 24 horas. * P <0,05 vs CT PBS Pulmão, (n=3).

4.3.7 Análise da especificidade do silenciamento – *"Off-targets"*

A especificidade do siRNA do MEF2C foi analisada através da avaliação da expressão de proteínas cujas expressões celulares não são reguladas direta ou indiretamente pela proteína silenciada. Avaliamos a expressão de FAK, GAPDH, JNK1/2 e SHP2. Como indicado na Figura 20, nenhuma das proteínas analisadas teve sua expressão significativamente alterada no miocárdio de camundongos tratados com siRNA^{MEF2C}.

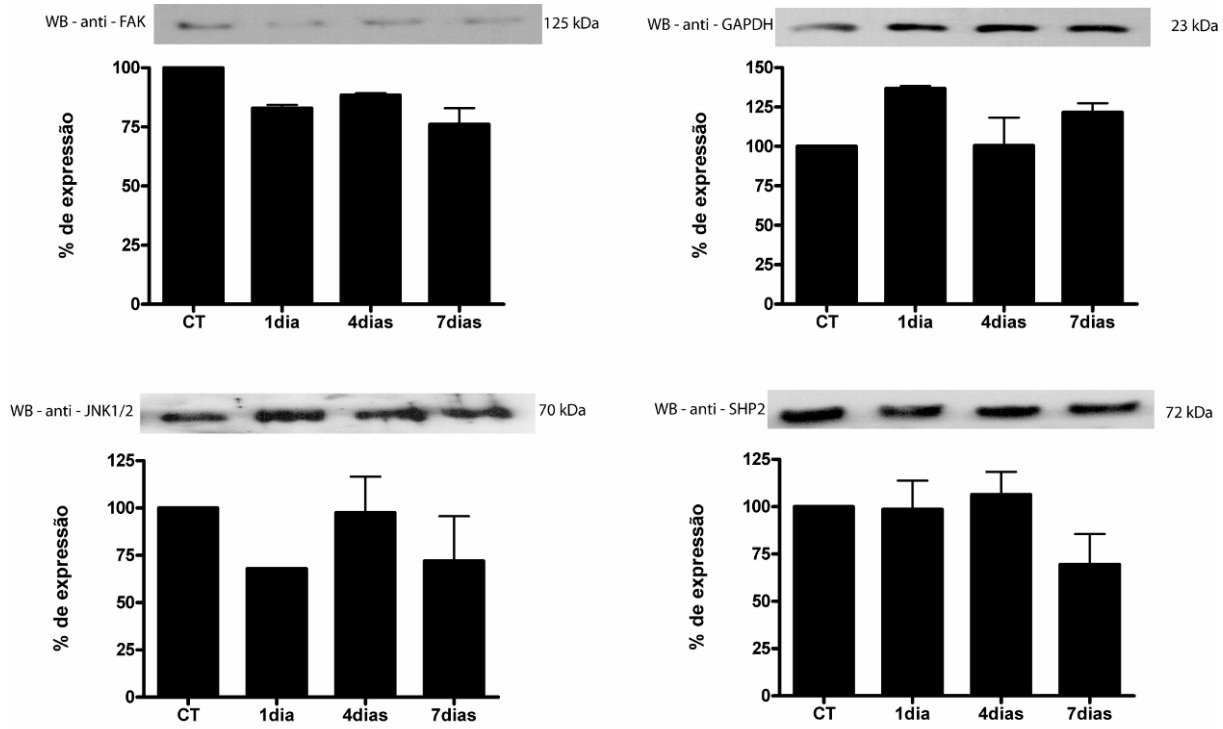


Figura 20: Teste de especificidade do silenciamento do gene da MEF2C utilizando *"off-targets"*. Exemplo representativo de *blott* realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2. Valores apresentados como médias e erros padrões (n=3).

4.3.8 Curso temporal do silenciamento

Para avaliar o curso temporal do silenciamento do MEF2 no miocárdio, camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados com 30μg de siRNA^{MEF2C} em 600μL de PBS. Animais controles foram tratados somente com veículo

PBS. Após 1, 4, 7 e 15 dias da injeção de siRNA^{MEF2C}, os animais foram sacrificados e a expressão do MEF2C foi avaliada no miocárdio por *western blotting*.

Como demonstrado na Figura 21, em relação aos animais controles, houve um silenciamento do gene do MEF2C em torno de 75% no primeiro e quarto dia após a injeção de 30μg de siRNA^{MEF2C}. Entretanto, a expressão protéica do MEF2 no 7º e 15º dia foi similar ao controle. Isso sugere que o silenciamento do MEF2C a partir do 7º dia já não foi mais efetivo.

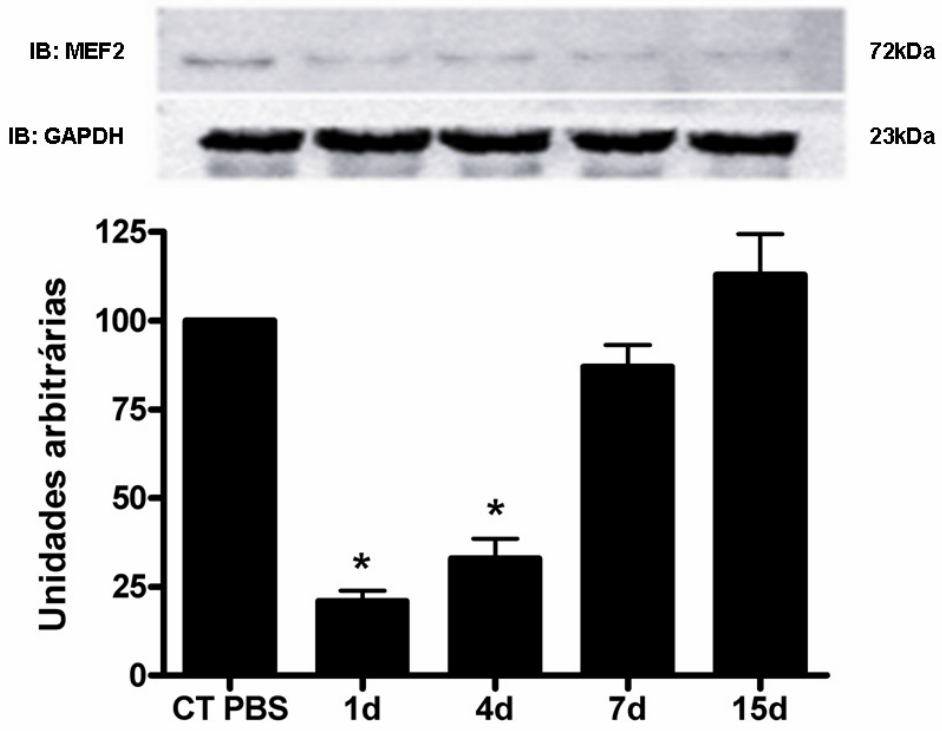


Figura 21: Curso temporal do silenciamento do MEF2C no período de 1 até 15 dias. Exemplo representativo de *blott* realizado com homogenatos de ventrículo esquerdo de camundongos e anticorpos anti-MEF2. Valores apresentados com valores percentuais médios e erros padrões médios. * P <0,05 vs CT (n=3).

Também foi verificada a quantidade de RNAm após 7 dias de injeção com siRNA para o MEF2C. Para esse experimento, os animais receberam uma dose de 30μg de siRNA^{MEF2C} ou apenas o veículo PBS e após 1 dia foram submetidos à coartação da aorta ou a cirurgia fictícia (sham). Depois de 7 dias da injeção do siRNA

os animais foram sacrificados e seus ventrículos esquerdos retirados para a extração de RNA que foi transformado em cDNA para a realização dos experimentos de quantificação por Real PCR em tempo real. A Figura 22 representa a dosagem relativa de RNAm nos grupos estudados. Observa-se uma discreta diminuição na quantidade de RNAm no grupo que recebeu 30µg de $siRNA^{MEF2C}$ após 7 dias da injeção, entretanto, essa diferença em relação ao grupo controle não foi estatisticamente significativa.

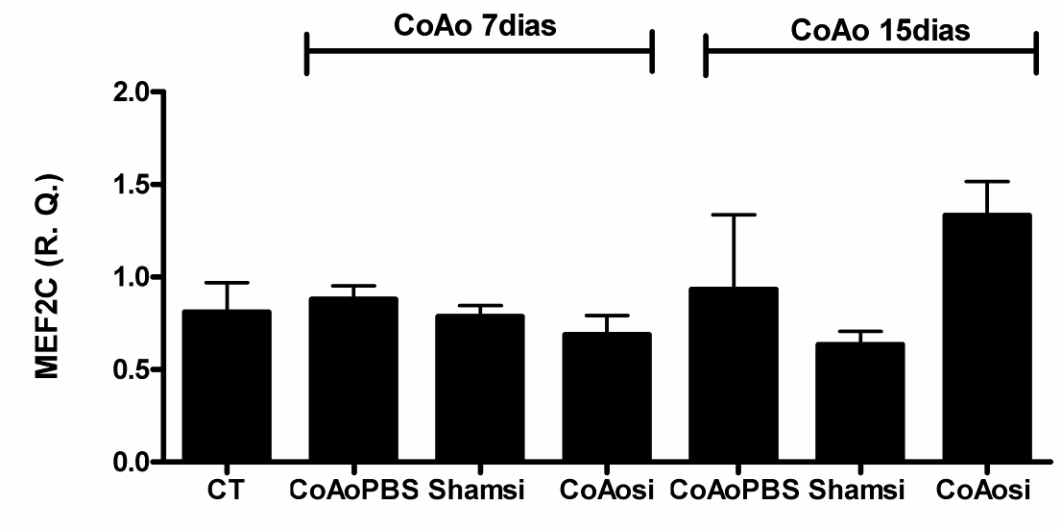


Figura 22: Representação gráfica da quantificação relativa de RNAm do gene MEF2C em animais que receberam 30µg de $siRNA^{MEF2C}$, após 7 e 15 dias de injeção do siRNA (n = 3).

