

CLÁUDIA RAQUEL CANTARELLI COSTA

***AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY
EM CORAÇÕES DE RATOS SUBMETIDOS
À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da aluna CLAUDIA RAQUEL CANTARELLI.

31/07/2002

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

CAMPINAS

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

CLÁUDIA RAQUEL CANTARELLI COSTA

***AValiação DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY
EM CORAÇÕES DE RATOS SUBMETIDOS
À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2002

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

77 11 00000

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno(a): CLAUDIA RAQUEL CANTARELLI

Orientador(a): Prof.Dr. KLEBER GOMES FRANCHINI

Kleber Franchini

Membros:

Professor Doutor Jörg Kobarg

Jörg Kobarg

Professor Doutor Eduardo Melani Rocha

Eduardo Rocha

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 31/07/2002

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais José e Cleonice, a minha irmã Tânia e ao meu noivo Luciano.

Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Prof.Dr. Kleber Gomes Franchini pela grande oportunidade de desenvolver este projeto de pesquisa, por ter me orientado e ajudado durante o desenvolvimento de minha tese;

Aos prezados professores:

Dr. Jörg Kobarg por disponibilizar espaço no laboratório para a realização da técnica de Gel Shift.

Dr. Fernando Costa por possibilitar a realização das técnicas de clonagem e seqüenciamento.

Aos mais que especiais amigos:

Sábata, pela grande ajuda experimental, pela maravilhosa amizade pela confiança e pelo apoio.

Carolina, pelo socorro nas horas difíceis e por ter se tornado uma amiga tão essencial quanto querida;

Cláudia, pela imensa ajuda na realização do Gel Shift, assim como em todas às vezes que necessitei e pela preciosa amizade.

Wilson, pela ajuda experimental na realização do Ensaio de Kinase *in vitro*, pela amizade e pela maravilhosa convivência.

Ao valquer, pela imensa ajuda e amizade.

A Daniela, por estar sempre disposta a me ajudar.

Ao Luciano Nogueira, pela ajuda na realização da técnica de imunohistoquímica e pela agradável companhia.

A querida Thaís, por toda indispensável ajuda na experimentação animal.

A todos os amigos do laboratório: Adriana, Rodrigo, Patrícia, Graciela, Priscila Fonseca, Priscila Perez e Jeniffer, que sempre me ajudaram e pela agradável convivência durante estes três anos.

Aos amigos Cristina e Ronaldo, pelo apoio e incentivo.

Ao meu noivo Luciano, pela compreensão, apoio e exemplo.

A minha maravilhosa família, que sempre esteve presente, acreditou e ajudou-me.

*"Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão, perder com
classe e viver com ousadia, pois, o triunfo
pertence a quem se atreva....*

E a vida é muito para ser insignificante"

Charles Chaplin

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xviii</i>
INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Modelo de sobrecarga pressora.....	28
2. mRNA Differential Display de miocárdios de ratos submetidos á sobrecarga de pressão.....	29
3. Escolha e determinação da identidade dos produtos de RT-PCR com expressão diferencial.....	35
4. Análise comparativa dos produtos no Banco de Genes.....	42
5. Estudos funcionais.....	42
6. Análise estatística.....	48
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Bovina Sérica
°C	grau Celsius
cdna	DNA complementar
CoAo	coarctação da aorta
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Mix deDioxinucleotídeos (A,T,C e G)
$\pm dP/dT$	derivada da pressão pelo tempo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
EMSA	Eletrophoresis Mobility Shift Assay
FC	Frequência cardíaca
g	gramas
GS	Gradiente Sistólico
h	hora (s)
IKK	Inhibitor of nuclear factor kapp-B kinase
IPTG	Isopropil tio- β -galactosídeo
kb	kilobases
KCl	Cloreto de potássio
kDa	kilo Dalton
l	litro
M	Molar

mA	miliamperes
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	minutos
ml	mililitro
MM	milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MOPS	3(N-morfolino)ácido propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
mV	milivolts
NaCl	Cloreto de sódio
NFkB	Nuclear factor kappa-B
nmol	nanomol
pb	par (es) de base(s)
PCR	Reação de Polimerase em cadeia
PDFVE	Pressão Diastólica Final no Ventrículo Esquerdo
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorido
pmol	picomol
PSAA	Pressão Sistólica na Aorta Abdominal
PSVE	Pressão Sistólica no Ventrículo Esquerdo
RNAse	Ribonuclease
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TANK	Traf family member-associated NFkB activator

TBK1	TANK-binding kinase 1
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
Tris	Tris (hidroximetil)Aminometano
U	Unidade
µg	Micrograma
µl	microlito
V	volts

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: <i>Primers</i> usados na reação de sequenciamento.....	42
Tabela 2: <i>Pimers</i> TBk1 gene-específicos usados na reação de RT-PCR.....	44
Tabela 3: Dados hemodinâmicos.....	50
Tabela 4: Genes identificados.....	58

	PÁG.
Figura 1A: Representação esquemática da reação de transcrição reversa.....	33
Figura 1B: Representação esquemática da Reação em cadeia da polimerase....	34
Figura 2: Representação esquemática do vetor pUC18.....	37
Figura 3: Representação esquemática de placa de cultura de bactérias em reação de transformação.....	40
Figura 4: <i>MRNA Differential Display</i>	52
Figura 5: Re-amplificação.....	54
Figura 6: Clonagem.....	56
Figura 7: Cromatograma.....	57
Figura 8: Seqüência da proteína TBK1.....	60
Figura 9: Alinhamento das seqüências.....	61
Figura 10A: RT-PCR da Proteína TBK1.....	63
Figura 10B: RT-PCR da proteína B-actina.....	63
Figura 11A: Western blot da proteína TBK1.....	65
Figura 11B: Western blot de extrato nuclear da proteína TBK1.....	65
Figura 12: Imuno-histoquímica da proteína TBK1.....	67

Figura 13:	Imuno-histoquímica da proteína TBK1 corte longitudinal.....	68
Figura 14:	Atividade quinase <i>in vitro</i>	70
Figura 15:	Co-imunoprecipitação entre TBK1 e NF-Kb.....	71
Figura 16A:	Western blot de extrato nuclear da proteína NF-Kb.....	73
Figura 16B:	Western blot de extrato citosólico da proteína NF-kB.....	73
Figura 17:	Imuno-histoquímica da proteína NF-kB.....	74
Figura 18:	EMSA da proteína NF-kB.....	75



RESUMO

Sobrecargas hemodinâmicas induzem hipertrofia e remodelamento das câmaras cardíacas inicialmente como mecanismo compensatório, evoluindo para insuficiência cardíaca quando as sobrecargas persistem. A resposta inicial à sobrecarga pressora inclui ativação rápida e coordenada de vias de sinalização intracelular que resultam na regulação de fatores nucleares, expressão gênica e aumento na síntese protéica. A identidade dos vários componentes do mecanismo de sinalização e sua importância relativa para as mudanças fenotípicas dos miócitos cardíacos em resposta à sobrecarga pressora permanecem indefinidos. No presente estudo, utilizamos a técnica de *mRNA differential display* para avaliar a expressão gênica ampla no ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecargas de pressão por constricção da crossa da aorta com duração de 2 e 4 horas. Inicialmente foram identificados 43 fragmentos de cDNA-candidatos que apresentaram aumento de expressão em ventrículos esquerdos sobrecarregados. Estes fragmentos foram então re-amplificados, clonados, seqüenciados e identificados através de comparações com seqüências depositadas no GenBank. Foram identificados 5 seqüências homologas com genes já identificados. Um gene em especial, aquele que codifica a quinase TBK1, despertou nosso interesse por seu envolvimento potencial na regulação de vias que controlam a atividade do fator de transcrição NF- κ B, conhecido por coordenar processos celulares fundamentais em resposta a estímulos de diversas naturezas. Assim, na avaliação subsequente da TBK1, confirmamos o aumento de sua expressão no miocárdio através da técnica de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o TBK1 aplicada a RNA total obtido de ventrículos esquerdos submetidos a 2 e 4 horas de sobrecarga pressora e de ratos controle. Os resultados deste experimento confirmaram o aumento na expressão de TBK1 no miocárdio em resposta à sobrecarga de pressão. Em seguida, avaliamos a expressão e localização da TBK1 no ventrículo esquerdo através de técnicas de Western Blot, fracionamento de componentes citoplasmáticos e citosólico através de ultracentrifugação diferencial e imunohistoquímica. Verificamos que a quinase TBK1 se expressa tanto no miocárdio e em miócitos cardíacos como em células da camada média das artérias coronárias e que sua quantidade no miocárdio aumenta significativamente cerca de 2 horas até 24 horas após o início da sobrecarga pressora. Experimentos realizados com marcação do anticorpo anti-TBK1 em extratos nucleares e citosólicos revelaram a presença de TBK1 na fração nuclear dos miocárdios, com aumento significativo neste extrato após cerca de 30

minutos de hipertrofia e permanecendo elevada até 24 horas de sobrecarga pressora. Experimentos de co-imunoprecipitação indicaram que a TBK1 se associa com o NF-kB e que esta associação aumenta no miocárdio de corações submetidos a sobrecarga pressora. Experimentos de quinase *in vitro* utilizando imunoprecipitados de TBK1 e NF-kB indicaram que o imunocomplexo do anticorpo anti-TBK1 induz a fosforilação do NF-kB e que este efeito está aumentado no miocárdio de corações sobrecarregados. Foram também realizados experimentos para avaliar a expressão, localização e atividade do fator de transcrição NF-kB. Experimentos com extratos nuclear e citosólico do miocárdio indicaram a translocação do NF-kB para o núcleo induzida pela sobrecarga pressora. Estes resultados foram corroborados pela detecção de marcação mais intensa de núcleos com o anticorpo anti-NF-kB nos miócitos cardíacos de corações sobrecarregados. Finalmente, experimentos realizados com extratos nucleares em ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) indicaram a ativação da ligação do NF-kB com o DNA de sondas contendo a região de consenso para este fator em miocárdio de corações submetidos a sobrecarga pressora.

Nossos resultados indicaram 1) que a técnica de mRNA differential display permitiu a avaliação, apesar de restrita, de genes expressos diferencialmente durante sobrecarga pressora; 2) que a quinase TBK1 é ativada e pode ter papel importante na ativação do fator de transcrição NF-kB nos períodos iniciais de resposta miocárdica à sobrecarga pressora; 3) o fator de transcrição NF-kB é ativado precocemente e permanece ativado até 24 horas no miocárdio de ratos submetidos a sobrecarga pressora, indicando uma função potencial deste fator nos processos responsáveis pela resposta das células miocárdicas à sobrecarga hemodinâmica.



ABSTRACT

To examine genes that are early differentially expressed in response to pressure overload we performed differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction on samples of rat left ventricle (LV) subjected to 2 and 4 hours of transverse aortic constriction. Specifically, we identified increased expression of five genes out of 43 candidate-cDNA fragments. One such a gene, TBK1 raised our interest because of its potential role on the regulation of pathways that control the activity of the transcription factor NF- κ B, known to coordinate fundamental cellular processes in response to stressful stimuli. RT-PCR analysis with TBK1-specific primers in LV samples confirmed the enhanced expression of transcripts of TBK1 in overloaded myocardium. To verify the functional significance of such finding we first examined TBK1 expression in LV by immunoblot and immunohistochemical analysis. TBK1 protein levels increased at 2 and remained elevated up to 24 hs of pressure overload. The immunostaining analysis showed TBK1 expressed predominantly in cardiac myocytes and in the media of coronary vessels. Co-immunoprecipitation experiments indicated a load-induced increase in the association of TBK1 with p50NF- κ B that was paralleled by enhanced anti-TBK1 immunocomplex kinase activity toward p50NF- κ B. Experiments with myocardial nuclear and cytosolic extracts indicated a load-induced p50NF- κ B translocation from cytosolic to nuclear fraction and increases in DNA-binding activity demonstrated by electrophoretic mobility shift assay, concurrent with increased TBK1 expression and p50NF- κ B phosphorylation by anti-TBK1 immunoprecipitates. These results suggest that TBK1 is rapidly activated and might regulate NF- κ B in overloaded myocardium with potential implications in load-induced cardiac hypertrophy and remodeling.



INTRODUÇÃO

A hipertrofia miocárdica é uma condição comum à maior parte das doenças que afetam o coração, sendo considerada como um fenômeno de natureza adaptativa do miocárdio à sobrecarga hemodinâmica (7,27,39). Apesar de ser um mecanismo primariamente adaptativo, sua presença determina maior morbidade e mortalidade dos portadores, sendo considerada fator de risco cardiovascular (27,29). A hipertrofia adaptativa tem como substrato histológico principal o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. No entanto são encontrados também, em intensidades variáveis, dependendo do estágio de evolução, aumento do estroma, degenerações de cardiomiócitos e rarefação da microcirculação. Não estão ainda completamente elucidados os mecanismos que determinam estas alterações estruturais do miocárdio. No entanto, evidências clínicas e experimentais apontam para uma participação importante, senão determinante, da sobrecarga mecânica através do aumento de tensão seja sistólico ou diastólico, em sua gênese. Neste contexto, são inúmeras as demonstrações (39,40) de que o estímulo mecânico induzido pela sobrecarga ativa direta ou indiretamente vias de sinalização que determinam modificações na expressão gênica em cardiomiócitos, responsáveis, em última instância, por boa parte das modificações fenotípicas da hipertrofia miocárdica. Da mesma forma, o estímulo mecânico pode também contribuir para as alterações estruturais do estroma e da microcirculação, ao lado de fatores de natureza neuro-humoral, parácrina e autócrina (14).

As evidências disponíveis indicam que o estímulo mecânico ativa precocemente a expressão gênica e o crescimento celular em miócitos cardíacos (22,31,39,40). Dentre os grupos de genes que são ativados precocemente citam-se genes que codificam proteínas sinalizadoras com função regulatória do processo de crescimento em resposta ao estresse como genes de resposta imediata, genes fetais e os de resposta tardia (22,40). Por outro lado, genes codificadores de proteínas envolvidas no arranjo estrutural, com função metabólica e função contrátil são também ativados (32,36), provavelmente induzidos através de vias de sinalização controladas por proteínas codificadas pelos genes de natureza regulatória mencionados anteriormente.

Em anos recentes, foram identificados e esclarecidos alguns mecanismos de sinalização envolvidos no processo de expressão gênica e crescimento de miócitos cardíacos submetidos à sobrecarga mecânica (31,40). No entanto, as alterações fenotípicas

estruturais e funcionais ativadas pelo estímulo mecânico supostamente dependem de padrão complexo de expressão gênica (31) cuja regulação permanece, em grande parte, desconhecida.

A identificação de mecanismos regulatórios e de genes expressos durante o crescimento celular necessita de abordagens metodológicas múltiplas e complexas, demandando grande esforço para sua realização.

De maneira geral, os contextos temporal, topográficos, histológicos e fisiológicos no qual um gene é expresso fornece indícios do seu papel biológico (42), que manifesta-se nas células pela expressão das proteínas refletindo a conversão da informação contida nas sequências gênicas que foram ativadas (12,18). Tradicionalmente, privilegiou-se a identificação isolada de mecanismos de regulação, estrategicamente mais simples de serem abordados do que a identificação simultânea de múltiplos e complexos mecanismos interativos, mais adequados à realidade.

Em anos recentes, ocorreram avanços tecnológicos e nas técnicas de biologia molecular, permitindo a avaliação simultânea do estado de expressão de múltiplos genes individuais. Estas abordagens criaram perspectivas para o entendimento da regulação da expressão gênica ampla em estados fisiológicos e fisiopatológicos.

Em geral, as metodologias disponíveis permitem a avaliação da expressão gênica ampla através da comparação da expressão de mRNA em estados funcionais ou patológicos diferentes. Apesar da regulação da quantidade de determinada proteína em uma célula não ser função exclusiva da quantidade de mRNA (RNA mensageiro), teoricamente todas as diferenças entre tipos e estados celulares correlacionam-se estreitamente com variações nos níveis de mRNA de alguns poucos genes. Isto é uma vantagem extraordinária pois, a sequência de cDNA (DNA complementar) é o único elemento necessário para a aplicação das diferentes variadas técnicas disponíveis para se medir a abundância de mRNA de um gene específico. A possibilidade de se sintetizar cDNAs representativos à partir de um tipo celular ou tecido, o avanço do sequenciamento de genomas e o domínio de sua caracterização individual levaram ao desenvolvimento de métodos que possibilitam o estudo da expressão de praticamente todos os genes conhecidos de uma só vez. Dessa

forma é possível monitorar rápida e eficientemente a transcrição de todos os genes de um organismo ou órgão (34).

Dentre estes métodos a técnica de DNA Microarray tem sido mais recentemente empregada em estudos em corações submetidos à sobrecarga como um recurso na realização de avaliação de um vasto número de genes que apresentam expressão diferencial em condições funcionais ou patológicas distintas. A metodologia de DNA Microarray em suas variantes utiliza como princípio a hibridação de amostra de cDNA ou RNA com centenas ou milhares de amostras de diferentes seqüências de DNA. Através de comparações quantitativas dos produtos hibridados provenientes de células ou tecidos submetidos a diferentes condições experimentais pode-se avaliar de maneira semi-quantitativa o perfil da expressão gênica dos mesmos, sendo porém, uma técnica muito dispendiosa. Outra opção para se avaliar e identificar a expressão diferencial de genes é a técnica e *mRNA Differential Display*, que envolve a realização acoplada de método de síntese de DNA complementar e amplificação por PCR, utilizando-se uma combinação de oligonucleotídeos, com o objetivo de avaliar duas ou mais amostras experimentais de maneira comparativa em gel de poliacrilamida. Se por um lado esta técnica permite a identificação de número relativamente restrito, exigindo a identificação posterior dos produtos expressos diferencialmente, por outro lado, os custos para sua realização são bem inferiores àqueles necessários para a realização da técnica de DNA microarray, o que a torna mais adequada para uso em laboratórios não dedicados em biologia molecular.

A metodologia de mRNA differential display tem sido utilizada em estudos experimentais de doenças do coração. Esta técnica já foi utilizada em estudos que avaliaram a expressão gênica na rejeição crônica a transplante cardíaco em ratos (48), em corações de ratos diabéticos (33), miocardiopatia dilatada em corações de humanos (47), em cardiomiócitos fetais em crescimento em cultura (8), em cardiomiócitos em cultura submetidos a tratamento com doxorubicina (19), em miocárdio de porcos submetidos a episódios de isquemia e reperfusão (9), em corações de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca (43), em corações de camundongo com miocardite induzida por vírus Cocksackie B3 (51), em Hamsters com miocardiopatia dilatada (10), em ratos com infarto do miocárdio induzido por ligadura da artéria coronária (52).

No presente estudo utilizamos a técnica de *mRNA differential display* para avaliar a expressão gênica no ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecarga de pressão por 2 e 4 horas. Nosso objetivo foi de detectar mecanismos envolvidos na regulação das modificações fenotípicas observadas na hipertrofia cardíaca, já que nesta fase da sobrecarga pressora, acredita-se, são ativados mecanismos regulatórios que coordenarão as mudanças estruturais características da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de trabalho (13,31).



OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Avaliar a expressão gênica ampla no ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecarga pressora por 2 e 4 horas com a técnica de *mRNA Differential Display*.
- 2) Avaliar a importância funcional dos genes com expressão diferencial no ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecarga pressora aguda.



MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Nos vários experimentos desse estudo foram utilizados ratos machos adultos Wistar com pesos entre 150 a 200g provenientes do CEMIB (centro de bioterismo da universidade de Campinas).

1. Modelo de sobrecarga pressora

Os ratos foram anestesiados com uma solução de cloridrato de Cetamina (Ketalar®, Parke-Davis 50mg/ml) e Diazepam 10 mg (União Química Farmacêutica Nacional S/A Diazepam, 2mg/ml). Esta mistura continha 30mg de Cetamina e 0,2mg de Diazepam por ml de solução. A dose aplicada em cada animal foi de 0,22ml/100g de peso corporal. A cavidade torácica foi aberta no primeiro espaço intercostal esquerdo e a crossa da aorta identificada. Foi realizada constrição da crossa da aorta com clamp de prata com diâmetro ajustado ao peso corporal do rato. A cavidade torácica foi então fechada, e os animais mantidos sob observação até o momento da extração com os períodos de sobrecarga pré-determinados de 2 e 4 horas após a constrição.

Decorridos os períodos pré-determinados de sobrecarga os animais foram novamente anestesiados com a mesma solução anestésica utilizada anteriormente e foram submetidos a cateterização da artéria carótida direita e artéria femoral para monitorização das pressões na aorta ascendente e abdominal, frequência cardíaca e gradiente de pressão. As pressões pulsáteis obtidas através das cânulas implantadas foram detectadas com transdutores de pressão tipo strain-gauge BLPR (Blood Pressure transducer-World Precision Instruments, Inc) previamente calibrados. Os sinais das pressões foram amplificados (General Purpose Amplifier-©Stoelting Co.), e processados por uma placa analógico-digital conectada a um computador tipo PC carregado com o sistema Windaq (Dataq Instruments Inc., Akron, OH, EUA) para a monitorização hemodinâmica e pós processamentos.

Os registros foram analisados pelos programas Windaq (Dataq Instruments Windaq) e Advanced Codas (Dataq Instruments, Calc Package). A análise foi realizada com a detecção dos picos sistólicos e diastólicos das ondas de pressão para obtenção das médias aritméticas, batimento a batimento, das pressões sistólicas, diastólicas e média dos registros realizados na aorta ascendente e abdominal, respectivamente. Os sinais de pressão foram digitalizados a uma frequência de amostragem de 100Hz. A frequência cardíaca foi obtida da análise dos intervalos entre os picos máximos normalizados para 1 minuto. Os valores de pico máximo, pico mínimo, pressão arterial média (obtida da integral da área da cada pulso) e frequência cardíaca foram obtidos de planilhas de Excel geradas com valores de pós-processamento com o programa Advanced-Codas.

2. mRNA Differential display de miocárdios de ratos submetidos á sobrecarga de pressão

2.1. Extração de RNA

O RNA total do ventrículo esquerdo de ratos foi extraído com o reagente comercial TRIZOL[®]. O TRIZOL[®] é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que mantém a integridade do RNA durante a lise celular. Os ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora foram homogeneizados diretamente no reagente Trizol[®] com uso de polytron. Adicionou-se 1mL de TRIZOL[®] para cada 100mg de tecido. Por se tratar de um tipo de tecido com grande concentração de proteínas, foi adicionada uma etapa de "clareamento" da amostra realizada através de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante contém RNA e ainda DNA genômico, proteínas de alto peso molecular, membranas extracelulares e polissacarídeos. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e mantido em repouso por 5 minutos, permitindo a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foi adicionado 0.2 mL de clorofórmio/1mL Trizol e a amostra foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada em temperatura ambiente por 3 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm a 4°C, a amostra ficou separada em duas fases: a inferior, de coloração rosada, denominada orgânica e a superior, mais clara, denominada aquosa, que abrange cerca de

dois terços do volume total. Nestas fases estão solubilizados o DNA e o RNA, respectivamente, além da banda de proteínas presente entre as duas. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, onde o RNA foi precipitado através de incubação por 30 minutos com 0.5 mL de isopropanol/1mL de trizol, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O pellet de RNA foi ressuspensão em 1 mL de etanol 75%/1mL de trizol e a mostra centrifugada a 7500g por cinco minutos. O pellet foi eluído em 50 µl de água *RNase-free* e a concentração de RNA na solução quantificada em espectrofotômetro através de leitura no comprimento de onda de 260nm.

Determinação da concentração do RNA

A medida da absorbância no comprimento de onda de 260 nm permite o cálculo direto da concentração de ácido nucléico da amostra, pela seguinte fórmula:

$$\underline{\underline{[\text{RNA}] } \mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{diluição} \times 40, \text{ onde:}}$$

A_{260} = Absorbância (em densidade óptica) a 260 nm

Diluição = fator de diluição utilizado (100)

40 = coeficiente utilizado para RNA.

2.2. Reação de transcrição reversa acoplada a reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Após a extração do RNA total do ventrículo esquerdo sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante e visualizado como bandas de rRNA 28S e 18S em gel de eletroforese de agarose. Em seguida, foi realizada a síntese do cDNA pela reação de transcrição reversa (RT). Para cada reação foram utilizados 3µg do RNA e oligonucleotídeos poli T (*downstream random primer*) com dinucleotídeo na extremidade 3' degenerado e água tratada com DEPC .

Oligonucleotídeos 3'

5'-TTTTTTTTTTTTAA

5'-TTTTTTTTTTTTGG

5'-TTTTTTTTTTTTCC

5'-TTTTTTTTTTTTAG

5'-TTTTTTTTTTTTAC

5'-TTTTTTTTTTTTGA

5'-TTTTTTTTTTTTGC

5'-TTTTTTTTTTTTCA

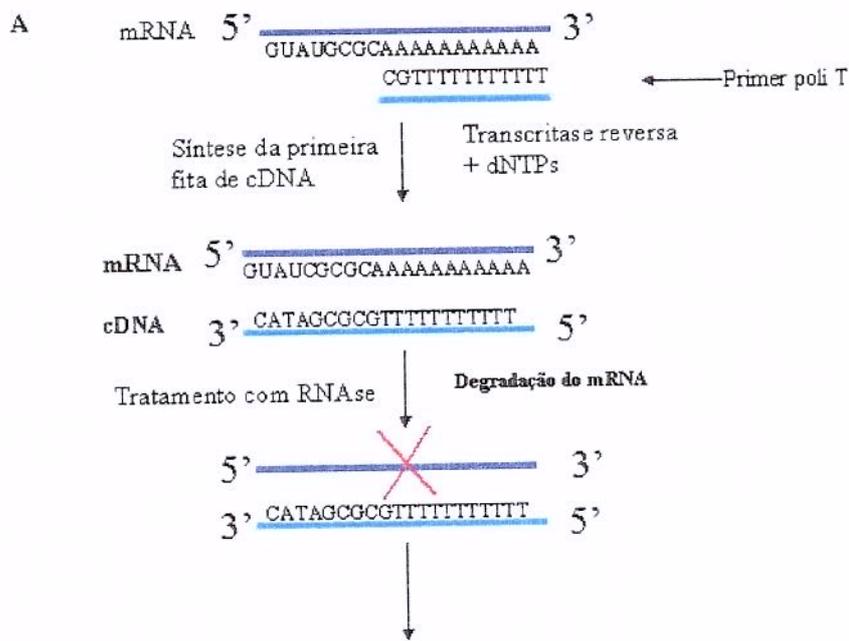
5'-TTTTTTTTTTTTCG

Esta reação foi realizada a 70°C por 10 minutos seguida pela síntese do cDNA (figura 1A), que consistiu da adição do tampão de PCR 10x, MgCl₂ 25mM, dNTPmix 10 mM, 0,1 M DTT 0,1 M e da enzima superscript II. Esta reação foi mantida a 42°C por 1 hora. Após este período a temperatura foi elevada a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima e posterior incubação com 5µg de RNase A à 37°C por 15 minutos para degradação da fita de mRNA. Em seguida foi realizada a amplificação por PCR (figura 1B), na qual foram utilizados os *oligonucleotídeos 3'* 25mM, Tampão dePcr10x (sem Mg²⁺⁺), MgCl₂ 25mM, enzima Taq polimerase e água tratada com DEPC, esta reação foi marcada com dCTP [P³²]. Foram então adicionados os *oligonucleotídeos* aleatórios 5' 2µM, citados a seguir:

Oligonucleotídeos 5'

5`- GATCATAGCC	5`- CTGCTTGATG
5`- GATCCAGTAC	5`- GATCGCATTG
5`- AAACCTCCGTC	5`- TGGTAAAGGG
5`- GATCATGGTC	5`- TTTTGGCTCC
5`- GTTTTTCGCAG	5`- TACCTAAGCG
5`- GATCTGACAC	5`- GATCTAACCG
5`- TGGATTGGTC	5`- TCGGTCATAG
5`- GGAACCAATC	5`- GATCTGACTG
5`- GATCAATCGC	5`- TCGATACAGG
5`- TACAACGAGG	5`- GATCAAGTCC
5`- GATCTCAGAC	5`- GGTAATAAGG
5`- GATCACGTAC	5`- CTTTCTACCC

A reação constituiu-se dos seguintes ciclos: uma etapa de desnaturação a 94° por 3 minutos, seguida de 39 ciclos constituídos de uma etapa de desnaturação de 94°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos a 40°C por 30 segundos e uma etapa de alongamento a 72°C por 30 segundos. Após o término dos ciclos foi adicionada uma etapa de alongamento a 72°C por 5 minutos.