4.4 Efeito do silenciamento gênico do MEF2C na estrutura e função do ventrículo esquerdo

4.4.1 Avaliação da expressão de MEF2 durante a sobrecarga pressórica

Na Figura 23, são indicados os valores de densitometria de *western blotting* realizados com anticorpos anti-MEF2. A análise do miocárdio por *western blotting* indicou que a expressão de MEF2 é constante nos corações de camundongos submetidos a sobrecarga pressórica crônica por 7 e 15 dias em relação aos controles, sham. A coloração por *Comassie Blue* das proteínas resolvidas em SDS-PAGE confirma o uso de quantidades iguais de proteína total nos géis.

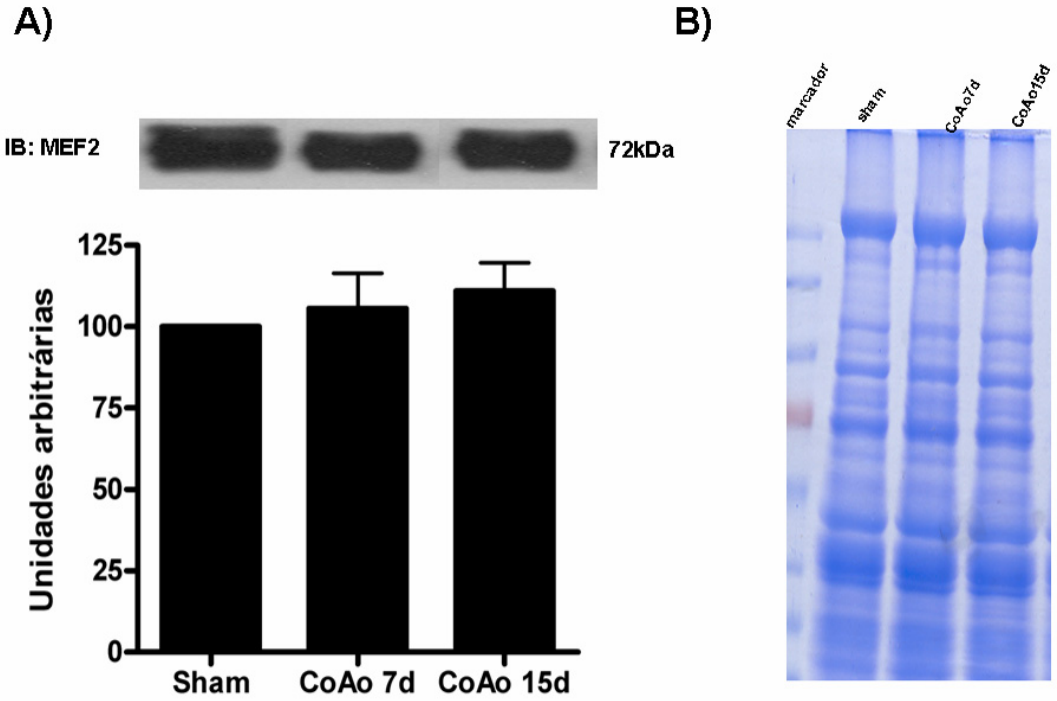


Figura 23: Expressão de MEF2 em ventrículo esquerdo de camundongos Swiss submetido à coarctação da aorta.
A: Exemplos representativos de *blott* realizados com homogenatos de coração de camundongos e anticorpos anti-MEF2. CT: controle cirurgia fictícia (sham), CoAo: 1 e 2 semanas de coarctação da aorta.
B: Gel *comassie* representando o padrão de bandas de proteínas como controle de aplição no gel de poliacrilamida.

4.4.2 Efeito do tratamento com siRNA^{MEF2C} na hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica crônica

No modelo de coarctação da aorta, o aumento de resistência ao fluxo sanguíneo na aorta resulta em sobrecarga hemodinâmica e hipertrofia do ventrículo esquerdo. Neste estudo, a sobrecarga pressórica foi estimada pela análise dos níveis pressóricos e do gradiente de pressão sistólico trans-constricção em camundongos anestesiados. As alterações estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo foram avaliadas através da ecocardiografia, da hemodinâmica e da morfometria do ventrículo esquerdo.

Para avaliar a influência do MEF2C nas mudanças fenotípicas induzidas pela coarctação da aorta do ventrículo esquerdo, camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados preventivamente com 30μg de siRNA^{MEF2C} em 600μL de PBS. Animais controles foram tratados somente com PBS. Após 1 dia da injeção de PBS ou siRNA^{MEF2C}, os camundongos foram submetidos a constricção da aorta ou cirurgia fictícia e foram acompanhados por 7 e 15 dias após a constricção.

4.4.3 Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo

A Tabela 1 e a Figura 24 apresentam os resultados da avaliação ecocardiográfica dos animais submetidos à coarctação da aorta ou a cirurgia fictícia. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo foi menor em 7 dias no grupo coarctado quando comparado aos animais sham, porém, os animais coarctados submetidos a siRNA^{MEF2C} não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

De modo semelhante, o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo se apresentou menor nos animais coarctados com PBS tanto no 7º como 15º dias. Já os animais tratamento com siRNA^{MEF2C} tiveram seu diâmetro sistólico comparável a sham.

A espessura da parede do ventrículo esquerdo apresentou-se maior com 7 dias pós a coartacção da aorta, refletindo o típico crescimento hipertrófico rápido deste modelo. Pode–se observar que os animais coarctados que receberam o siRNA para o MEF2C apresentaram atenuação da hipertrofia cardíaca representada pela menor espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo com 7 e 15 dias.

Observando o parâmetro funcional do ventrículo esquerdo, a fração de encurtamento dos animais coarctados PBS apresentou-se maior em 7 dias em relação aos animais sham, demonstrando uma possível mecanismo de compensação á sobrecarga de pressão. Já os animais coarctados com siRNA para MEF2C no 7º e 15º dias e coarctados PBS no 15º dias, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na função ventricular.

Tabela 1: Avaliação ecocardiográfica de ventrículos esquerdos de camundongos submetidos à coarctação da aorta.

	PBS			siRNA^{MEF2C}	
	Sham	**CoAo 7dias**	**CoAo 15dias**	**CoAo 7 dias**	**CoAo 15dias**
N	15	6	5	4	6
DDVE (mm)	3,7±0,08	3,3±0,09*	3,4±0,01	3,39±0,10$^{\#}$	3,68±0,08†
DSVE (mm)	2,2±0,11	1,7±0,06*	1,9±0,01*	1,87±0,01$^{\#}$	2,10±0,06
EPPVE (mm)	0,74±0,02	1,00±0,03*	1,21±0,01*$^{\#}$	0,8±0,04$^{\#}$	0,73±0,04†
FS (%)	40,4±2,0	48,6±1,3*	44,0±1,9	44,0±1,9$^{\#}$	42,8±1,0

DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, * P <0,05 vs CT; # P <0,05 vs CoAoPBS 7dias, † P <0,05 vs CoAoPBS 15dias. DSVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, * P < 0,05 vs CT, # P < 0,05 vs CoAoPBS 7dias. EPPVE = espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, * P <0,05 vs CT; # P <0,05 vs CoAoPBS 7dias, † P <0,05 vs CoAoPBS 15dias. FS (%)= fração de encurtamento ("fractional shortening") * P < 0,05 vs CT, # P < 0,05 vs CoAoPBS 7dias. Valores apresentados através da média ± erro padrão.

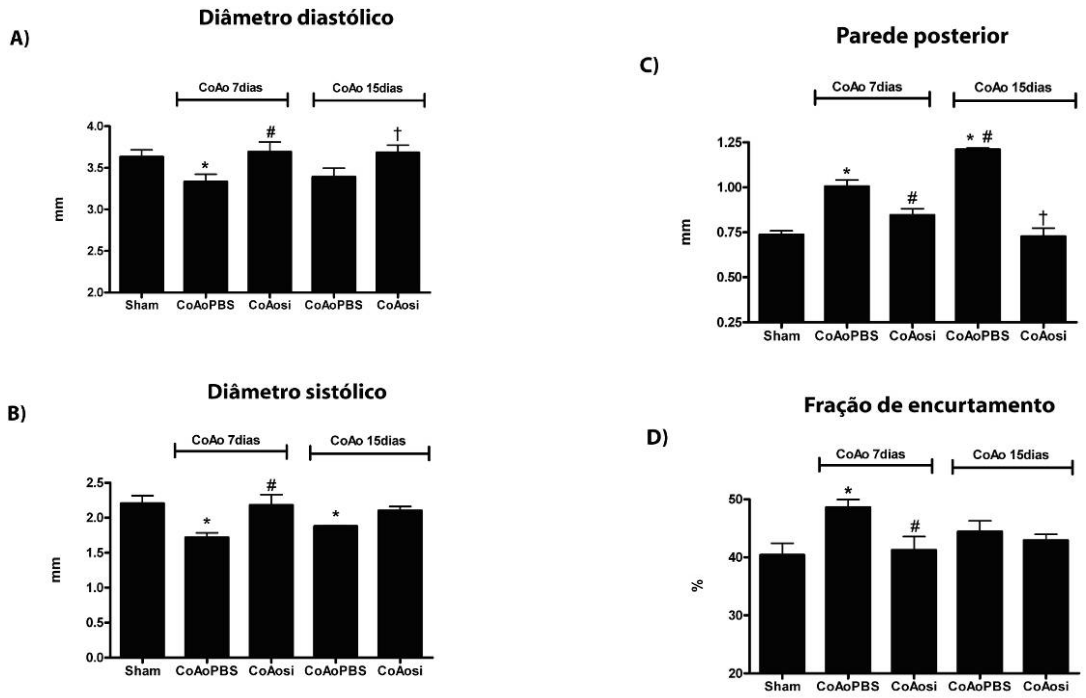


Figura 24: Avaliação ecocardiográfica de ventrículos esquerdos de camundongos submetidos à coarctação da aorta ou sham. sham= animais submetidos a cirurgia fictícia, CoAo = Coarctação transversa da aorta; mm= milímetros, % = porcentagem da fração de encurtamento.
A: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.
B: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.
C: Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo.
D: Porcentagem da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo.
* P <0,05 vs sham, # P <0,05 vs CoAoPBS 7dias, † P <0,05 vs CoAoPBS 15dias.