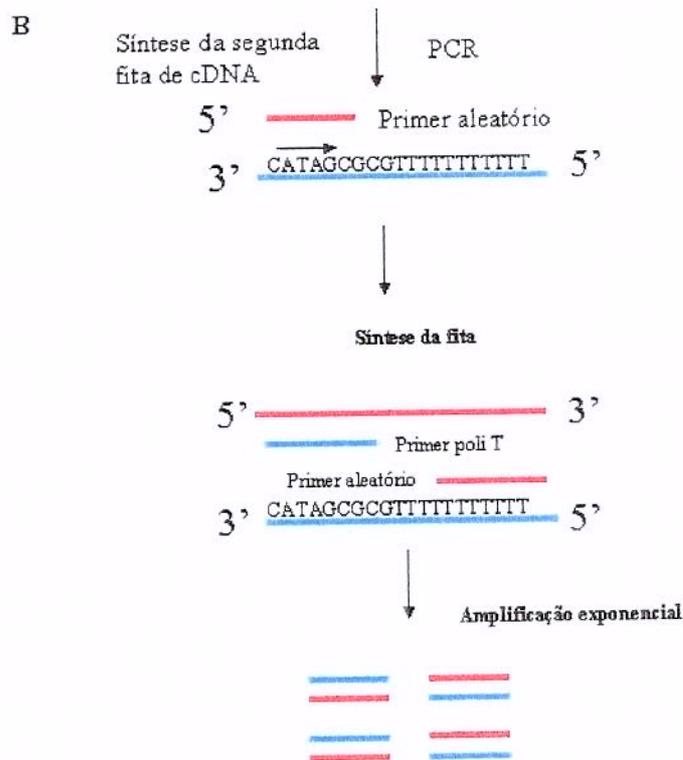


Figura 1: Representação esquemática de RT-PCR. A. Demonstra a síntese da primeira fita de cDNA a partir do mRNA, utilizando *oligonucleotídeo* poli dT, que possui em sua região 3' uma repetida seqüência de timinas, possibilitando assim a “ancoragem” do mRNA que possui em sua região 5' uma repetida seqüência de adeninas. B. demonstra a síntese da segunda fita de cDNA com a utilização do *oligonucleotídeo* aleatório pela PCR, que permite uma amplificação exponencial do cDNA.

2.3. Eletroforese dos produtos de RT-PCR

Após o término da amplificação os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE 1X, a 60V e 36 mA por cerca de uma hora. O gel então foi fixado em papel de filtro e secado em Gel dryer (model 583- Bio Rad) conectado a bomba de vácuo (Hydro TechTM Vacuum Pump – Bio Rad). O gel foi exposto em filme de autorradiografia por 72 horas.

3. Escolha e determinação da identidade dos produtos de RT-PCR com expressão diferencial

3.1. Escolha e extração

Após a revelação da autorradiografia, as bandas que apresentaram diferença na expressão entre homogenatos obtidos de ratos controle e submetidos a CoAo foram extraídas do gel e eluídas em água tratada com DEPC em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida foram aquecidas a 90°C por 10 minutos e centrifugadas para separar o resíduo de gel e o filtro de papel. O sobrenadante contendo o cDNA foi então coletado e sua concentração determinada por espectrofotometria.

3.2. Re-amplificação

As reações de re-amplificação dos cDNAs eluídos foram realizados com os mesmos oligonucleotídeos 3' / 5' nas concentrações de 2µM na seguinte composição: Tampão de PCR 10x (sem Mg²⁺⁺), MgCl₂ 25mM, dNTP 500mM e a enzima Taq DNA Polimerase 5 U/µl. Foi utilizado o mesmo ciclo de amplificação anterior. Para avaliar os produtos foi realizada eletroforese em gel de agarose 2,5%.

3.3. Clonagem dos produtos

Os produtos obtidos a partir do *Differential Display* foram clonados com o uso de Sure Clone™ Ligation kit (Amersham Pharmacia Biotech) e constituiu-se de três etapas fundamentais: reação de *Blunting/kinasing*, seguida de uma purificação em coluna de MicroSpin e ligação em vetor pUC18.

A etapa denominada *Blunting/kinasing* envolveu reação de digestão com a enzima Klenow (que apresenta atividade exonucleásica 3'-5', necessária para a remoção da adenina sobressalente na extremidade 3' da fita-molde) e concomitante fosforilação com a enzima T4 polinucleotídeo quinase. Após a purificação, os fragmentos foram ligados no vetor pUC18 (fig 2), utilizando 1µL da enzima deT4 ligase, 1 µL de DTT, 2X tampão de ligação e 50µL de vetor defosforilado. A reação foi homogeneizada e incubada a 16°C durante a noite

3.3.1. Preparação de células bacterianas termo-competentes:

Uma alíquota da linhagem de bactérias *E.coli* cepa DH5 α foi plaqueada sob condições estéreis em meio LB sólido (1g de triptona; 0,5g de extrato de levedura; 1g de NaCl pH 7 e 0,2g de ágar) não-seletivo. Após a incubação *overnight* a 37°C; uma colônia isolada foi inoculada em 10mL de SOB (0,2g de triptona; 0,05g de extrato de levedura, 0,006g de NaCl; 0,002g de KCl; 0,02g de MgCl₂ e 0,024 de MgSO₄) e incubada a 37°C até a O.D. 0,6 (fase exponencial de crescimento). A amostra foi coletada em tubo Falcon de 50mL, mantida em gelo por 15 minutos e centrifugada a 3000rpm por mais 15 minutos. O pellet obtido foi ressuspensão por vortex em intensidade moderada em tampão denominado *RF I* estéril (12g de RbCl; 9,9g de MnCl₂ . 4 H₂O; 30mL de solução 1M pH 7,5 de K Ac; 1,5g de CaCl₂ . 2H₂O, 150g de glicerol, 1L de água Milli-Q). As bactérias foram mantidas em gelo por quinze minutos e novamente centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos a 4°C. O pellet obtido foi ressuspensão em tampão *RF II* estéril (20mL de 0,5M pH6,8 de MOPS; 1,2g de RbCl, 11g de CaCl₂ . 2H₂O, 150 g de glicerol, 1L de água Milli-Q) e mantido em gelo por 10 minutos. Após este passo, as bactérias foram distribuídas em alíquotas de 200 μ L e congeladas em nitrogênio líquido. O estoque destas bactérias foi mantido em biofreezer -80°C.

3.3.2. Transformação de bactérias por choque térmico.

A transformação foi feita segundo protocolo estabelecido por Hanahan (1983). Alíquotas de 200 μ L de bactérias competentes juntamente com 10 μ L da reação de ligação contendo o plasmídeo, foram incubadas em gelo por 20 minutos. Após a incubação, foi aplicado um choque térmico de 42°C em banho seco por dois minutos, permitindo a abertura de poros na membrana da bactéria para introdução do cDNA no citosol. Após o choque as bactérias foram mantidas em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 μ L de SOC (SOB acrescido de 20mM de glicose estéril) e as células foram centrifugadas por um minuto a 3000 rpm a temperatura ambiente. Foram retirados 600 μ L do sobrenadante e o pellet ressuspensão nos 400 μ L restantes. Foram plaqueados 200 μ L da cultura em meio LB-ágar contendo 50 μ g/ μ L de ampicilina e mantida a 37°C por 16 horas.

Neste meio de cultura foi adicionado previamente X-GAL e IPTG que proporcionam a seleção das colônias, sendo assim, as colônias de *E.coli* com plasmídeos que possuem o inserto de DNA no sítio múltiplo de clonagem, desloca ou destrói a sequência codificadora da enzima β -galactosidase (*lacZ*) não ocorrendo a clivagem do substrato X-GAL. Neste caso o plasmídeo resultante produz colônias brancas, enquanto que as colônias de *E.coli* com plasmídeos, sem o inserto de DNA, o fragmento do *LacZ* sintetiza a enzima β -galactosidase e cliva o X-GAL produzindo colônias azuis (figura 3).

Foi preparado um pré-inóculo com 120 μ L de meio *Circle Growth* (Quantum Biotechnology) e as colônias com inserto (brancas) foram coletadas com hastes estéreis e inoculadas no meio, incubadas a 37°C em agitação constante por cerca de 6 horas.

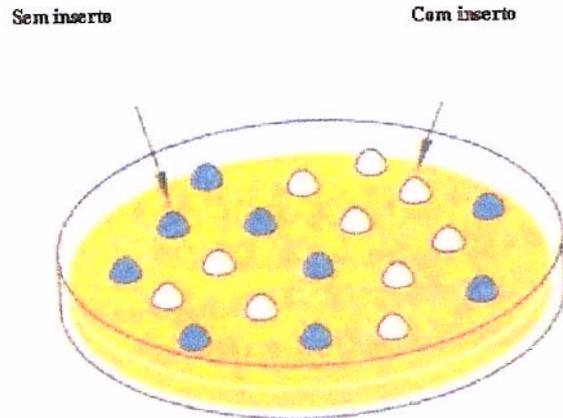


Figura 3: Placa de cultura de bactérias para seleção de colônias transformadas. Na placa há a presença do substrato incolor x-Gal, que sofre clivagem pela enzima β -galactosidase, quando esta está expressa, produzindo uma substância azul, indicando que o gene que expressa esta enzima está intacto, ou seja, não houve inserção do fragmento de cDNA. Quando ocorre a inserção do fragmento de cDNA a enzima não é expressa, não ocorrendo a clivagem do substrato e as colônias permanecem brancas.

3.4. Sequenciamento

Os fragmentos clonados foram submetidos à reação de sequenciamento automático baseado no método descrito por *Sanger* (41). A etapa inicial consiste em uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos 5' e 3' do vetor (tabela 1), sendo considerados os produtos que apresentaram pelo menos 200 pb a mais que o esperado para a amplificação da seqüência do plasmídeo. A reação foi realizada com a seguinte composição: 1,75 μ M dos oligonucleotídeos do vetor (tabela1); tampão de PCR 1x; $MgCl_2$ 1,67mM, dNTP 0,125mM e a enzima Taq DNA polimerase 1U num volume final de 15 μ L, sendo realizados os seguintes ciclos: uma etapa de desnaturação a 94° por 2 minutos, seguida de 34 ciclos de uma etapa de desnaturação de 94°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos a 58°C por 15 segundos, uma etapa de alongamento a 72°C por 1minuto. Para visualização foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Após esta análise, uma alíquota com aproximadamente 200ng de DNA da reação anterior da cada fragmento foi coletada para o sequenciamento, que é realizado em duas etapas. Em uma delas foi utilizado o oligonucleotídeo 5'e na outra o oligonucleotídeo 3'da reação de amplificação anterior. A composição utilizada na reação de sequenciamento foi: 6 μ L de Dynamic ET Premix (composto pela enzima Taq DNA polimerase, nucleotídeos livres e nucleotídeos dideoxi marcados) e oligonucleotídeo 1,75 μ M num volume final de 15 μ l, sendo submetidos aos seguintes ciclos: uma etapa de desnaturação a 94° por 2 minutos, seguida de 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos a 57°C por 15 segundos.

A seguir foi realizada uma reação de purificação destes produtos que consistiu na adição de 2 μ L de acetato de amônio, 50 μ L de etanol seguido de incubação em gelo por 20 minutos. Após este período, seguiu-se uma centrifugação a 4000rpm a 4°C por 25 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Foram acrescentados 120 μ L de etanol 70% gelado, seguindo-se nova centrifugação a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos sofreram spin invertido a 200 rpm por 10 segundos. As amostras foram submetidas a secagem a 65 °C por 3 minutos e re-suspendidas com 10 μ L de loading e levadas ao seqüenciador automático Mega Bace 1000 (amershan Life science).

Tabela 1: Seqüência de oligonucleotídeos sense a antisense utilizados para reação de amplificação pós-clonagem e na reação de sequenciamento. Os oligonucleotídeos são complementares as seqüências de nucleotídeos do vetor.

Oligonucleotídeo 5'	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Oligonucleotídeo 3'	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC

4. Análise comparativa dos produtos no Banco de Genes.

As seqüência obtidas foram agrupadas através do programa Phred/Phrap, submetidas ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e analisadas através do programa gratuito BLAST.

5. Estudos funcionais

Nos estudos realizados *a posteriori* foram utilizados métodos para identificação e avaliação funcional de produtos obtidos da reação de Differential Display e sequenciamento.

5.1. RT-PCR

O cDNA foi obtido através de uma reação de transcrição reversa de RNA obtido de ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecarga pressora por 2 e 4 horas ou cirurgia fictícia. Para preservar a qualidade e especificidade da reação foi feita a descontaminação do RNA, através do tratamento do mesmo com DNase I 0,5 U/ μ g (Life Technologies), em presença de MgCl₂ 8 mM, RNAsin 20 U (promega), BSA 500 mg/ml, Tris-Cl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM por 30 minutos a 37°C. Após este período de incubação foi adicionado EDTA a uma concentração final de 2mM, seguido de uma incubação a 65°C por 10 minutos, para a inativação da DNase. O EDTA é um agente quelante que age sobre o magnésio prevenindo a hidrólise dependente de magnésio do RNA, que pode ocorrer a altas temperaturas.

Em seguida foi realizada a síntese da fita simples de cDNA pela reação de transcrição reversa catalisada pela enzima Transcriptase reversa. Para esta etapa foi feita uma seleção do RNA mensageiro (poli-A) com o auxílio do oligonucleotídeo *poli dT* (mistura de oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de *mRNA Differential Display*) na concentração de 5 pM, adicionado a 6µg de RNA descontaminado em volume final de 30µL. A solução foi mantida em banho seco a 70°C por 10 minutos para desnaturar o RNA, e posteriormente foram adicionados Tris-Cl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM, MgCl₂ 2,5mM, DTT 10mM, dNTPs 0,5mM e 400U de Transcriptase Reversa Superscript TM II 400U (Life Technologies). A mistura foi homogeneizada e incubada a 42°C por 60 minutos. A reação foi paralizada por desnaturação da enzima a 70°C por 15 minutos. Após a síntese da fita simples o cDNA, o RNA inicial foi degradado pela adição de 5µg de RNase A, seguindo incubação a 37°C por 30 minutos.

Seguiu-se então a amplificação do cDNA com oligonucleotídeos específicos *sense* e *antisense*, à partir do cDNA de fita simples obtido na etapa anterior através de PCR, na qual foram realizadas duas amplificações, a primeira com oligonucleotídeos de regiões mais externas do gene e a segunda com oligonucleotídeos localizados em regiões mais internas. A composição final da reação foi: Tris-HCL 20 mM pH8.4, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5 mM, 20 pmol oligonucleotídeo 5' 1 20 pmol, oligonucleotídeo 3' 1 20 pmol (tabela2), deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 200mM de cada, 2µL do produto da reação final de transcrição da etapa anterior e de Taq DNA polimerase 2U. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo: uma etapa de desnaturação a 94° por 3 minutos, seguida de 19 ciclos de uma etapa de desnaturação de 94°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos a 43°C por 30 segundos, uma etapa de alongamento a 72°C por 30 segundos. Após o término dos ciclos foi adicionada uma etapa de alongamento a 72°C por 5 minutos. Seguiu-se então uma segunda amplificação a partir do produto da primeira, idêntica a esta, alterando apenas os oligonucleotídeos utilizados, que desta vez foram o oligonucleotídeo 5' 2 e o oligonucleotídeo 3' 2 (tabela 2).

Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. As eletroforeses foram realizadas a 80 V em tampão TAE (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0 e EDTA 1 mM, pH 8.0).

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de ampliações.

Oligonucleotídeo5' 1	ATGCAGAGCACCTCCAAC
Oligonucleotídeo3' 1	TGGAGTGTTGGAGTGA
Oligonucleotídeo5' 2	GGGGCCACTGCAAAT
Oligonucleotídeo3' 2	AAGAAGTACGGGGCTA

5.2. Preparação de extratos nuclear e citosólico

Os ventrículos esquerdos dos animais controles e submetidos aos tempos de sobrecarga pré-determinados foram extraídos e congelados em nitrogênio líquido. Foi utilizado para cada período de sobrecarga um “pool” de dois corações. Os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 10 partes de tampão de homogeneização (sucrose 250 mmol/L, Hepes10 mmol/L, pH 7.6, KCl25 mmol/L, EDTA 1 mM, 10% glicerol 10%, PMSF 0.1 mmol/L, aprotinina e leupeptina 2 µg/ml de cada, e ortovanadato de sódio10mmol/L) com o auxílio de um homogeneizador potter (Pestle Tissue Grinders). O homogenato foi recoberto com tampão B (sucrose 1 mol/L, Hepes 10 mmol/L, pH 7.6, KCl 25 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 10%, PMSF 0.1 mmol/L, aprotinina e leupeptina 2 µg/ml de cada, e ortovanadato de sódio10mmol/L) e centrifugado a 11000 rpm por 10 min à 4 °C. O pellet foi ressuscitado em tampão A /glicerol (9:1) e recoberto com 1/3 do volume de tampão B/glicerol (9:1). O gradiente foi centrifugado a 11000 rpm por 30 min a 4 °C. O pellet do extrato nuclear semi-purificado foi ressuscitado em uma parte de tampão de extração nuclear (Hepes10 mmol/L, pH 7.6, KCl 400 mmol/, MgCl₂ 3 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L, PMSF 0.1 mmol/L e ortovanadato de sódio 10mmol/L) e KCl 4 M 1/10 volume e o extrato citosólico, presente no sobrenadante, separado e armazenado em -80 °C. As amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas a 11000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi dialisado em tampão C (Hepes25 mmol/L, pH 7.6, KCl 100 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L, PMSF 0.1 mmol/L, aprotinina and

leupeptina 2 µg/ml de cada, e ortovanadato de sódio 10mmol/L) por 4 horas. As proteínas totais do dialisado foram quantificadas pela técnica de Biureto (Bradford) e armazenadas em -80 °C. Os extratos foram então utilizados na preparação de gel shift e de western blot.

5.3. Análise de proteínas por immunoblotting

Ao final dos tratamentos específicos, os tecidos foram processados de acordo com os protocolos descritos para *Western Blot*. As células foram homogeneizadas em tampão de solubilização (1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2 mmol/l PMSF; 0.2 mg/ml aprotinina) a 4°C em homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi então utilizado para o ensaio. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi feita com a técnica do biureto. O homogenato total foi utilizado para a preparação de extrato total ou de imunoprecipitado. Para tanto, 400µL da amostra acrescida de 100µL de tampão de Laemmli (100mmol/l de ditiotretol) foi aquecida em água fervente por 4 minutos (extrato total) ou incubadas com anticorpo anti TBK1 *overnight* e precipitadas com proteína A-sepharose. Após centrifugação e três lavagens sucessivas com tampão apropriado, a amostra foi acrescida de tampão de Laemmli com 50% de água. Em seguida, as proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos a 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1,5 h com tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0.02% Tween 20) à temperatura ambiente. As membranas de nitrocelulose foram então incubadas *overnight* com anticorpos contra NF-kβ p50 e p65 e TBK1 em tampão de bloqueio (0.3% leite em pó desnatado), e então, lavada por 15 minutos

com tampão de bloqueio sem leite em pó desnatado). A membrana foi então incubada com 5 μ Ci de [¹²⁵I] Proteína A (30 μ Ci/Ug) em 10 ml de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e lavada novamente por 15 minutos como descrito anteriormente. A proteína A [¹²⁵I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isso, o cassete contendo a membrana e o filme foi mantido à temperatura de - 80°C, e após 12-48 horas, o filme foi revelado de maneira convencional.

5.4. Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

5.4.1. Preparação da sonda de DNA

As sondas de DNA de dupla fita foram preparadas à partir de oligonucleotídeos sintéticos que continham sítio de consenso do NF κ B 5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3'(sc2505- Santa Cruz Biotechnology). Cerca de 1,5 pmol do oligonucleotídeo anelado foi marcado com [α P³²] dATP em presença da enzima T4 Polinucleotídeo Kinase (Boehringer-Mannheim), num volume final de 50 μ l. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos para anelamento. A enzima foi desnaturada a 65°C por 5 minutos. As sondas foram purificadas em colunas de Sephadex® G-25 (NAP^{TM-5} Pharmacia Biotech) segundo instruções do fabricante e foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm.

5.4.2. Formação dos complexos e Eletroforese

A formação dos complexos DNA-Proteína foi analisada através da mistura 10 μ g de extrato nuclear com 42 fmol da sonda marcada em tampão de ligação (Tris10mM pH 7,5, NaCl 50mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0, dithiothreitol 1mM, glicerol 2%, Ficoll2% e 2 μ g de DNA de esperma de salmão) em temperatura ambiente por 20 minutos.

Após o término do tempo de incubação da proteína com o DNA para a formação do complexo, foram adicionadas às reações 5 µl de tampão de amostra (Tris-Cl 0,25M pH 7,5, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,2%, xileno cianol 0,2%). As amostras foram então submetidas à eletrodorese em gel não desnaturante de poliacrilamida 6% contendo 6% de glicerol e 0,25xTBE (Trisma base 50mM, ácido bórico 42mM, EDTA 0,5mM). O gel foi pré-corrido em tampão TBE 0,25 por 30 minutos a 20 V.cm⁻¹ a 4°C. A eletroforese foi realizada a 400V seco a vácuo e exposto a um filme de Raio X por 12 a 48 horas à -70 °C.

5.5. Atividade Quinase “in vitro”

A atividade de quinase da proteína TBK1 sobre seu substrato a proteína NFκB, foi avaliada em reação *in vitro*, onde extratos proteicos de corações controles e corações submetidos aos tempos de sobrecarga pré-determinados foram imunoprecipitados com 10µg de anticorpo anti-TBK1 (Santa Cruz Biotchnology) em tampão de imunoprecipitado, o mesmo utilizado para western blotting. Simultaneamente, amostras de corações controle foram imunoprecipitadas com 10µg de anticorpo anti-NFκB (Santa Cruz Biotchnology). Os imunocomplexos de anticorpo anti-TBK1 e anti-NFκB foram lavados em Tampão de lise pH 7,5 (20mM Hepes, NaCl 500mM, 5mM EDTA, 1mM Ortovanadato, 20µg/ml PMSF, 1% Triton, 10% glicerol, 100 unidades/ml Aprotinina), em três centrifugações a 11000 rpm por 5 minutos. Os imunocomplexos foram ressuspensos em 10µl de suspensão para reação de quinase, composta de tampão caseína quinase 5X (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 750 mM KCl) e 2µl [³²P] ATP e incubados por 30 minutos a 30 °C. Para cada amostra foi adicionado 20µl de tampão Laemmli para encerrar a reação e estas foram fervidas por 5 minutos. As amostras foram separadas em gel SDS-Page 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose, expostas em autorradiografia e quantificadas por densitometria.

5.6. Imunohistoquímica

Após os tempos pré-determinados de sobrecarga os ventrículos esquerdos foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 12 horas e processados para inclusão em Histotec (Merck). Foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura que transferidos para lâminas de vidro recobertas com poli-L-lisina. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pelo tratamento com 0,03% H₂O₂ em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M a temperatura ambiente por 30 minutos. Os cortes foram pré-incubados em solução de bloqueio (leite desnatado 5% em PBS 0,1M) por 45 minutos em temperatura ambiente, seguido pela incubação com os anticorpos primários anti-TBK1 (1:100) e anti-p50 NF kB (1:50) (durante 12 horas a 4°C). Os cortes histológicos foram lavados 3 vezes por 5 minutos cada em PBS 0,05M e incubados com os anticorpos secundários (1:300) por 2 horas a 25°C. Após este período os cortes histológicos foram lavados da mesma forma citada acima e posteriormente incubados com o complexo Streptavidina-peroxidase (1:500) por 45 minutos em temperatura ambiente, lavados novamente e incubadas com uma solução de diaminobenzidina (0,5mg/ml) contendo H₂O₂ (0,8%) por 5 minutos. Os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina e tratados com carbonato de lítio. A especificidade do anticorpo secundário foi testada em controle e negativo, onde na ausência do anticorpo primário não houve marcação significativa.

6. Análise estatística

Nos casos onde foram feitas análises quantitativas, os resultados foram apresentados como médias. Diferenças entre os valores médios foram analisadas por análise de variância (ANOVA) para dados repetidos e pelo teste de Scheffé. A probabilidade para os testes serem considerados estatisticamente significantes foi $p < 0,05$.



RESULTADOS

1. Hemodinâmica

Na tabela 3 estão demonstrados os valores de pressão sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo e da aorta abdominal nos ratos controle e naqueles submetidos a constrição da crossa da aorta por 2 e 4 horas. A constrição da aorta produziu um gradiente sistólico de aproximadamente 40mmHg (de 125mmHg no controle para 162 e 165 mmHg, respectivamente 2 e 4 horas após a constrição) entre o ventrículo esquerdo e a aorta abdominal, estável nos grupos submetidos a 2 e 4 horas de constrição. A pressão sistólica medida na aorta abdominal foi semelhante em todos os grupos de ratos indicando que a constrição da aorta não provocou queda na pressão à jusante. Apesar do aumento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo, não houve variação significativa da pressão diastólica do ventrículo esquerdo dos ratos submetidos a constrição da aorta, comparados com os ratos controle, permanecendo estável em 7-8 mmHg.

Tabela 3: Valores das medidas hemodinâmicas do ventrículo esquerdo e aorta abdominal em ratos submetidos a constrição da crossa da aorta.

	PSVE	PDFVE	PSAA	GS	FC	+dP/dt	-dP/dt
	mmHg	mmHg	mmHg	mmHg	bpm	mmHg/s	mmHg/s
C (n=5)	125±3.1	7±0.4	122±3.5	3±1.6	402±30	9057±300	7290±400
2 h(n=5)	162±3.3*	7.3±0.5	123±3.0	39±2.8*	450±16	10143±400	8993±400
4 h(n=5)	165±2.3*	8.3±0.4	122±1.9	43±1.8*	420±15	10680±400	8761±300

C: Ratos controle; 2 h: Ratos submetidos a constrição da crossa da aorta por 2 horas; 4 h: ratos submetidos a a constrição da crossa da aorta por 4 horas; PSVE: pressão sistólica no ventrículo esquerdo; PDFVE: pressão diastólica final no ventrículo esquerdo; PSAA: pressão sistólica na aorta abdominal; GS: gradiente sistólico; FC: frequência cardíaca; ±dP/dt: derivada da pressão pelo tempo. * p<0.05.

2. *mRNA Differential Display*

A técnica de *mRNA Differential display* foi utilizada para a comparação da expressão gênica em amostras de RNA provenientes de corações controle e submetidos a constricção da aorta por 2 e 4 horas.

Foram realizados quatro experimentos considerados de boa qualidade do *mRNA Differential Display* caracterizada pela presença de produtos em múltiplas bandas, repetidas nos ratos controle e submetidos a constricção da aorta na auto-radiografia. Destes quatro experimentos foram selecionados dois géis nos quais os fragmentos apresentaram expressão diferencial mais acentuada e de maior qualidade. Desses géis foram selecionados quarenta e três fragmentos que apresentaram sua expressão diferenciada, evidenciada pela intensidade das bandas na auto-radiografia e extraídos para re-amplificação. Na figura 4, está representado um exemplo de experimento onde algumas bandas de produtos provenientes de corações submetidos a sobrecarga pressora apresentaram intensidades aumentadas quando comparadas com aquelas do controle.