4.4.4 Avaliação hemodinâmica do ventrículo esquerdo

A avaliação hemodinâmica demonstrou maior pressão sistólica na carótida dos animais coarctados, independente do tratamento recebido. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as pressões arterial sistólica na femural, diastólica e média, além da freqüência cardíaca (Tabela 2).

A avaliação do gradiente sistólico trans-constricção demonstrou que durante todo o período de estudo os camundongos coarctados apresentaram gradiente sistólico aumentado, variando entre 44 e 52 mmHg. Novamante, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados em diferentes tempos após a constricção (Tabela 2 e Figura 25).

Tabela 2: Avaliação hemodinâmica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta.

	PBS				$siRNA^{MEF2C}$		
	Sham	**CoAo 1 dia**	**CoAo 7 dias**	**CoAo 15 dias**	**CoAo 1 dia**	**CoAo 7 dias**	**CoAo 15 dias**
N	22	5	3	12	10	7	5
PaS (mmHg)	121±2	169±4*	171±3*	177±4*	176±7*	171±3*	171±6*
PfS (mmHg)	121±2	125±2	119±2	128±4	133±4	124±3	125±5
GrS (mmHg)	0	44±2	52±2	49±3	43±5	46±1	46±5
PAD (mmHg)	87±2	86±3	88±4	89±3	89±1	88±3	101±3
PAM (mmHg)	104±2	99±3	99±3	102±3	101±2	100±2	108±4
FrCar (bat/min)	426±11	372±26	420±16	377±26	343±54	365±19	365±26

N = número de animais avaliados; PAS= pressão arterial sistólica na aorta, PfS= pressão arterial sistólica na femorral, GrS= gradiente sistólico, PAD= pressão arterial diastólica, PAM= pressão arterial média, FrCar= freqüência cardíaca. *P <0.05 vs. CT-sham.

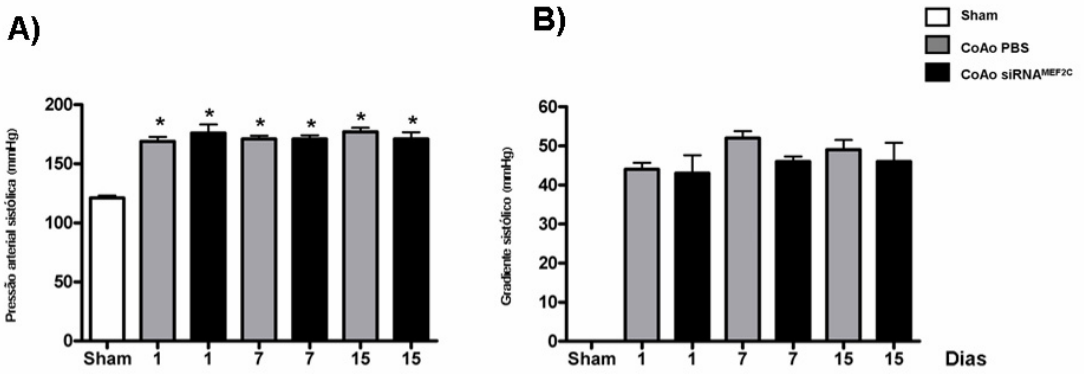


Figura 25: Avaliação hemodinâmica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta.
A: Pressão arterial sistólica da carótida em camundongos controles (Sham) e de camundogos coarctados por 7 e 15 dias (CoAo).
B: Gradiente de pressão arterial – diferença entre a pressão arterial sistólica na carótida e a pressão arterial sistólica na femoral de animais sham e coarctados por 7 e 15 dias.

4.4.5 Avaliação gravimétrica do ventrículo esquerdo

A Tabela 3 e a Figura 26 demonstram a gavimetria do ventrículo esquerdo. Os animais coarctados PBS com seguimento de 7 e 15 dias apresentaram uma hipertrofia característica de aproximadamente 30%. Entretanto os animais coarctados tratados com siRNA para o MEF2C tiveram uma atenuação de aproximadamente 45% quando comparados ao grupo coarctado PBS nos mesmos períodos estudados.

Tabela 3: Avaliação gravimétrica do ventrículo esquerdo. Porcentagem de hipertrofia apresentada pelos animais coarctados em relação aos shams.

		PBS		siRNA^{MEF2C}	
	Sham	**CoAo 7dias**	**CoAo 15dias**	**CoAo 7dias**	**CoAo 15dias**
N	49	15	15	12	10
PVE/PC (mg/g)	28,1±0,3	34,2±0,8*	33,1±1,1*	31,4±0,9*#	31,0±1,1*

PBS= animais tratados somente com veículo PBS, siRNA^{MEF2C}= animais tratados com siRNA para o MEF2C, Sham= animal submetido a cirurgia fictícia, CoAo= animal submetido a cirurgia de coarctação da aorta, N= número de animais estudados, PVE= peso do ventrículo esquerdo, PC= peso corporal. * P <0,05 vs Sham; # P <0,05 CoAoPBS 7dias.

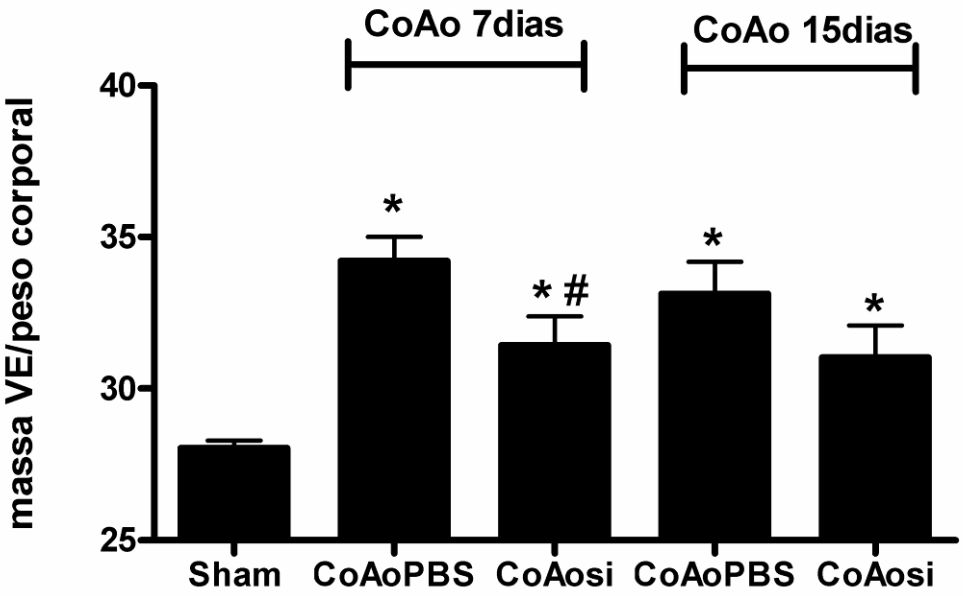


Figura 26: Avaliação do peso relativo do ventrículo esquerdo. Gráficos representativos da razão peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal de camundongos submetidos à coarctação da aorta ou sham, e com ou sem tratamneto com siRNA^{MEF2C}, por 7 e 15 dias e controle (sham). * P <0,05 comparado ao grupo sham; **#** P <0,05 comparado ao grupo CoAoPBS 7 dias, n = 12.

4.4.6 Morfometria do ventrículo esquerdo

Após 7 e 15 dias da injeção preventiva de siRNA^{MEF2C}, animais coarctados ou sham foram sacrificados e secções histológicas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson. Posteriormente, os cortes histológicos foram analisados para a verificação da fibrose, hipertrofia dos miócitos e presença de infiltrado inflamatório. A Tabela 4 apresenta os valores da análise morfométrica do ventrículo esquerdo.

Tabela 4: Análise morfométrica do ventrículo esquerdo.

		PBS		siRNA^{MEF2C}	
	Sham	**CoAo 7dias**	**CoAo 15 dias**	**CoAo 7dias**	**CoAo 15 dias**
N	14	3	4	4	5
Miócitos (µm)	5,4±0,3	6,6±0,4	7,1±0,9*	5,9±0,6	6,4±0,4
FVC (%)	1,6±0,1	1,6±0,2	4,3±1,0#	1,4±0,2	1,4±0,2†
CI (nºcels/mm^2)	51±3	94±6*	76±9*	94±10*	72±10*

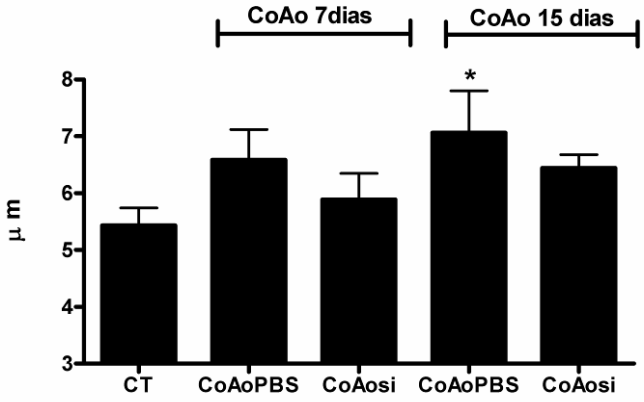
N= número de animais avaliados, µm= unidade utilizada, micrômetro, FVC= fração de volume de colágeno, CI= células inflamatórias. * P <0,05 vs CT, # P <0,05 vs. CoAo PBS e si 7dias, † P <0,05 vs. CoAo si 15 dias.

4.4.6.1 Hipertrofia dos miócitos

Comparando com o grupo sham, o grupo dos animais coarctados PBS foi o único que apresentou maior diâmetro dos cardiomiócitos. Já os animais coarctados submetidos ao silenciamento do MEF2C tanto com 7 e 15 dias, não apresentaram hipertrofia do ventrículo esquerdo (Tabela 4 e Figura 27).

A Figura 28 demonstra exemplos representativos de cortes histológicos de ventrículo esquerdo de camundongos controles e coarctados 15 dias, previamente tratados com PBS ou siRNA^{MEF2C}.

I



II

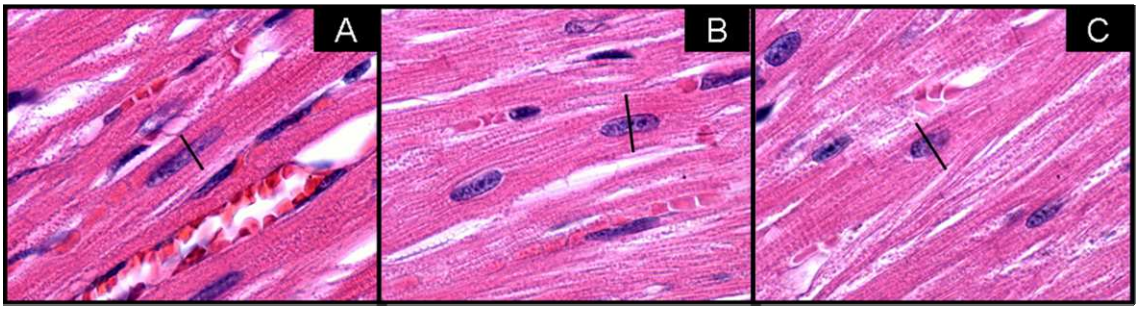
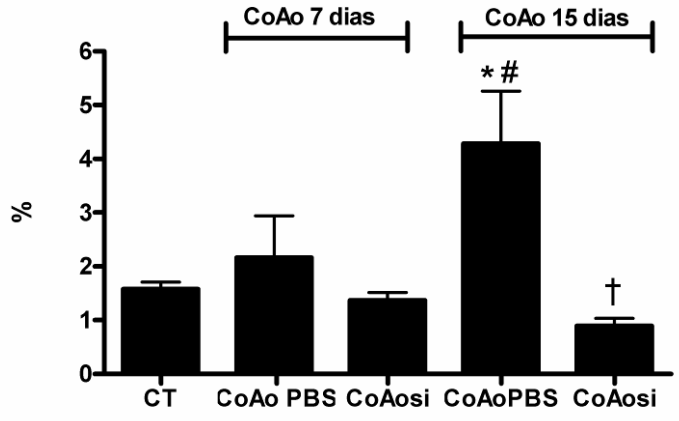


Figura 27: Morfometria do ventrículo esquerdo – Hipertrofia dos mióciotos. P <0,05 vs. CT.
I: Gráfico representativo da quantificação dos diâmetros dos miócitos.
II: Imagens representativas da presença de hipertrofia dos miócitos - Hematoxilina-Eosina (1000X).
A: Miócitos proveniente de camundongo sham.
B: Miócitos proveniente de camundongo coarctado 15 dias PBS.
C: Miócitos proveniente de camundongo coarctado 15 dias siRNA^{MEF2C}.

4.4.6.2 Fibrose miocárdica

A fibrose miocárdica foi predominantemente maior (2,5 vezes) no grupo de coarctado PBS 15 dias quando comparado ao grupo sham. A Figura 28 ilustra exemplos representativos da fibrose miocárdica da cada um dos animais sham, coarctado PBS e coarctado siRNA com seguimento de 15 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa na fibrose miocárdica tanto nos animais coarctados PBS como nos coarctados submetidos ao silenciamento do MEF2C, tanto com 15 dias.

I



II

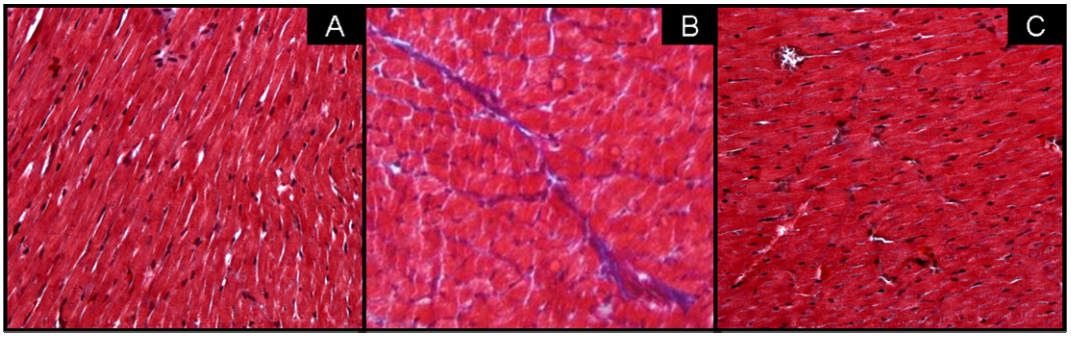
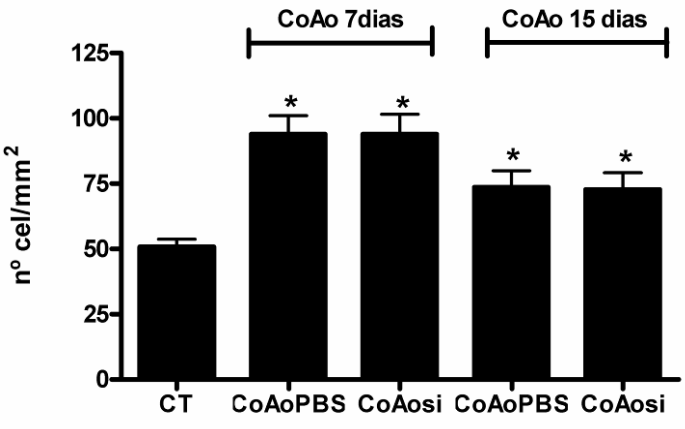


Figura 28: Morfometria do ventrículo esquerdo - Fibrose miocárdica. % = fração de volume de colágeno, * P <0,05 vs CT, # P <0,05 vs CoAo PBS e si 7dias, † P <0,05 vs CoAo si 15 dias.
I: Gráfico representativo da quantificação da fração de volume de colágeno.
II: Fotomicrográficas do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo corado com Tricômio de Masson sob aumento de 200x. A presença de fibrose (fibras colágenas coradas em azul) é evidente nos animais coarctados PBS com seguimento de 15 dias.
A: Miocárdio proveniente de camundongo sham..
B: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 15 dias PBS.
C: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 15 dias siRNA^{MEF2C}.

4.4.6.3 Infiltrado inflamatório

O inflitrado inflamatório foi maior em todos os grupos coarctados independente se tratados com PBS ou siRNA^{MEF2C}, nos dois períodos do estudo. A Figura 29 demonstra o gráfico da quantificação do infiltrado inflamatório e exemplos de lâminas com a presença de células inflamatórias.

I



II

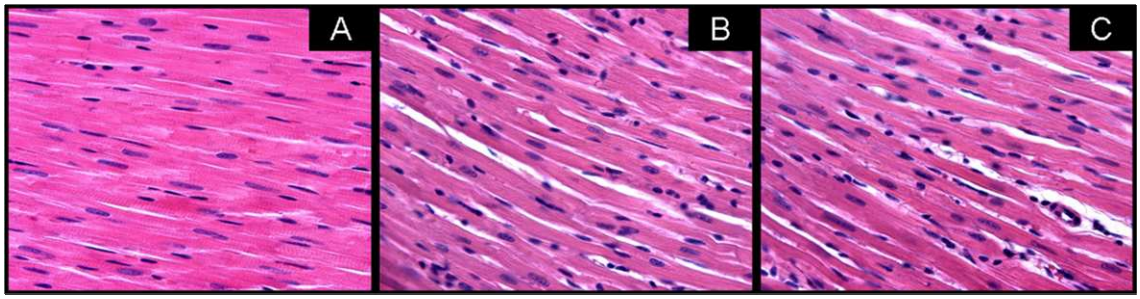


Figura 29: Morfometria do ventrículo esquerdo - Inflitrado inflamatório. * P <0,05 vs CT.
I: Gráfico representativo da quantificação do infiltrado inflamatório.
II: Imagens representativas da presença de infiltrado inflamatório - Hematoxilina-Eosina.
A: Miocárdio proveniente de camundongo sham.
B: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 7 dias PBS.
C: Miocárdio proveniente de camundongo coarctado 7 dias siRNA^{MEF2C}.

4.4.7 Avaliação de marcadores moleculares de hipertrofia

4.4.7.1 Avaliação do marcador β-MHC

Após 1, 7 e 15 dias da injeção preventiva de siRNA^{MEF2C} e coarctação da aorta ou cirurgia fictícia (sham), os animais foram sacrificados e a expressão de β-MHC no miocárdio foi avaliada por RT-PCR multiplex, através da razão β-MHC/GAPDH.

A Figura 30 demonstra os valores arbitrários médios de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para β-MHC normalizados pelos valores obtidos para

GAPDH provenientes de camundongos CT, CoAo-PBS e CoAo-siRNA, observados por 1, 7 e 15 dias. Houve um aumento significativo da expressão normalizada de β-MHC do grupo coarctados com 1 dia de seguimento, tanto ostratados com PBS (CoAo-PBS) como os tratado com siRNA^{MEF2C} (CoAo-siRNA) em relação ao grupo controle (CT). Nos outros grupos de 7 e 15 dias após a coarctação da aorta, os camundongos não apresentaram aumento significativo da expressão normalizada de β-MHC. Não houve diferença significativa na expressão normalizada de β-MHC entre os animais CoAo-PBS e CoAo-siRNA.