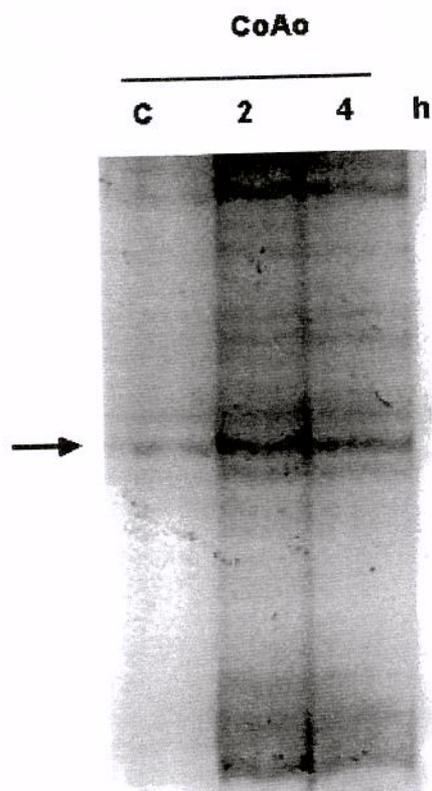


Figura 4: Autorradiografia de eletroforese de produtos do *mRNA differential display*. A figura mostra exemplo representativo de ampliações, com um par de oligonucleotídeo 5'(aleatório) e 3' (poli-T degenerado), de amostras de RNA provenientes de ventrículo esquerdo de rato controle (C) submetido à cirurgia fictícia e de ratos submetidos a 2 e 4 horas de constrição da aorta (CoAo).

2. Re-amplificação

Após a identificação e extração dos produtos de cDNA de interesse (que aumentaram após a constrição da aorta), foi realizada sua re-amplificação com os mesmos oligonucleotídeos utilizados na reação de transcrição reversa acoplada à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para a expansão e clonagem dos produtos escolhidos. A figura 5 mostra exemplos representativos de experimentos de re-amplificação realizados com produtos diferentes extraídos dos géis de poliacrilamida da reação de *mRNA differential display*. Observa-se que a grande maioria dos produtos re-amplificaram bandas únicas de cDNA, o que indica a presença de produtos únicos nas bandas individuais.

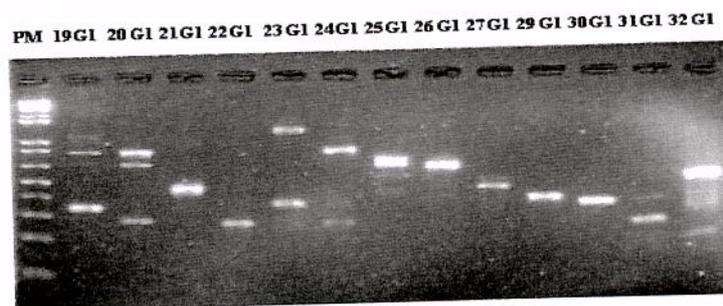
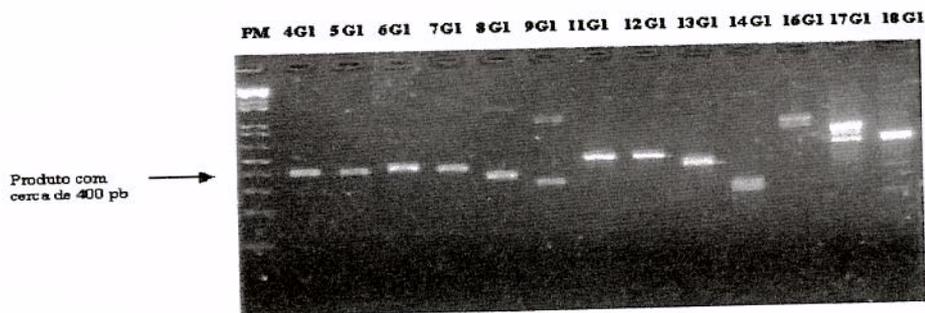


Figura 5: Resultados de experimentos de re-amplificação de produtos que apresentaram expressão diferencial na reação de mRNA differential display. As fotografias A e B foram obtidas de géis de agarose marcados com brometo de etídeo e iluminados com luz ultra-violeta. Os oligonucleotídeos utilizados na PCR foram os mesmos utilizados para a obtenção dos produtos na reação de mRNA differential display. Os marcadores no topo das fotografias indicam a origem dos produtos, de acordo com notação estabelecida no presente estudo.

4. Clonagem

Os produtos que se apresentaram como bandas únicas nas reações de re-amplificação foram então processados para inserção em vetor de clonagem pUC18 (ver Material e Métodos) com o objetivo de permitir sua identificação através de experimentos subsequentes de sequenciamento. Uma vez inserido nos vetores de clonagem, os produtos de cDNA foram amplificados com oligonucleotídeos dirigidos para seqüências fixas presentes nas extremidades 3' e 5' da região de inserção, fornecidos no kit de clonagem. A Figura 6, mostra exemplos representativos de produtos de cDNA clonados em vetor pUC18 e amplificados com oligonucleotídeos específicos direcionados para seqüências do vetor. É digno de nota o fato de que estes produtos apresentam-se com pesos moleculares discretamente maiores que aqueles dos produtos de cDNA, já que incluem, além da seqüência clonada, fragmentos do plasmídeo.

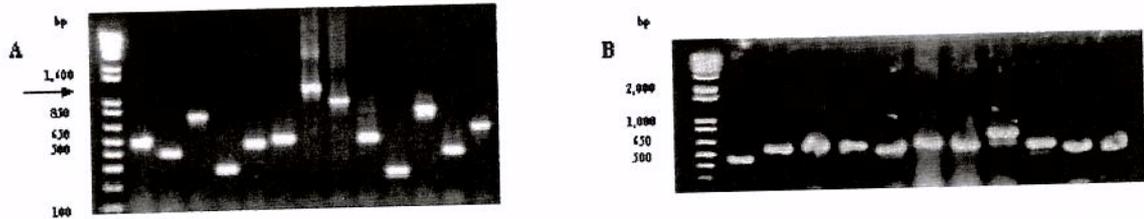


Figura 6: Resultados de experimentos de amplificação com PCR de produtos de cDNA clonados em vetor de expressão pUC18. A. Fotografia de gel de agarose marcado com brometo de etídeo obtida em câmara com luz ultra-violeta de produtos clonados, originados de diferentes fragmentos obtidos na reação de mRNA differential display. B. Fotografia de gel de agarose de um produto clonado e amplificado em várias reações semelhantes, mostrando a reprodutibilidade do método.

5. Sequenciamento

Os produtos clonados foram então seqüenciados através do método de Sanger (41) em seqüenciador automático. A figura 7 mostra um exemplo representativo de cromatograma de seqüência obtida através deste método. Para o sequenciamento foram utilizados produtos de duas reações, uma com oligonucleotídeo 5'e outra com oligonucleotídeo 3' do vetor de clonagem.

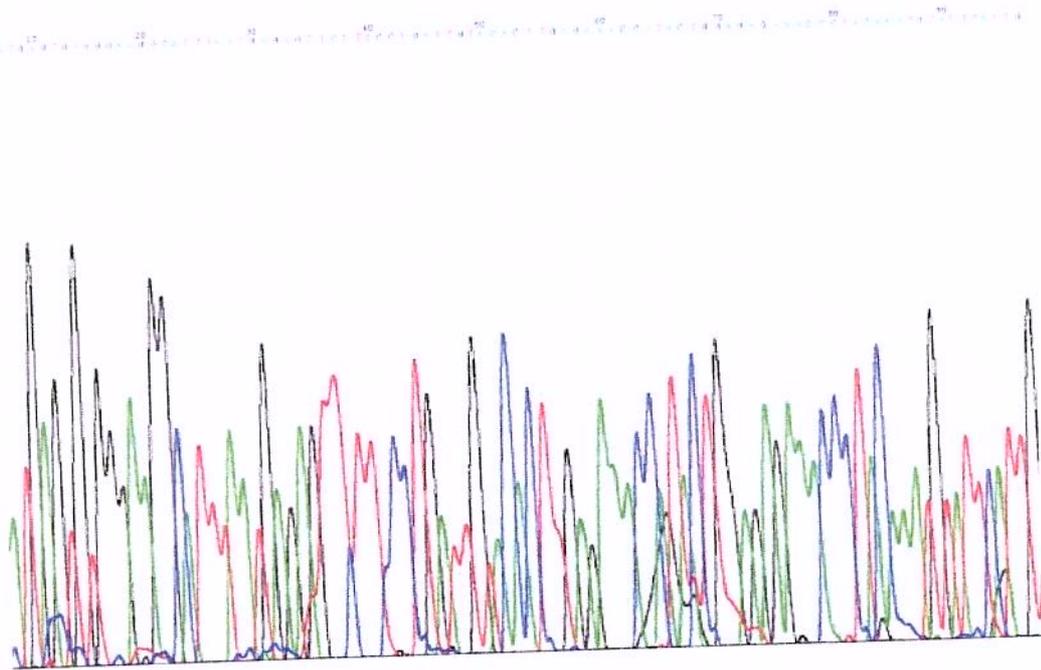


Figura 7: Cromatograma de seqüência obtida da reação de sequenciamento de cDNA da reação de mRNA differential display, clonado em vetor pUC18.

6. Análise das seqüências

A reação de sequenciamento forneceu as seqüências de nucleotídeos correspondentes aos fragmentos provenientes da reação com os oligonucleotídeos 5' e 3' do vetor de clonagem. As seqüências foram analisadas com o programa Phred/Phrap (Phred/Phrap/consed/system) para retirada de fragmento do vetor e ajuste dos produtos obtidos com cada um dos oligonucleotídeos, resultando em alinhamento das seqüências. As seqüências obtidas no presente estudo foram identificadas e posteriormente comparadas com seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As seqüências foram analisadas com o programa BLAST no servidor do NCBI, onde as seqüências de nucleotídeos foram automaticamente traduzidas em seqüências de aminoácidos. Foram obtidas 5 seqüências de proteínas homólogas às submetidas (tabela 4) e com elevada identidade (cerca de 98 %). Na tabela 4 estão indicadas as 5 seqüências e suas identificações no GenBank.

Tabela 4: Genes identificados que apresentaram aumento de expressão avaliado pela reação de mRNA differential display em RNA de corações de ratos submetidos a sobrecarga pressora e seus respectivos números de identificação no GenBank.

Identidade	Nome do gene
Xm122113	Tank-binding Kinase 1
BC005424	Tumor susceptibility gene 101 protein
D10926	Tissue factor pathway inhibitor precursor
NC001665	NADH deydrogenase subunit 4
AF115771	ATP syntase subunit 8

Dentre os produtos obtidos, interessamo-nos em investigar o papel funcional daquele correspondente à proteína Tank-binding Kinase 1 (TBK1) por suas possíveis implicações na fisiopatogênese da hipertrofia cardíaca. Na figura 8 está representada a seqüência completa da região codificadora do gen da TBK1 depositado no GenBank. A região da seqüência obtida nos experimentos de *mRNA differential display* está identificada, localizando-se entre os nucleotídeos 480 e 899. Pôde-se observar do alinhamento mostrado na Fig 9, a elevada homologia entre o fragmento obtido e a seqüência depositada no GenBank.

```

1 cccccctatc gtagggagaa gggccctggac aagcccgagat gcagagcacc tccaaaccatc
61 tctgggtccc gtctgatata ctaggcccagg gggcccactgc aaatgtcttc cggaggaaggc
121 ataagaaaac tgggtgatctc tabgctgtca aagtatttaa taacataaagc ttcctctcgcc
181 cagtgggatgt tcaaatygaga gaabttgaaag tgttaaaaaa actcaatcac aaaaacattcg
241 tcaagttatt tgcatttgaa gaggagacaa caacaagaca taaagtgcctt attatggagt
301 tttgtcccctg tgggagttta taccctgttc tagaggagcc gtccaatggc batggacttc
361 cagaaacaga atttctcabb gtctaacgag abgtggbtggg cgggatgaat cabctccgag
421 agaaccggcat agtgcaccga gatataaagc caggcaacat catgcgcgtc ataggggagg
481 accgcccagtc tctgtacaaa ctcaaccgatt ccggcgcacc tcgagagctc gaggaccgatg
541 accagttbgt gtctctgtac ggcacaagaag agtaccctgca tccggacatg batgaaagggg
601 cagtgctaaag aaxygaccat cagaagaagt accgggctac cgttgatctg tggagtgttc
661 gagtgacatb ctaccatgca gccaccgggtt cgtctgcctt tagacccttc gaggggccacc
721 ggaggaacaa agaaagtaabg tataaaabaa tcaactgggaa gccgtctggt gcaabattctg
781 gagtacagaa agcagaaaaa ggaaccaatg acbggagtgg agacatgctt ctctctctga
841 gtctttctca gggctcttcag gcaactgctt ccccaagtct tgcaaaatba ctctgaagctg
901 atcaggagaa gtgctgggggt tttgaccagt tctttgcaga gccaccgtgat gtgcttccac
961 gaatggtaaat ccabgtcttc tccctaacac acatgaccgc gcataagatt tccatbaca
1021 gctatnaaac tctgtctgtg tcccatgaac tggctctata acaaaacaa atgttctctc
1081 caaatcaaga acttatctac gaaggacgac gcttagctct agaaetcgga cgaactagccc
1141 agcattttcc taaaaaccaca gaggaaaaab ctatctttgt caccgagccgg gaaacaactca
1201 ataccgtagg actgagatat gaaaaaattt cctctcctaa aatcacatca cgtatgatca
1261 tgggatgggga cgcaccgatg gccaaaggcag tgaccgggggt tctgtgctac gccctcagaa
1321 ctgcaccgac cctgctgctc tacaagaat taatgcaaaa gggggtaccg tggctggttg
1381 aactggttaa ggatgattac aacgagaccg tccacaagaa gaccggaggtg gtgatcaaac
1441 tggatbttctg cctcaggaac atbtgagaaga ctgtgaaagt gtatgagaag ttgatgaagg
1501 tcaaacctgga ageccagag ctgggtgaga ttteagacat acacaaccag ctgctgagac
1561 tctccagttc tcagggaaca atgaaaagca gtcttcagga caccagcagc aggetgtctc
1621 caggggggctt getggccgac acctgggca atcaagaagg caccgatcca agagaccgga
1681 atgtagaaaa actgcaggtc ctgttgaact gcatcacaga gatttaetat cagttcaaaa
1741 aagcaaaagc agaaccgaga ctactttata atgaaagaa gateccaaa tttgatagc
1801 aaaaattgta ttaccatgcc aaaaaagcaa tgagccactt ctcaagaa tctgttagaa
1861 agtatgaagc gtttaagat aagtccggaag agtggatgag aaagatgctt cabcttagga
1921 agcagctgtt atcctaaact aatcagtttt tccatctega agaggaaagt tcccaagtac
1981 aagactatac taaccagttc caagaaactc tgcctcagaa aatgctctca gccctccggc
2041 gcgtcaagca cgcacatggc ccgatctacc ccagctctaa caccctagtg gagatgactc
2101 ttggatbtaa gaagttaaa gaggagatgg aaggcgtggt taaggagctg gccgagaaac
2161 atcatatctt agaaaagttt gggctcttaa caatggatgg tggcctctgc aatgtggact
2221 gtctttagct tctcagggag tctgggaagt ctatagtttc acaagaagat aacctgggg
2281 caacaaatga acacctttgt gaatggagtt ctatctctca cacttcagta tttgatgagg
2341 tcatgtaaat atgtacagtt tgtaaataca tabacatata tatatatatg aattttggtt
2401 gctgtacaaa agacagattg acctcagcga gctgtagaag aaagccatga ccagccagtg
2461 ctttgggtgc tctccctaat tcttcacata agctgggaga aatcaattgc ttggtgcctc
2521 aaggaagtat tttttgaatt ggcattctta aatttttgaa aggaactgata gtcgacacag
2581 tgtaaactgga ggaacacag ggcctttgta cgggaacaga acccggtttt aaccacagtc
2641 ggttcccctg caaggataaa gtggcattat ctcaattgac cgggtgcccc aatctcagtt
2701 tctctggat gttgattt agtgaatta ttgacaaaa accttaagt