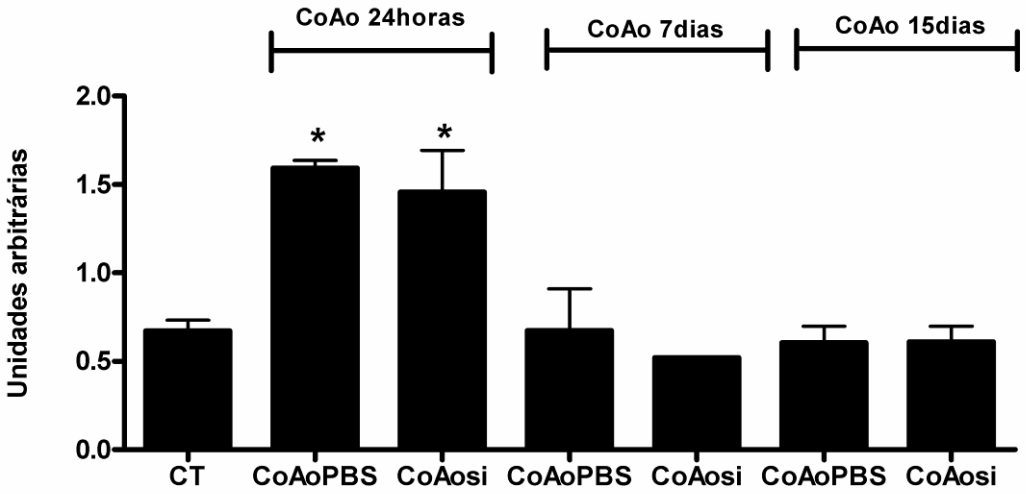


Figura 30: Avaliação da expressão de β-MHC no miocárdio em animais tratados de modo preventivo com siRNA^{MEF2C} ou PBS e coarctados por 1, 7 e 15 dias. Valores arbitrários médios de produtos de RT-PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para β-MHC normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para GAPDH. * P <0,05 vs CT (n = 3).

4.5 Efeito do silenciamento do MEF2C nos níveis de ATP/ADP do miocárdio

Trabalhos da literatura demonstram que o fator de transcrição MEF2 está intimamente ligado a adaptação metabólica que o músculo cardíaco passa durante a sobrecarga pressora, através da regulação da transcrição de genes ligados ao metabolismo energético e de mitocondriogênese. Desse modo, avaliamos como o silenciamento do MEF2C interferiu no balanço energético do músculo cardíaco submetido a sobrecarga pressórica.

Após 1 dia da injeção de siRNA^{MEF2C}, os animais foram submetidos a sobrecarga pressórica através da coarctação da aorta ou a cirurgia fictícia e após mais 1 dia, seus ventrículos esquerdos foram retirados e seus extratos submetidos a extração de nucleosídeos conforme protocolo. A Figura 31 representa os picos de detecção de ATP, ADP AMP e ADO em função do tempo em que foram detectados.

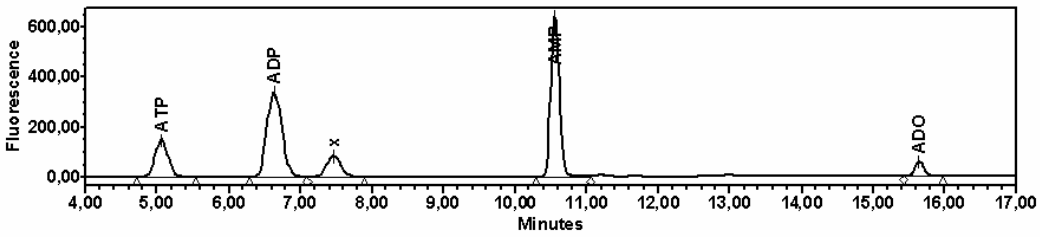


Figura 31: Cromatograma representativo dos picos de detecção de ATP, ADP AMP e ADO.

Os animais que sofreram a coarctação da aorta apresentaram um comparável nível ATP/ADP em relação aos animais sham. Já os camundongos que receberam a injeção de 30µg de siRNA^{MEF2C} apresentaram um menor nível de ATP/ADP em comparação aos animais coarctados que receberam apenas PBS (Figura 32).

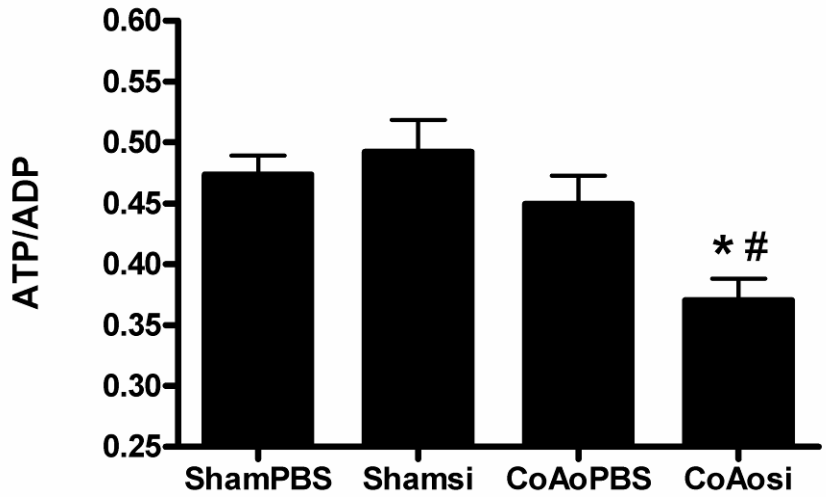


Figura 32: Gráfico representativo da relação ATP/ADT de animais tratados com PBS ou 30µg de siRNA^{MEF2C} que sofreram a coarctação da aorta ou não (sham). * P<0,05 vs Sham PBS e sham si, # P <0,05 vs CoAo PBS (n = 6).

A análise dos níveis de ATP/ADP dos animais coarctados por 7 e 15 dias está apresentada na Figura 33. Nesses grupos não houve diferença estatisticamente significante na relação ATP/ADP.

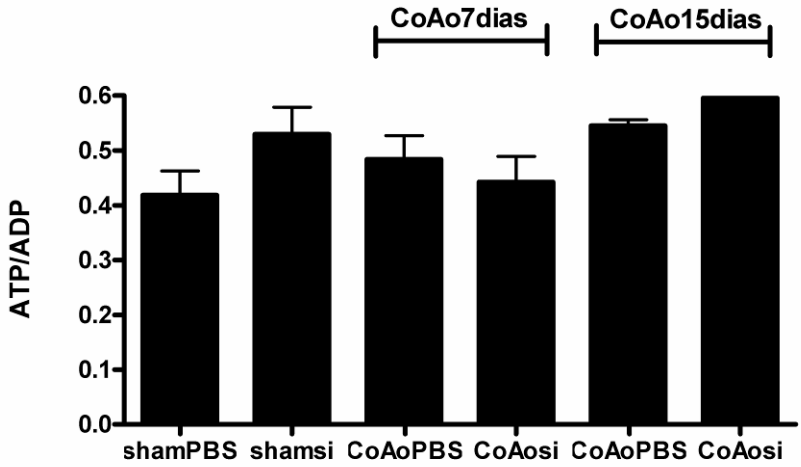


Figura 33: Gráfico representativo da relação ATP/ADP de animais tratados com PBS ou 30µg de siRNA^{MEF2C} que sofreram a coarctação da aorta ou sham. Grupo coarctado 7dias e grupo coarctado 15 dias, (n = 6).

5. Discussão

No presente estudo avaliamos as conseqüências da sobrecarga pressórica induzida por coarctação da aorta e a interferência do tratamento por siRNA para o fator de transcrição MEF2C. Assim, primeiramente demonstramos a padronização do silenciamento, com:

1) o silenciamento de 75% em cultura de células C2C12;
2) a definição de 30µg de siRNA injetada através da veia jugular;
3) o curso temporal com silenciamento significativo até 4 dias;
4) a confirmação do silenciamento do RNA mensageiro do MEF2C pelo real time PCR;
5) a especificidade do silenciamento do MEF2C pela ausência de *off-targets*;
6) a injeção de $siRNA^{GFP}$ não interferindo no nível de expressão protéica do MEF2;
7) a expressão de MEF2A não se alterando com a injeção de $siRNA^{MEF2C}$;
8) silenciamento de 85% do MEF2 em cardiomiócito isolado de coração de camundongo tratado com $siRNA^{MEF2C}$;
9) silenciamento de 70% no pulmão;

O efeito do $siRNA^{MEF2C}$ foi avaliado na estrutura, na função e no nível de ATP/ADP do ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica, assim, demonstramos que:

1) animais coarctados apresentaram um gradiente trans-constricção de 40 mmHg;
2) pela ecocardiografia, os animais que receberam $siRNA^{MEF2C}$ após 7 e 15 dias apresentaram redução na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo;
3) pela gravimetria, observou-se uma atenuação de 45% na hipertrofia dos animais tratados com $siRNA^{MEF2C}$;

4) pela morfometria, houve uma redução fração de colágeno dos animais coarctados por 15 dias tratados com siRNA^{MEF2C};

5) o nível de expressão do marcador de hipetrofia β-MHC foi maior após 1 dia de coarctação;

6) os níveis de ATP/ADP foram menores nos animais tratados com siRNA^{MEF2C} e coarctados por 1 dia.

A avaliação da especificidade do siRNA *in silico* foi feita por análises computacionais com bases em bancos de dados disponíveis na rede. Desse modo, pode-se observar que a molécula de siRNA com alvo para o MEF2C apresentou alta especificidade, sendo este de 21 pares de bases, contra 14 de proteínas da mesma família. Deve-se lembrar que quando o pareamento do siRNA com RNA mensageiro for abaixo de 15 pares de bases, o silenciamento é prejudicado. Apesar de existir alguma similaridade entre os membros da família MEF2 isso não indica problema no silenciamento inespecífico de algum outro membro da família como já dito anteriormente.

Os ensaios de siRNA foram realizados primeiramente em cultura de células C2C12 para testar o silenciamento em um sistema isolado. Desse modo, encontramos um silenciamento mais efetivo quando a transfecção foi realizada no quarto dia de diferenciação quando as células não mais se multiplicam e, portanto o efeito do siRNA não estaria sendo diluído.

A otimização do silenciamento em camundongos foi realizada através de ensaios para verificação da melhor dose de siRNA, do curso temporal e da especificidade do silenciamento. Para o teste de dose resposta, utilizamos primeiramente uma dose de 15μg, sendo que essa já estava sendo utilizada anteriormente no laboratório (CLEMENTE CF, et al, 2007) para outro alvo, porém com essa dose observamos um silenciamento inferior a 30%. Assim, para que ocorresse um silenciamento efetivo, entre 70 e 90%, passamos a testar dose maior de 30μg e desse modo, conseguimos um silenciamento de 85%, que se apresentou satisfatório e foi escolhido para posteriores ensaios.

Em estudos anteriores do nosso laboratório, CLEMENTE CF, et al, 2007, demonstrou a padronização do silenciamento da FAK (quinase de adesão focal) em corações de camundongos. Testando a melhor dose de siRNA para a FAK (Focal adhesion kinase) este trabalho mostrou que a injeção de 5µg de siRNA não se apresentou eficiente para o silenciamento, porém quando a dose foi elevada para 15µg pode-se observar uma diminuição de 75% na expressão protéica. Do mesmo modo, MODLINGER P e colaboradores (2007), testaram injeções de 5µg de siRNA para o gene da p22phox onde observaram uma diminuição na excreção de 8-isoprostano de apenas 20%, e quando a dose foi acertada para 50µg essa diminuição na excreção passou para 50%. Em recente estudo, SORENSEN DR e colaboradores (2003), transfectaram, em camundongo adulto, plasmídio que codifica a proteína GFP e quando esses animais foram tratados com 30µg de siRNA tiveram uma significativa diminuição do RNAm dessa proteína.

O silenciamento foi observado pela diminuição da quantidade de proteína e também foi confirmado através de PCR em tempo real, para a quantificação de RNA mensageiro presente no ventrículo esquerdo. Essa confirmação foi necessária para se comprovar que a técnica de siRNA foi efetiva tanto na diminuição do transcrito quanto na degradação do RNA mensageiro. Outro fato é que escolhemos utilizar *primers* específicos para o MEF2C e para o MEF2A, em que o primeiro apresentou significativa diminuição e o segundo não se alterou. Desse modo, o silenciamento se comprova efetivo e específico.

A injeção de 30µg de $siRNA^{MEF2C}$ em camundongos diminuiu em 85% a expressão de MEF2C 1 dia após a injeção, assim, testamos por quanto tempo o silenciamneto era efetivo no miocárdio. Para isso, através da técnica de western blotting, observamos que o silenciamento máximo estava entre 1 e 4 dias após a injeção. Também através da técnica de PCR em tempo real não foi observado silenciamento após 7 dias da injeção. No entanto, em estudos anteriores, CLEMENTE CF, et al, 2007, demonstrou que a injeção de 15µg de siRNA através de veia jugular diminuiu a expressão da FAK em 75% após 1 dia de injeção, sendo que com a mesma dose o silenciamento permaneceu por até 15 dias. Em outro trabalho, foi observado que o efeito máximo do silenciamento estava entre 36 e 72 horas (MODLINGER P, et

al, 2007), dado que confirma nossos resultados, uma vez que também observamos um silenciamento máximo entre 1 e 4 dias após a injeção.

O siRNA para o MEF2C foi injetado de forma rápida na veia jugular de camundongos Swiss. A escolha dessa via de administração se deu pelo fato da injeção pela jugular ter como principal alvo o coração, e assim o silenciamento ser mais efetivo neste órgão. A injeção através da veia caudal, que também já foi descrita na literatura (CLEMENTE CF, et al, 2007), já demonstrou não apresentar efeito de silenciamento no miocárdio, provavelmente pelo siRNA chegar diluído no coração. Porém, existem outras formas de injeção sendo a transfecção hidrodinâmica uma injeção rápida de grande volume de siRNA com mudança transiente na pressão venosa. Esse tipo de administração é utilizado para o silenciamento de genes em órgãos com grande volume sanguíneo, como rim e vasos sanguíneos. Essa técnica apresenta inviabilidades, uma vez que a alta concentração de siRNA pode ativar vias de Interferon. Utilizando a técnica de injeção rápida, como no nosso caso, o estudo anterior ao nosso trabalho demonstrou que a via de interferon não estava ativada. Utilizando a técnica de injeção hidrodinâmica, HAMAR P, et al, 2004 demonstrou que a injeção de 50µg de siRNA diminuiu a expressão de RNA mensageiro em 74%, 1 dia após a injeção. Nesse mesmo estudo, foi também realizado injeção direta no rim da mesma quantidade se siRNA, porém em menor quantidade de PBS (0,1ml), sendo que os animais apresentaram uma melhor sobrevida. Podemos observar que esses resultados são semelhantes ao do nosso estudo.

Sendo o músculo cardíaco constituído de diferentes tipos celulares, decidimos por verificar o silenciamento especificamente no cardiomiócito. Sendo assim, células foram isoladas de corações de camundongos tratados com $siRNA^{MEF2C}$ após 1 dia. O *western blotting* mostrou que os cardiomiócitos apresentaram a mesma proporção de silenciamento do coração total. CLEMENTE CF, et al, 2008 também verificou um resultado semelhante, tanto em cardiomiócitos quanto em fibroblastos isolados de corações silenciados para a FAK.

Como a injeção do siRNA se faz através da veia jugular o efeito do silenciamento pode ser observado também em outros órgãos, uma vez que a via é sistêmica. Desse modo, observamos que o pulmão apresentou um silenciamento

semelhante ao encontrado do coração. Já o rim, que é um órgão localizado no final da circulação apresentou um silenciamento mais discreto, porém, não sendo significativo. Provavelmente o silenciamento seria também observado em outros órgão além dos estudados, isso dá margens para novos estudos com a utilização do siRNA no caso de doenças com acometimento sistêmico. Por outro lado, quando for necessário o silenciamento especifico para um único órgão, deve-se atentar para a escolha de um siRNA direcionado para o órgão a ser silenciado.

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 KG, et al, 2000; TORSONI AS, 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 40 mmHg em todos os seguimentos do estudo, sendo que os animais coarctados tratados com siRNA não apresentaram diferença nesse gradiente. Em estudo anterior do nosso laboratório, NADRUZ WJr, et al, 2003, mostrou que a coarctação da aorta em ratos causou um aumento na pressão sistólica na aorta de 40mmHg, dado que confirma os nossos resultados. Outros parâmetros hemodinâmicos, como freqüência cardíaca e pressão arterial média não forma alterados, também indicando que o tratamento com siRNA não modifica a pressão sistêmica dos animais.

Vários estudos demonstraram a importância do MEF2, sendo que animais que não possuem expressão desse fator de transcrição apresentam várias deformações principalmente no que se refere ao desenvolvimento cardíaco. Em cultura de células, a expressão de um dominante negativo inibe a cardiomiogênese em células P19, e em animais transgênicos a cardiogênese está do mesmo modo inibida. Esses animais também apresentaram uma severa deformação das câmaras cardíacas, indicando defeitos de diferenciação, proliferação e maturação das câmaras (KARAMBOULAS C, et al, 2006).

Neste trabalho foi avaliado o efeito do silenciamento do siRNA para o fator de tanscrição MEF2C em corações submetidos a hipertrofia cardíaca. O silenciamento transitório do fator de transcrição MEF2C demonstra a importância dessa proteína no

desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressora. Essa avaliação foi realizada de diversas formas, sendo que a análise ecocardiográfica foi a primeira delas. A avaliação ecocardiográfica demonstrou que os animais que sofreram a coarctação da aorta apresentaram fenótipo de hipertrofia cardíaca, com aumento da espessura da parede posterior e da fração de encurtamento, já os diâmentro diastólico, e sistólico se apresentaram diminuídos com 7 dias de sobrecarga, típico do modelo. O aumento da espessura da parede posterior demonstra uma hipertrofia compensatória ao aumento de tensão na parede do miocárdio. Com 15 dias de coarctação os animais coarctados apresentaram o mesmo padrão de modificações estruturais sendo que o parâmetro funcional, a fração de encurtamento, já se apresenta igual aos animais sham, indicando um início de descompensação que provavelmente se estabeleceria por volta do 21º dia de coarctação. O tratamento com $siRNA^{MEF2C}$ manteve os diâmetros diastólico e sitólico, a espessura da parede e a função do miocárdio ao longo do tempo, indicando que o siRNA previniu o desenvolvimento da hipertrofia e as conseqüências funcionais relacionadas a ela.

Vários trabalhos analisaram os efeitos dos membros da família MEF2 na função do ventrículo esquerdo, entre eles, KIM Y e colaboradores (2008) apresentou um trabalho com 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 o 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 β-adrenérgica. Em outro caso, camundongos *knockout* para o MEF2A apresentaram dilatação dos ventrículos esquerdo e direito sem evidências de hipertrofia, sendo que a morte súbita foi responsável pó 13% das perdas nos animais adultos viáveis.

Por outro lado, a análise da hiperexpressão do MEF2 A e C demonstrou resultados semelhantes. A hiperexpressão de MEF2A por 3 semanas, resultou em aumento do diâmetro diastólico e sistólico e diminuição da fração de encurtamento, fenótipo típico de cardiomiopatia dilatada. Quando esses mesmos animais foram submetidos à sobrecarga pressórica por coarctação da aorta os transgênicos

apresentaram um maior aumento da razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal comparados aos animais selvagens. A avaliação ecocardiográfica da hiperexpressão de MEF2C após 3 meses, demonstrou que esse animais possuíam aumentos dos diâmetros diastólico e sistólico e diminuição da espessura da parede posterior e da fração de encurtamento (XU J, et al, 2006).