```

Figura 8: Sequência completa do cDNA da TBK1 depositada no GenBank. Os nucleotídeos em destaque (azul) indicam a região de homologia entre o cDNA obtido do sequenciamento e a sequência depositada no GenBank

```

Query 206 c a c g c a g c c a c g g g g t o g c t g c c c t t t a g a c c c t t c g a g g g g c c t o g g a g g a a c a a
Sbjct 677 c a t g c a g c c a c g g g g t c g c t g c c g t t t a g a c c c t t c g a g g g g c c a c g g a g g a a c a a

262 a g a a g t a a t g t a t a a a a t a a t c a c t g g g a a g c c t t c t g g t g c a a t a t c t g g a g t a c
733 a g a a g t a a t g t a t a a a a t a a t c a c t g g g a a g c c g t c t g g t g c a a t a t c t g g a g t a c

318 a g a a a g c a g a a a a c g g a c c a a t t g a c t g g a g t g g a g a c a t g c c t c t t t c t t g t a g t
789 a g a a a g c a g a a a a c g g a c c a a t t g a c t g g a g t g g a g a c a t g c c t c t c t c t t g t a g t

374 c t t t c t c a g g g t c t t c a g g c a c t g c t t a c c c c a g t t o t t g c a a a c a t a c t t g a a g c t
733 c t t t c t c a g g g t c t t c a g g c a c t g c t t a c c c c a g t t c t t g c a a a c a t a c t t g a a g c t

```

Figura 9: A figura mostra o alinhamento das seqüências de nucleotídeos da proteína submetida à análise (query) e da proteína TBK1 (sjct) depositada no GenBank, na região da maior identidade entre as duas. Os nucleotídeos assinalados indicam as diferenças entre as duas seqüências.

7. Estudos Funcionais

7.1. Produto de RT-PCR Tank-Binding kinase 1

Como primeira abordagem para caracterizar funcionalmente a participação da TBK1 na sinalização celular em miocárdio submetido a sobrecarga pressora, realizamos experimentos confirmatórios do aumento da expressão do mRNA que codifica esta proteína em ventrículo esquerdo de ratos submetidos a constricção da aorta por 2 e 4 horas através da técnica de RT-PCR. A RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para a proteína TBK1 indicou um aumento acentuado da expressão gênica deste produto com duas horas de sobrecarga pressora (Figura 10A). O aumento da expressão permaneceu até quatro horas de sobrecarga em relação ao controle. É importante mencionar que a RT-PCR foi realizada com apenas 20 ciclos, o que permitiu uma avaliação semi-quantitativa dos produtos. Além disso, os resultados de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para TBK-1 foram comparados com aqueles da RT-PCR realizada com oligonucleotídeos específicos para a *b-actina*, um gen de expressão ubíqua e constitutiva no miocárdio. Na figura 10B está representado o resultado de um experimento de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos da *b-actina*.

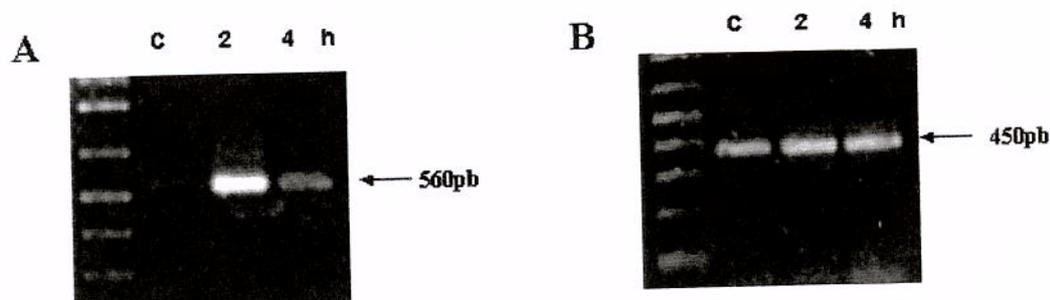


Figura 10: Resultado de experimento de RT-PCR para confirmação do aumento de expressão do mRNA da proteína TBK1. **A.** Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e fotografado em câmara de luz ultravioleta de PCR com oligonucleotídeos específicos á TBK1, onde se observou um aumento da expressão gênica da TBK1 com 2 horas permanecendo-se elevada 4 horas após a sobrecarga pressora em relação ao controle. **B.** Fotografia de gel de agarose, de RT-PCR com oligonucleotídeos gene específicos da proteína β actina, gen de expressão ubíqua no miocárdio, que permitiu a comparação entre os resultados. **Figura 7: A:** Eletroforese em gel de agarose de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos genes específicos da proteína **Tank-Binding Kinase 1**. **B:** Eletroforese em gel de agarose ,dos mesmos fragmentos da figura A, de RT-PCR com oligonucleotídeos gene específicos da proteína **B-actina**.

7.2. Expressão de TBK1 no miocárdio

Para avaliar a expressão da proteína TBK-1 no miocárdio de ratos, foram realizados experimentos com a técnica de Western Blot com anticorpo anti-TBK-1 em homogenatos de miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos controle e de ratos submetidos a sobrecarga pressora. A figura 11A mostra o resultado de blot realizado com pools de homogenatos do miocárdio (n=5) do ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecargas pressoras com duração de 30 minutos até 24 horas e anticorpo anti-TBK-1. Ocorreu, como indicado, aumento significativo da expressão desta proteína no miocárdio, detectado após cerca de 2 horas de sobrecarga pressora, permanecendo elevada até 24 horas após o início da sobrecarga.

Experimentos adicionais com a técnica de Western Blot foram realizados com extratos nucleares para a avaliação da localização celular da TBK1. Na figura 11B, está representado um exemplo de blot de pools de extratos nucleares de miocárdio de ventrículo esquerdo de ratos controle e submetidos a sobrecarga pressoras que variaram de 30 min a 24 horas. No exemplo da figura 8B, nota-se nítido aumento da quantidade de TBK-1 presente no extrato nuclear de miocárdio após 30 min de sobrecarga pressora, aumento que permaneceu até 24 horas após a constrição da aorta. Estes resultados foram sugestivos de translocação da TBK-1 do compartimento citosólico para o compartimento nuclear de células miocárdicas.

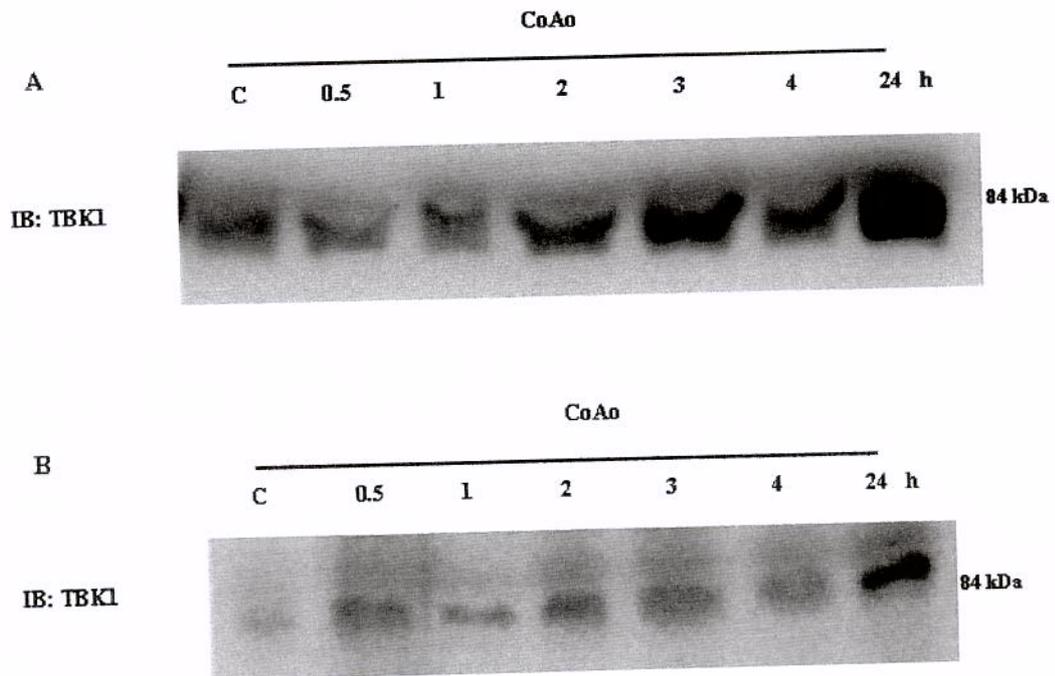


Figura 11: Resultados de experimentos de Western Blot para avaliação da expressão da proteína TBK1 e sua localização celular. A. Auto-radiografia de gel de poliacrilamida 10% marcado com ^{125}I de imunoblotting de homogenatos de ventrículos esquerdos de ratos submetidos a sobrecarga pressora com anticorpo anti-TBK1. B. Western Blot realizado com extratos nucleares de ventrículos esquerdos de ratos controle e submetidos a sobrecarga pressora.

7.3. Localização da TBK-1 no miocárdio de ratos

Para identificar a localização da TBK-1 no miocárdio foram realizados experimentos com a técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-TBK1. Na figura 12 está representado um exemplo de corte histológico que inclui miócitos cardíacos e artéria coronária de médio calibre, marcado com anticorpo anti-TBK1. É nítida a marcação dos miócitos cardíacos e das células da parede média da artéria coronária, indicando que a TBK1 é expressa em mais de um tipo celular no miocárdio, o que implica que esta proteína pode participar de vários processos que envolvam o miocárdio. A figura 13, mostra corte histológico marcado com anticorpo anti-TBK1, ampliado para identificar miócitos cardíacos dispostos de forma longitudinal. Neste caso, pode-se identificar marcação nos miócitos, localizada em regiões nucleares e sarcoplasmáticas, neste último caso distribuindo-se de maneira semelhante à organização sarcomérica.

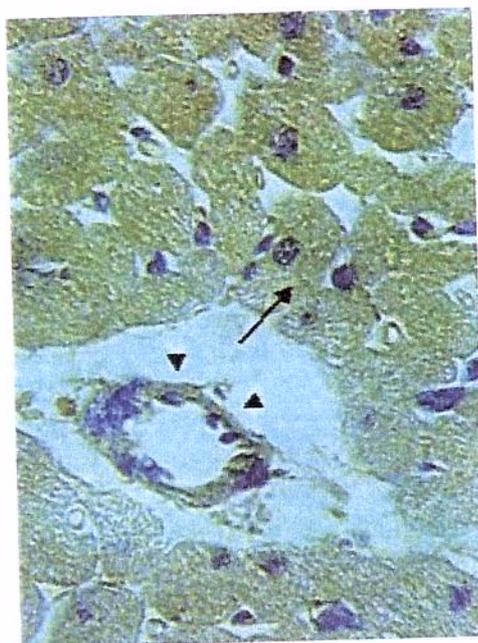


Figura 12: Marcação imunohistoquímica de miocárdio de rato após 4 horas de sobrecarga pressora utilizando anticorpo anti-TBK1 (Aumento 960X). A marcação foi observada predominantemente em miócitos cardíacos (seta) e na camada média das artérias coronárias (cabeças de setas).



Figura 13: Corte histológico longitudinal de miocárdio de rato utilizando imuno-marcação com anticorpo anti-TBK1, após 4 horas de sobrecarga pressora (Aumento 1.150X). A marcação foi detectada na periferia (cabeça de seta) e núcleo (seta) dos miócitos cardíacos e em regiões do sarcoplasma (*) lembrando a distribuição dos túbulos-T.

7.4. Atividade Quinase *in vitro*

A TBK1 foi identificada anteriormente como uma serina-quinase capaz de ativar o fator de transcrição NF- κ B através da fosforilação das quinases IKKs. Uma vez ativadas as IKKs fosforilam a proteína repressora da atividade do NF- κ B, o que permite a migração para o núcleo e a ativação do NF- κ B (37). Estudos mais recentes indicaram que a atividade do NF- κ B depende, além de sua migração para o núcleo de sua fosforilação em resíduos de serina, que poderia ser efetivada pela TBK1 (46). Para analisar a atividade de quinase da TBK1 no miocárdio e sua relação com a sobrecarga pressora, realizamos experimentos de quinase *in vitro*, com TBK1 imunoprecipitada de homogenatos de ventrículo esquerdo de ratos controle e submetidos a sobrecarga pressora em tempos variáveis entre 30 min e 24 horas. Como substrato para este imunocomplexo, utilizamos NF- κ B imunoprecipitado de homogenatos de corações controle. Os resultados deste experimento são apresentados na Figura 14 e indicam que a atividade de quinase associada ao imunocomplexo do anticorpo anti-TBK1 é baixa em miocárdio controle e aumenta significativamente em miocárdio obtidos de corações submetidos a sobrecarga pressora.

Experimentos adicionais utilizando-se a metodologia de co-imunoprecipitação estenderam os resultados dos experimentos de quinase *in vitro*, mostrando que ocorre co-imunoprecipitação entre TBK1 e NF- κ B, indicando a associação destas duas proteínas e que esta associação aumentou em miocárdios de corações submetidos a sobrecarga pressora (Figura 15).