A análise gravimétrica demonstrou que os animais coarctados apresentaram um aumento na razão peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal indicando a efetividade do método de sobrecarga pressórica. Os animais que receberam a injeção de siRNA^{MEF2C} demonstraram atenuação de aproximadamente 45% na hipertrofia, após 7 e 15 dias de sobrecarga pressórica através da coarctação da aorta. O siRNA^{MEF2C} não bloqueou completamente o desenvolvimento da hipertrofia, provavelmente por não ser o único fator envolvido nesse processo e também pelo fato do silenciamento não ser total e permanente. Em um trabalho recente, camundongos submetidos à estimulação adrenérgica e mecânica apresentaram um aumento de 59% da razão peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal após 21 dias, enquanto que os animais *knockout* para o MEF2D esse aumento foi de apenas 27% (KIM Y, et al, 2008). Ao mesmo tempo a razão do peso de ventrículo esquerdo pelo peso corporal dos camundongos que hiperexpressam MEF2C também estava aumentada após 3 meses, no entanto, com 1 e 2 meses essa razão permaneceu inalterada (XU J, et al, 2006).

A análise histológica mostrou que os animais coarctados por 15 dias apresentaram um aumento significativo na fração de volume de colágeno e que o tratamento por siRNA^{MEF2C} diminuiu esse parâmetro para quase valores dos animais controles. Esse efeito tardio do tratamento do siRNA se deu possivelmente pela proteção oferecida pelo silenciamento na fase aguda do processo hipertrófico, uma vez que já com 7 dias não há evidências de silenciamento. A diminuição da fração de volume de colágeno nos animais silenciados indica uma grande importância na função do miocárdio hipertrófico, uma vez que a fibrose relaciona-se a um aumento do fator de risco para doenças cardiovasculares (MANN DL, et al, 2005). Sabe-se que no coração o colágeno I e III são os predominantes. O colágeno III é maleável e flexível, já o I é rígido. Em situação basal, o coração apresenta uma maior proporcionalidade do colágeno III em relação ao I, entretanto, quando há fibrose miocárdica essa

proporcionalidade altera-se, com predomínio do I. Essas modificações estruturais determinam a rigidez miocárdica e o déficit de relaxamento ventricular (JANICKI JS, et al, 2002).

O aumento da fração de volume de colágeno no grupo coarctado 15 dias indica também um mau prognóstico, uma vez que a fibrose contribui para a insuficiência cardíaca congestiva e falência cardíaca. Entretanto, o tratamento com siRNA a longo prazo pode levar a preservação da função cardíaca. Em estudos anteriores do nosso laboratório, CLEMENTE CF, et al, 2007 demonstrou que o silenciamento da FAK diminui significativamente a fibrose o que está relacionado com a sobrevida dos animais.

A análise morfométrica também mostrou que apesar dos aumentos significativos no peso do ventrículo esquerdo, o tamanho dos cardiomiócitos nos animais coarctados se apresentou discretamente aumentados com 7 dias e significativamente aumentado com 15 dias, sendo que o tratamento com o siRNA não influenciou os valores encontrados. Em um trabalho publicado recentemente, os camundongos submetidos à sobrecarga pressórica e que não expressavam MEF2D apresentaram um cardiomiócito 50% menor comparado ao selvagem coarctado e tiveram também diminuição na fração de colágeno (KIM Y, et al, 2008).

Vários estudos demonstram a presença de células inflamatórias durante o processo de remodelamento cardíaco, como no caso em que ocorre recrutamento e ativação de monócitos e macrófagos após o infarto do miocárdio sendo que a presença dessas células está associada a formação de fibrose (TAKAHASHI M, et al, 2006). Em outro estudo foi verificado que ocorre aumento da proteína quimioatraente de monócitos, MCP-1 em animais infartados e quando se obtém um animal com deleção da mesma proteína observa-se uma melhora na sobrevida dos camundongos (HAYASHIDANI S, et al, 2003). Por outro lado a presença de monócitos/macrófagos no miocárdio está associada ao surgimento de novos vasos sanguíneos por secreção de fatores angiogênicos e portanto representa um melhor prognóstico no caso de eventos isquêmicos do miocárdio (MOLDOVAN NI, et al, 2000). No nosso caso também foi verificada a presença de infiltrado inflamatório no modelo de coarctação da aorta pois todos os grupos coarctados apresentaram significativo aumento de células

inflamatórias, porém, o tratamento com siRNA^{MEF2C} não alterou a quantidade de células presentes no ventrículo esquerdo submetido a sobrecarga pressora. Esse aumento do infiltrado inflamatório já era esperado uma vez que as células inflamatórias estão presentes com intuito de fagocitar os restos celulares dos cardiomiócitos que morrem por apoptose com o aumento da pressão no músculo cardíaco.

O aumento de expressão de β-MHC no grupo de animais coarctados já era esperado uma vez que β-MHC é um clássico marcador de hipertrofia cardíaca. Portanto, estes dados estão de acordo com CLEMENTE CF e colaboradores (2008) estudo que demonstrou um aumento da expressão de β-MHC nos animais submetidos a sobrecarga pressora por 1 e 2 semanas, porém, quando tratados com siRNA^{FAK} apresentaram redução na expressão deste marcador hipertrófico. NAYA FJ, et al, 2002 mostrou que camundongos *knockout* para o gene do MEF2A, com 4 a 5 dias de vida, apresentaram uma expressão aumentada de marcadores de hipertrofia cardíaca, como a α-actina cardíaca, que estava aumentada onze vezes em relação ao animal selvagem. Esse aumento provavelmente está relacionado a mecanismos de compensação, uma vez que a α-actina esquelética se apresentava diminuída. Nesse estudo, outros marcadores também estavam aumentados como o ANF e o BNP, sendo que esse resultado de apresentou equivocado uma vez que o MEF2 regula a expressão de ANF. No nosso caso a injeção de siRNA não alterou a expressão de β-MHC em nenhum dos tempos estudados. No trabalho de NAYA FJ e colaboradores (2002) os animais também não apresentaram alterações na expressão de β-MHC, indicando que esses camundongos não sofreram com o fenótipo típico de falência cardíaca. Por outro lado, animais que hiperexpressão MEF2 A ou C possuem modificações na expressão de marcadores de hipertrofia e falência cardíaca. Nos animais transgênicos que expressam uma quantidade elevada de MEF2A, existe um fenótipo marcado de cardiomiopatia dilatada e possuem aumento de ANF e α-actina esquelética. Já nos animais que hiperexpressam MEF2C os marcadores ANF, BNP, α-MHC, α-actina esquelética e β-MHC estão elevados (XU J, et al, 2006).

Cardiomiopatias são frequentemente associadas com mutações no DNA mitocondrial e/ou doenças mitocondriais. A função cardíaca é profundamente influenciada por flutuações da atividade metabólica das células musculares. Sendo

assim o fator de transcrição MEF2 pode estar envolvido nesses mecanismos de regulação do metabolismo energético. Camundongos homozigotos para uma mutação no gene do MEF2A-/- apresentam bradicardia severa e arritmias cardíacas. Esses animais apresentam também diminuição na expressão de genes que codificam proteínas mitocondriais, e, portanto, demonstraram deficiência mitocondrial (NAYA FJ, et al, 2002). Um provável mecanismo para esses achados seria de que o MEF2A estaria agindo na via regulatória que promove a biogênese mitocondrial pela interação com o PGC1α.

O silenciamento do MEF2C no ventrículo esquerdo submetido a sobrecarga pressora, possivelmente interferiu no mecanismo de regulação energética no qual esse fator de transcrição estaria envolvido. Mecanismo este que seria responsável pela adaptação do músculo cardíaco ao estresse mecânico provocado pela coarctação da aorta. Essa interferência se apresentou através da diminuição da relação ATP/ADP nos animais que sofreram com a sobrecarga pressórica, diminuição esta que se tornou ainda mais evidente nos animais que receberam injeção de siRNA. QIN W e colaboradores (1997) demonstrou importante interação entre o gene da creatina quinase mitocondrial sarcomérica e o fator de transcrição MEF2. Essa proteína quinase é expressa em órgãos com grande atividade metabólica e oxidativa como o músculo esquelético. Seu gene possui uma região rica em A/T por onde o MEF2 se liga e controla a sua expressão, regulando assim atividade metabólica das células musculares. Já nos grupos coarctados por 7 e 15 dias não foi observada diminuição na relação ATP/ADP uma vez que provavelmente nesse período o miocárdio já entrou em uma fase de compensação metabólica. Pode-se observar que com 7 dias de coarctação nos animais que receberam uma injeção de $siRNA^{MEF2C}$, houve uma tendência na diminuição da relação ATP/ADP, porém, essa diminuição não se apresenta significativa. Em relação ao grupo coarctado 15 dias que recebeu 30ug de $siRNA^{MEF2C}$ os níveis da razão ATP/ADP se mantiveram constantes, esses resultados eram esperados uma vez que com 7 e 15 dias o silenciamento não é evidente e o músculo cardíaco já está em compensação.

6. Conclusão

Concluímos que o fator de transcrição MEF2C regula múltiplos aspectos da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica, tais como a expressão de genes sarcoméricos e genes envolvidos na adaptação metabólica do músculo cardíaco.

7. REFERÊNCIAS BLIBLIOGRÁFICAS

BACKS J & OLSON EN. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. Circ. Res. 2006, 6, 98(1):15-24.

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.

CHIEN KR. Stress pathways and heart failure. Cell. 1999, 98: 555-558.

CLEMENTE CF, CORAT MA, SAAD ST, FRANCHINI KG. Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2005, 289(3):R862-70.

CLEMENTE CF, TORNATORE TF, THEIZEN TH, DECKMANN AC, PEREIRA TC, LOPES-CENDES I, SOUZA JR, FRANCHINI KG. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. Circ. Res. 2007, 7,101(12):1339-48.

ELBASHIR SM, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001, 24,411(6836): 494-8.

FRANCHINI KG, TORSONI AS, SOARES PH, and 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.

GUIDO MC, FRIMM CC, KOIKE MK, CORDEIRO FF, MORETTI AI and GODOY LC. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction in aortocaval fistula. Clin. and Exper. Pharm. and Phys. 2007, 34, 1165–1172.

HAMAR P, SONG E, KÖKÉNY G, CHEN A, OUYANG N, LIEBERMAN J. Small interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2004, 12, 101(41):14883-8.