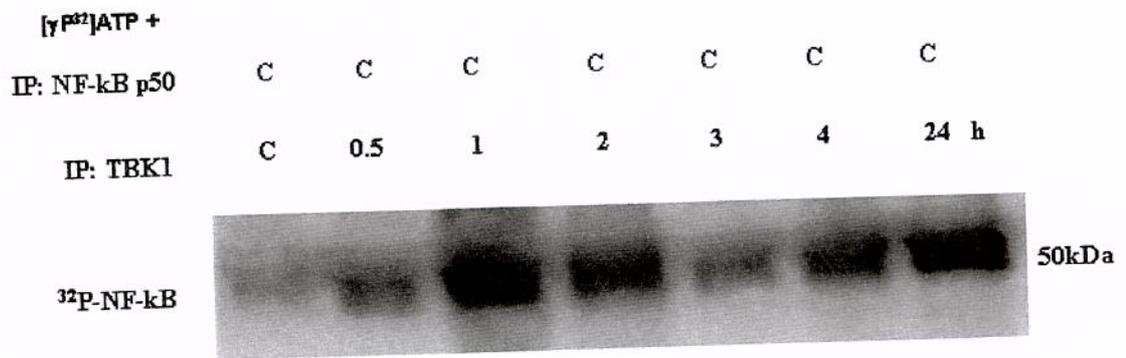


Figura 14: Blot representativo de experimento de quinase *in vitro* para análise da atividade quinase da TBK1. Homogenatos de ventrículo esquerdo de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora foram imunoprecipitados com anticorpo anti-TBK1. Como substrato para a reação foram utilizados homogenatos de ventrículos esquerdos de ratos controle imunoprecipitados com anticorpo anti-NF- κ B.

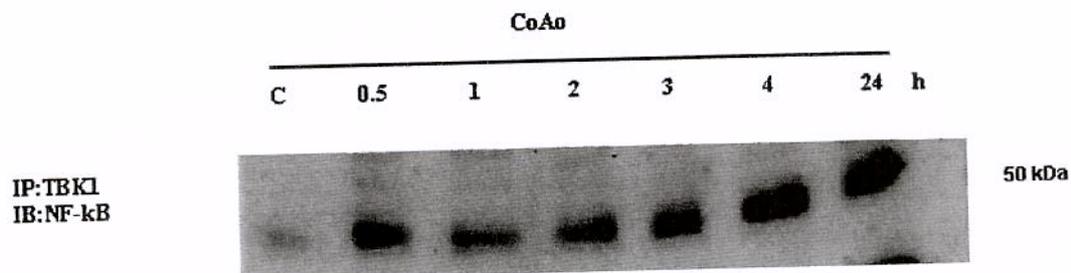


Figura 15: Blot representativo de experimento de co-imunoprecipitação, onde ventrículos esquerdos de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora foram co-imunoprecipitados com anticorpo anti-TBK1 e incubados com anticorpo anti-NF-kBp50. Pôde-se evidenciar co-imunoprecipitação entre TBK1 e NF-kB, indicando a associação destas duas proteínas e que esta associação aumentou com o decorrer dos tempos de sobrecarga pressora.

7.5. Avaliação da translocação e ativação do NF-kB no miocárdio induzidas pela sobrecarga pressora.

O fato de nossos resultados anteriores terem sugerido a ativação do fator de transcrição NF-kB no miocárdio de ratos induzida pela sobrecarga pressora e a possível participação da TBK1 neste processo, levou-nos a realizar experimentos para avaliar a atividade do NF-kB no miocárdio submetido a sobrecarga pressora.

Inicialmente realizamos experimentos com a técnica de Western Blot em extratos nucleares e citosólicos de miocárdico. Um experimento representativo deste estudo está demonstrado na Figura 16, onde extratos nucleares (A) e citosólicos (B) foram marcados com anticorpo anti-NFkB. Como demonstrado, ocorreu em miocárdios submetidos a sobrecarga pressora, ocorreu diminuição da quantidade de NF-kB na fração citosólica, detectável com 2 horas de sobrecarga, enquanto que simultaneamente ocorreu aumento na quantidade de NF-kB detectada na fração nuclear destes homogenatos. Estes resultados indicam a translocação do NF-kB do citosol para o núcleo, induzida pela sobrecarga pressora. Os resultados de experimentos realizados com a técnica de imunohistoquímica corroboraram esta hipótese. Como indicado na Figura 17, no miocárdio controle ocorreu marcação do citosol e núcleo dos miócitos cardíacos com anticorpo anti-NF-kB, enquanto após a sobrecarga pressora, marcação nuclear mais intensa foi observada.

Finalmente, realizamos experimentos com a técnica EMSA para a avaliação da atividade transcripcional do NF-kB no miocárdio de corações submetidos a sobrecarga pressora. A Figura 18 é de um exemplo representativo de experimento com a técnica EMSA, indicando que ocorreu maior ligação do NF-kB com a sonda marcada (sequência de consenso do NF-kB) no NF-kB obtido de extratos nucleares de ventrículos esquerdos de corações submetidos a sobrecarga pressora.

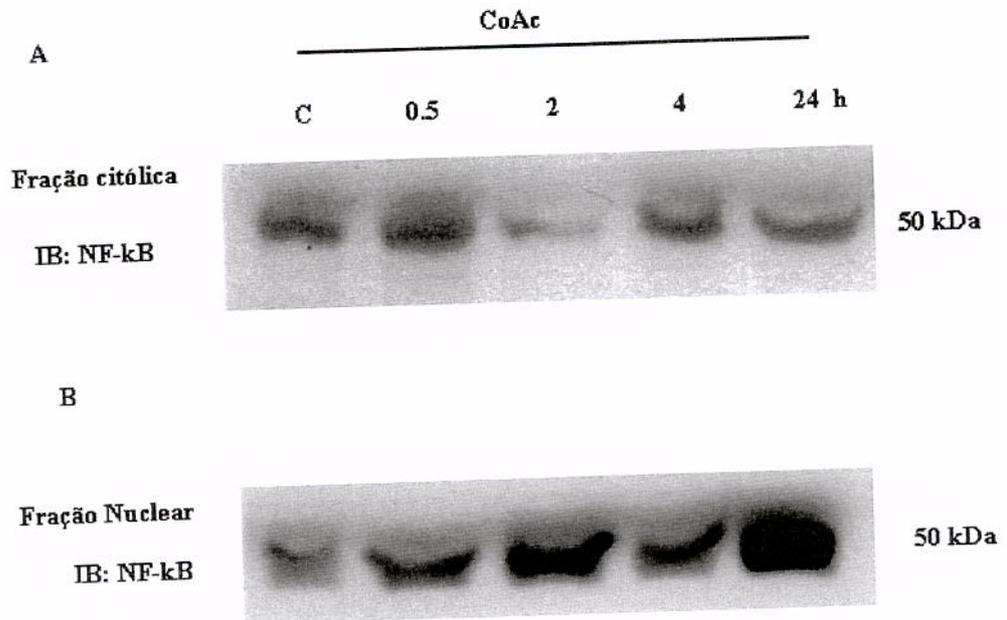


Figura 16: Resultado de Western Blot em extratos nucleares e citosólicos de ventrículos esquerdos controle e submetidos à sobrecarga pressora, para avaliar a translocação do NF-kB. A. auto-radiografia de gel de poliacrilamida 10% marcado com ^{125}I Os extratos nucleares foram incubados com anticorpo anti-NF-kB p50. B. auto-radiografia de gel de poliacrilamida 10% marcado com ^{125}I , extratos citosólicos foram incubados com anticorpo anti-NF-kB p50.

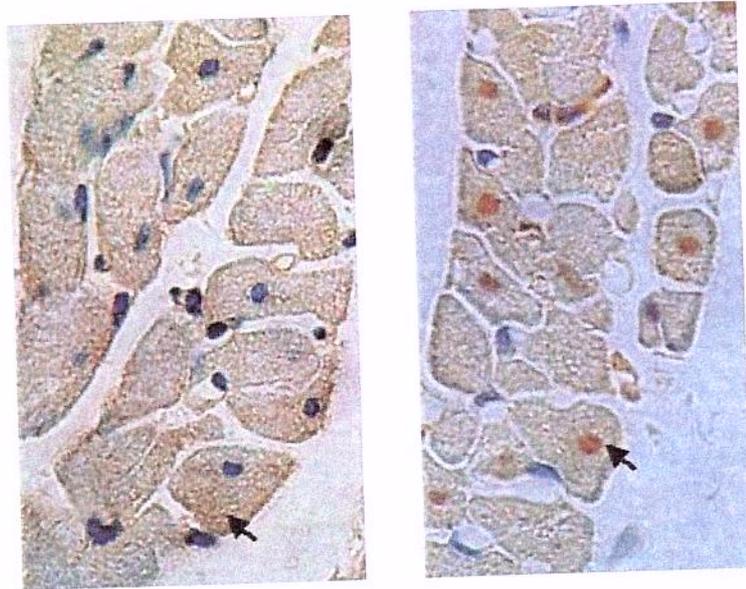


Figura 17: Cortes histológicos de miocárdio imunomarcados com anticorpo anti-NF- κ B, em situação controle e após 24 horas de sobrecarga pressora, para identificação de sua localização e distribuição (aumento 960X). No miocárdio controle detectou-se marcação do citosol e núcleo dos miócitos cardíacos com anticorpo anti-NF- κ B, enquanto após a sobrecarga pressora (24 horas), houve marcação nuclear mais intensa.

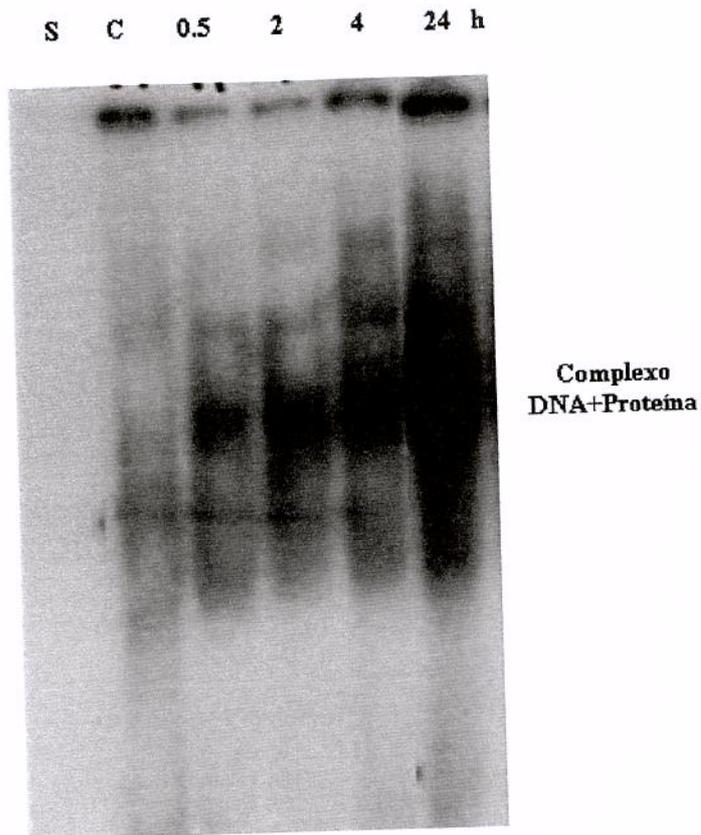


Figura 18: Auto-radiografia de EMSA de extratos nucleares de ventrículos esquerdos de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora hibridizados com sonda de oligonucleotídeo que contem a seqüência de consenso para proteína NF-kB , com dATP marcado com $[\alpha P^{32}]$. S (sonda), é o controle negativo da reação, onde noi foi adicionado o homogenato dos miocárdios, indicando que não houve formação dos complexos.



DISCUSSÃO

No presente estudo utilizamos a técnica de *mRNA differential display* aplicada ao RNA total obtido de miocárdio de ratos para avaliar a regulação da expressão gênica ampla em resposta à sobrecarga pressora aguda provocada por constricção da crossa da aorta. Pela realização de experimentos de *mRNA differential display* com 9 oligonucleotídeos poli-T 11 mer (9 Ts e 2 nucleotídeos variáveis alternados entre G, C, A) e 24 oligonucleotídeos aleatórios, obtivemos 43 produtos que apresentaram aumento de expressão comparados com produtos de reações com RNA do miocárdio de ratos controle. Estes 43 produtos foram isolados, clonados em vetor de clonagem e posteriormente seqüenciados e avaliados comparativamente com seqüências depositadas no GenBank. Das seqüências avaliadas, apenas 5 apresentaram elevado grau de homologia com genes já conhecidos. Dois destes genes codificam enzimas mitocondriais e três deles são genes que codificam proteínas relacionadas a vias de sinalização celular a estímulos externos. Um destes genes, TBK1, também denominado NAK e T2K, despertou nosso interesse por codificar uma serina-quinase já descrita anteriormente como importante na ativação do fator de transcrição NF- κ B (5,37,46). Este fator de transcrição tem distribuição ubíqua no organismo e regula a expressão de múltiplos genes, envolvidos em respostas celulares a diferentes estímulos. Outro fato importante sobre a quinase TBK1 é que os poucos estudos disponíveis sobre sua função apontam-na como uma proteína fundamental para o processo de sobrevivência celular (5,37,38,46). Estudos anteriores demonstraram a inviabilidade de camundongos knockout da TBK1, por apresentarem apoptose hepática maciça, o que corrobora a idéia de que esta proteína tem papel importante em vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular.

Estes elementos nos estimularam a realizar experimentos adicionais no sentido de caracterizar a expressão, localização e prováveis funções desta proteína na sinalização celular à sobrecarga pressora em miocárdio de rato. Os resultados destes estudos funcionais permitiram-nos concluir que a TBK1 se expressa no miocárdio de ratos em miócitos cardíacos e células da camada média das artérias coronárias e que aumenta sua expressão miocárdica em corações submetidos a sobrecarga pressora. Além disso, demonstramos que a TBK1 pode localizar-se não apenas no citosol, mas também no núcleo de células miocárdicas, particularmente em células miocárdicas de corações sobrecarregados. Esta conclusão foi baseada nos resultados de experimentos de western blot realizados em

extratos nucleares e citosólicos, bem como experimentos com a técnica de marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-TBK1. Os resultados destes experimentos foram ampliados com resultados de experimentos de reação de quinase *in vitro* realizados com imunoprecipitados de anticorpo anti-TBK1 obtidos de corações controle e imunoprecipitados de anticorpo anti-NF- κ B obtidos de corações controle não sobrecarregados. Os resultados destes experimentos mostraram que imunoprecipitados de anticorpo anti-TBK1 induzem a fosforilação do NF- κ B, efeito este maior com imunoprecipitados de anti-TBK1 obtidos de homogenatos de corações sobrecarregados, sugerindo que a ativação da TBK1 pode regular a atividade de NF- κ B através da fosforilação deste fator de transcrição.