HAYASHIDANI S, TSUTSUI H, SHIOMI T, IKEUCHI M, MATSUSAKA H, SUEMATSU N, WEN J, EGASHIRA K, TAKESHITA A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. Circulation. 2003 28;108(17):2134-40.

HUNTER JJ & CHIEN KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. N. Engl. J. Med. 1999, 21,341(17):1276-83.

JANICKI JS, BROWER GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. J Card Fail. 2002 8(6 Suppl):S319-25.

JANSON CG, CHEN Y, LI Y and LEIFER D. Functional regulatory regions of human transcription factor MEF2C. Brain Res. Mol. 2001, 16, 97(1):70-82.

KARAMBOULAS C, DAKUBO GD, LIU J, DE REPENTIGNY Y, YUTZEY K, WALLACE VA, KOTHARY R, SKERJANC IS. Disruption of MEF2 activity in cardiomyoblasts inhibits cardiomyogenesis. J. Cell Sci. 2006, 15, 119(Pt 20):4315-21.

KATAYAMA M, MATSUDA Y, SHIMOKAWA K.-I, TANABE S, KANEKO S, HARA I, SATO H. Simultaneous determination of six adenyl purines in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. J. Chromatogr. 2001, 25,760(1):159-63.

KATZ AM. The cardiomyopathy of overload: A major determinant of prognosis in congestive heart failure. N. Engl. J. Med. 1990, 322:100-110.

KAWAMOTO Y, SHINOZUKA K., KUNITOMO M, HAGINAKA J. Determination of ATP and its metabolites released from rat caudal artery by isocratic ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 1998, 15,262(1):33-8.

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.

KOBARG CB, KOBARG J, CROSARA-ALBERTO DP, THEIZEN TH, FRANCHINI KG. MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. FEBS Lett. 2005, 9,579(12):2615-22.

KOIKE MK, FRIMM CC, and CÚRI M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction. Int. J. Exp. Path. 2007, 88, 279–290.

KOLODZIEJCZYK SM, WANG L, BALAZSI K, DEREPENTIGNY Y, KOTHARY R, and MEGENEY LA. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. Curr. Biol. 1999, 9:1203.

LEVY D, GARRISON RJ, SAVAGE DD, KANNEL WB, CASTELLI WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. N Engl J Med. 1990, 322:1561-6.

LIN Q, SCHWARTZ J, BUCANA C and OLSON E. Control of mouse cardio-myogenesis by transcription factor MEF2C. Science. 1997, 276, 404–1407.

MANN DL, BRISTOW MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. Circulation. 2005 31;111(21):2837-49.

MILL JG & VASSALLO DV. Hipertrofia cardíaca. Rev. Bras. Hipertens. 2001, 8: 63-75.

MODLINGER P, CHABRASHVILI T, GILL PS, MENDONCA M, HARRISON DG, GRIENDLING KK, LI M, RAGGIO J, WELLSTEIN A, CHEN Y, WELCH WJ, WILCOX CSRNA. Silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response. Hypertension. 2006, 47(2):238-44.

MOLDOVAN NI, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, PARKER-THORNBURG J, SHAPIRO SD, KOLATTUKUDY PE. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. Circ. Res. 2000, 1;87(5):378-84.

MOLKENTIN JD & DORN GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. Annu. Rev. Physiol. 2001, 63: 391.

MOLKENTIN JD & MARKHAM BE. Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. J. Biol. Chem. 1993, 15, 268(26):19512-20.

NADRUZ WJr, KOBARG CB, CONSTANCIO SS, CORAT PD and FRANCHINI KG. Load-induced transcriptional activationof c-jun in rat myocardium – regulation by Myocyte Enhancer Factor 2. Circ. Res. 2003, 92, 225–243.

NAYA FJ, BLACK BL, WU H, BASSEL-DUBY R, RICHARDSON JA, HILL JA and OLSON EN. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. Nat. Med. 2002, 8, 1303–1309.

NOBRE F, LIMA, NEREIDA KC. Hipertensão Arterial: Conceito, Classificação e Critérios Diagnósticos. IN Manual de Cardiologia SOCESP - Cap. 70, pág. 303 - Atheneu – 2000.

OLSON, EN & SCHNEIDER, MD. Sizing up the heart: development redux in disease. Genes Dev. 2003, 17, 1937–1956.

OMENS JH. Stress and strain as regulators of myocardial growth. Prog Bioph and Molec Biol. 1998, 69:559-572.

PEREIRA TC, PASCOAL VD, MARCHESINI RB, MAIA IG, MAGALHÃES LA, ZANOTTI-MAGALHÃES EM, LOPES-CENDES I. Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. Exp. Parasitol. 2008, 118(4):619-23.

QIN W, KHUCHUA Z, KLEIN SC, STRAUSS AW. Elements regulating cardiomyocyte expression of the human sarcomeric mitochondrial creatine kinase gene in transgenic mice. J. Biol. Chem. 1997 3; 272(40):25210-6.

RITTER O, NEYSES L The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. Trends Mol. Med. 2003, 9(7):313-21.

SADOSHIMA J, IZUMO S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol. 1997, 59:551-571.

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.

SCHIAFFINO S & REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol. Rev. 1996, 76, 371–423.

SØRENSEN DR, LEIRDAL M, SIOUD M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. J. Mol. Biol. 2003, 4; 327(4):761-6.

TAKAHASHI M, IZAWA A, ISE H, HONGO M, KOLATTUKUDY PE, IKEDA U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Circ. Res. 2006, 13;99(8):891-9.

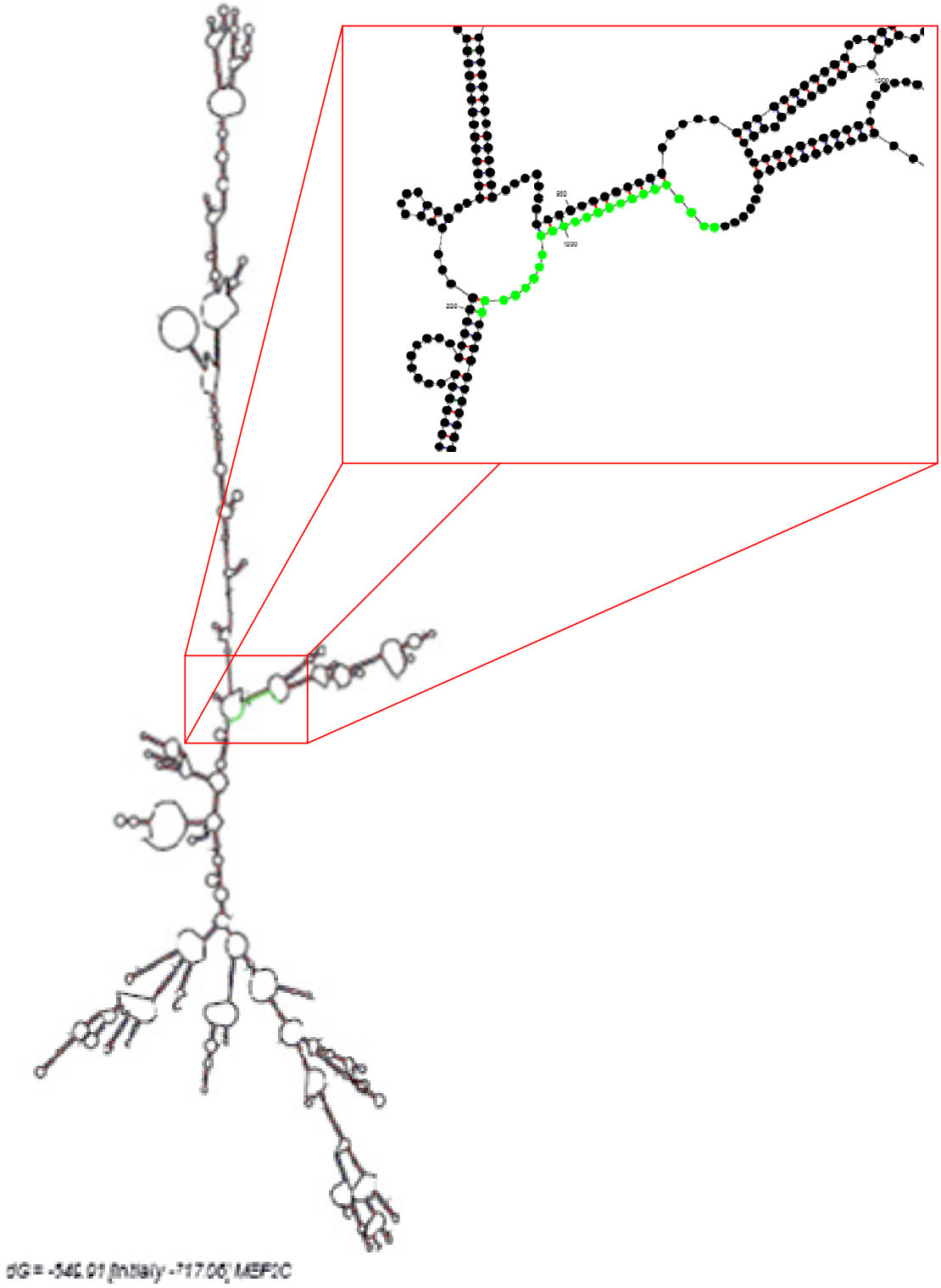
TORSONI AS, FONSECA PM, CROSARA-ALBERTO DP, FRANCHINI KG. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. Am J Physiol Cell Physiol. 2003, 284:C1411-C1419.

TORSONI AS, MARIN TM, VELLOSO LA, FRANCHINI KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005, 289:H1488.

XU J, GONG NL, BODI I, ARONOW BJ, BACKX PH, and MOLKENTIN JD. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. J. Biol. Chem. 2006, 7, 281(14):9152-62.

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.

Anexo

ANEXO 1

ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO RNAM DO GENE ALVO MEF2C PARA IDENTIFICAÇÃO DA REGIÃO DE MAIOR ACESSIBILIDADE PARA O COMPLEXO RISC (MULTIPROTEIN RNA INDUCED-SILENCING COMPLEX).