Neste contexto, foram realizados experimentos para avaliar a expressão, localização e atividade do NF- κ B no miocárdio de ratos submetidos a sobrecarga de pressão. Os resultados de experimentos realizados com a marcação com o anticorpo anti-NF- κ B em extratos nucleares e citosólicos indicaram a translocação do NF- κ B do citosol para o núcleo em miocárdios de corações sobrecarregados, sendo estes resultados corroborados por aqueles obtidos com imunomarcação do miocárdio em experimentos com imunohistoquímica que indicaram marcação mais intensa nos núcleos dos miócitos cardíacos de corações sobrecarregados que nos controles. Finalmente, experimentos com a técnica EMSA indicaram a sobrecarga pressora induz a aumento da atividade do NF- κ B no miocárdio de ratos, indicada pela maior ligação de NF- κ B de extratos nucleares obtidos de miocárdios sobrecarregados. É digno de nota o fato de que tanto a translocação para o núcleo como o aumento na atividade de ligação com DNA do NF- κ B ocorreram simultaneamente com o aumento da expressão de TBK1 e com o aumento da atividade dos imunoprecipitados do anticorpo anti-TBK1, o que sugere uma relação de causa e efeito entre as ativações da TBK1 e do NF- κ B no miocárdio induzidas pela sobrecarga pressora.

Nossos resultados são os primeiros a caracterizar a presença da TBK1 no miocárdio de ratos, bem como a demonstram o possível envolvimento desta enzima na sinalização celular em miocárdio ativada por sobrecarga mecânica. Estudos prévios detectaram a presença de mRNA de TBK1 em corações humanos utilizando a técnica de northern blot (46), porém nenhum dado foi publicado à respeito dos níveis de expressão da

proteína, tipos celulares, regulação e seu papel no coração em condições fisiológicas e fisiopatológicas. Nossa demonstração, no presente estudo, de que a TBK1 sofre uma rápida associação com NF- κ B e a indução de fosforilação do NF- κ B por imunoprecipitados do anticorpo anti-TBK1 está de acordo com a noção geral de que a TBK1 tem papel importante na ativação do NF- κ B (5,37,46).

Embora os detalhes dos mecanismos pelos quais a TBK1 ativa o NF- κ B ainda sejam desconhecidos e não tenhamos realizado, neste estudo, análises mais detalhadas que pudessem esclarecer este tópico, supomos que a TBK1 pode mediar a ativação do NF- κ B no miocárdio sobrecarregado através de pelo menos dois mecanismos diferentes.

Um dos mecanismos seria através da indução da translocação do NF- κ B para o núcleo. Neste contexto, demonstrou-se anteriormente que a TBK1 é necessária para a ativação da IKK β (5,37,46). Esta quinase, por sua vez, é responsável pela fosforilação e dissociação do I- κ B do NF- κ B, o que permite a migração do NF- κ B para o núcleo. Este, por sua vez, é considerado um passo fundamental na regulação da expressão gênica por este fator de transcrição (2,37,46)

Por outro lado, a TBK1 poderia atuar através da ativação do NF- κ B, fato este sugerido pela fosforilação do NF- κ B induzida pelo imunocomplexo do anticorpo anti-TBK1. Esta hipótese foi também sugerida em estudos anteriores (37). Neste caso, o TBK1 estaria envolvido na regulação, induzida por sobrecarga, do NF- κ B através da ativação de sua atividade transcricional. Contudo, são ainda necessários estudos adicionais para esclarecer diversos pontos obscuros. Assim, é preciso esclarecer se a TBK1 induz a fosforilação do NF- κ B diretamente ou via quinases associadas (IKK α,β), determinar a identidade dos resíduos fosforilados do NF- κ B e sua importância para a atividade transcricional deste fator.

Dado o fato de que o estímulo mecânico ativa vias de sinalização através de múltiplos mecanismos, seria importante também conhecer a identidade dos receptores de membrana que estão envolvidos no início da cascata de ativação da TBK1, assim como os fatores envolvidos na regulação de sua transcrição. Neste momento podemos apenas especular a respeito desse tópico baseados em resultados de estudos prévios que

demonstraram a ativação da TBK1 por vias de sinalização ativadas por citocinas e fatores receptores de crescimento (5,46). É digno de nota que, estes fatores também estão envolvidos nas respostas de sinalização celular miocárdicas a estímulos hipertróficos. Merecerá esclarecimento, portanto, se a TBK1 funciona como mediador intracelular destes estímulos.

Nossos dados mostraram que a TBK1 é expressa em níveis relativamente baixos em miocárdio de ratos controles e sua transcrição é aumentada no miocárdio por sobrecarga pressora. Esses dados são compatíveis com resultados de outras fontes (5,37,46) que indicam a presença de TBK1 em níveis baixos em células não estimuladas e sua indução por estímulos, tal como tratamento com TNF, por exemplo. Este comportamento não é usual para moléculas envolvidas em cascatas de sinalização celular, já que normalmente moléculas sinalizadoras são ativadas por mecanismos pós-translacionais como fosforilação, por exemplo. A explicação para a necessidade de aumento de expressão da TBK1 não é aparente. No entanto, nossos dados também mostraram que a TBK1 pode se translocar para o núcleo o que poderia sugerir que esta enzima poderia ser catabolizada após ativar o Nf-kB no núcleo, necessitando, assim, maior transcrição em situações de maior atividade.

Finalmente, a demonstração em nosso estudo da ativação do NF-kB, cerca de duas horas após a coarctação da aorta, é compatível com a idéia de que o NF-kB pode exercer uma função na regulação gênica durante a resposta inicial à sobrecarga de pressão no ventrículo esquerdo. Este achado é compatível com resultados de outros estudos que demonstraram que o NF-kB é essencial para o crescimento hipertrófico e manutenção dos miócitos cardíacos em resposta a vários mecanismos de estresses (18,38). Ainda neste contexto, demonstrou-se que o NF-kB tem função central na regulação da expressão de ANF (marcador do crescimento hipertrófico de miócitos cardíacos) durante o crescimento hipertrófico (25,26,38). Demonstrou-se que o NF-kB medeia a indução de angiotensinogênio e regula a expressão de citocinas, TNF e IL6 (2), os quais poderiam gerar um sinal de retro-alimentação positiva, que por sua vez prolongaria a resposta hipertrófica.



CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a técnica de *mRNA differential display* de análise da expressão gênica ampla é adequada ao estudos dos mecanismos de regulação gênica envolvidos na resposta do miocárdio à sobrecarga pressora. Apesar de ter baixa sensibilidade para a detecção de produtos gênicos, a identificação de genes específicos pouco explorados quanto ao seu papel no processo de controle da resposta miocárdica à sobrecarga pressora, pode permitir avanços no conhecimento da patogênese da hipertrofia e insuficiência cardíacas.

A identificação da quinase TBK1, no presente estudo, juntamente com a informação prévia de que esta enzima pode ser um importante elemento no controle da atividade do NF- κ B, fator de transcrição com importância potencial na resposta miocárdica à sobrecarga pressora levou-nos a investigar mais profundamente a TBK1 em estudos funcionais. Os resultados desta análise permitem-nos concluir que o TBK1 é ativado, aumenta a expressão e modula a atividade do NF- κ B durante os eventos iniciais após o estabelecimento de sobrecarga pressora no miocárdio.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVERSA, P.; LERI, A.; BELTRAMI, C.A.; GUERRA, S.; KAJSTURA, J.- Myocyte death and growth in the failing heart. **Lab. Invest.**, **78**:767-786, 1998.
2. BALDWIN, A.S.- The transcription factor NF- κ B and human disease. **J. Clin. Invest.**, **107**: 3-6, 2001.
3. BASSEL-DUBY, R.; HERNANDEZ, M.D.; YANG, Q.; ROCELLE, J.M.; SELDIN, M.F.; WILLIAMS, R.S.- Myocyte nuclear factor, a novel winged-helix transcription factor under both developmental and neural regulation in striated myocytes. **Mol. Cell. Biol.**, **14**:4596-4605, 1994.
4. BIRBACH, A. ; GOLD, P., BINDER ,B.R.; HOFER, E.; MARTIN, R.; SCHMID, J.A.- Signaling Molecules of the NF-kB pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. **J. Biol. Chem.**, **277**: 10842-10851, 2002.
5. BONNARD, M.; MIRTSOS, C.; SUZUKI, S.; GRAHAM, K.; HUANG, J.; ITIE, A.; WAKEHAM, A.; SHAHINIAN, A.; HENZEL, W.J.; ELIA, A.J.; SHILLINGLAW, W.; MAK, T.W.; CAO, Z.; YEH, W.C.- Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kB-dependent gene transcription. **EMBO J.**, **19**: 4976-4985, 2000.
6. CONSTANZO, F.; CASTAGNOLI, L.; DENTE, L.; ARCARI, P.; SMITH, M.; CONSTANZO, P.; RAUGEI, G.; IZZO, P.; PIETROPAOLO, T.C.; BOUGUELERET, L.; CIMINO, F.; SALVATORE, F.; COETESE, R.-Cloning of several cDNA segments coding for human liver proteins. **Embo J.**, **2**(1):57-61, 1983.
7. COOPER, G. - Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. **Annu. Rev. Physiol.**, **49**:501-518, 1987.
8. CORMIER-REGARD, S.; EGELAND, D.B.; TANNOCH, V.J.; CLAYCOMB, W.C. - Differential display: identifying genes involved in cardiomyocyte proliferation. **Mol. Cell. Biochem.**, **172**(1-2):111-20, 1997.
9. DEINDL, E. & SCHAPER, W. - Gene expression after short periods of coronary occlusion. **Mol. Cell. Biochem.**, **186**(1-2):43-51, 1998.

10. DENOVA-WRIGHT, E.M.; FERRIER, G.R.; ROBERTSON, H.A.; HOWLETT, S.E. - Increased expression of the gene for alpha-interferon-inducible protein in cardiomyopathic hamster heart. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **7;267(1):103-8**, 2000.
11. DING, B.; PRICE, R.L.; GOLDSMITH, E.C.; BORG, T.K.; YAN, X.; DOUGLAS, P.S.; WEINBERG, E.O.; BARTUNEK, J.; THIELEN, T.; DIDENKO, V.V.; LORELL, B.H. - Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice : anoikis and the progression to early failure. **Circulation.**, **101: 2854-2862**, 2000.
12. DUGAN, D.J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J.M. - Expression profiles using cDNA microarrays. **Nature. Genet.**, **21:10-14**, 1999.
13. FRANCHINI, K.G.; TORSONI, A.S.; SOARES, P.H.; SAAD, M.J.A. - Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ. Res.**, **87:558-565**, 2000.
14. FRANCIS, G.S., MCDONALD, K.M.; COHN, J.N.; - Neurohumoral activation in preclinical heart failure: remodeling and the potential for intervention. **Circulation.**, **87:IV-90-IV-96**, 1993
15. GHOSH, S. & MICHAEL, K. - Missing Pieces in the NF-kB Puzzle. **Cell.**, **109:S81-S96**, 2002.
16. GOSSET, L. A.; KELVIN, D.J.; STERNBERG, E.A.; OLSON., E.N. - A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle specific genes. **Mol. Cell. Biol.**, **9:5022-5033**, 1989.
17. HASEGAWA, K.; LEE, S.J.; JOBE, S.M.; MARKHAM, B.E.; KITSIS, R.N. - Cis-acting sequences that mediate induction of the myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. **Circulation.**, **96:3943-3953**, 1997.
18. HIROTANI, S.; OTSU, K.; NISHIDA, K.; HIGUCHI, Y.; MORITA, T.; NAKAYAMA, H.; YAMAGUCHI, O.; MANO, T.; MATSUMURA, Y.; UENO, H.; TADA, M.; HORI, M. - Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Circulation.**, **105:509-515**, 2002.

19. JEYASEELAN, R.; POIZAT, C.; BAKER, R.K.; ABDISHOO, S.; ISTERABADI L.B.; LYONS, G.E.; KEDES, L. - A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, **5**;272(36):22800-8, 1997.
20. KAJSTURA, J.; LERI, A.; FINATO, N.; DI LORETO, C.; BELTRAMI, C.A.; ANVERSA, P. - Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl. Acad. Sci.*, **95**:8801-8805, 1998.
21. KISHORE, N.; HUYNH, Q.K.; MATHIALAGAN, S.; HALL, T.; ROUW, S.; CREELY, D.; LANGE, G.; CAROLL, J.; REITZ, B.; DONNELLY, A.; BODDUPALLI, H.; COMBS, R.G.; KRETZMER, K.; TRIPP, C.S. - IKK-1 and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2. Comparative analysis of recombinant human IKK-1, TBK-1, and IKK-2. *J Biol Chem* **277**:13840-13847, 2002.
22. KOMURO, I. & YAZAKI, Y. - Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* **55**:55-75, 1993.
23. KUBOTA, T.; MIYAGISHIMA, M.; FRYE, C.S.; ALBER, S.M.; BOUNOUTAS, G.S.; KADOKAMI, T.; WATKINS, S.C.; MCTIERNAN, C.F.; FELDMAN A. M. - Overexpression of tumor necrosis factor- alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **33**:1331-1344, 2001.
24. LASSAR, A. B.; DAVIS, R. L.; WRIGHT, W. E.; KADESCH, T.; MURRE, C.; VORONOVA, A.; BALTIMORE, D.; WEINTRAUB, H.- Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell.*, **66**:305-315, 1991.
25. LIANG, F.; GARDNER, D.G. - Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.*, **104**:1603-1612, 1999.
26. LIANG, F.; KOVACIC-MILIVOJEVIC, B.; CHEN, S.; CUI, J.; ROEDIGER, F.; INTENGAN, H.; GARDNER, D.G. - Signaling mechanisms underlying strain-dependent brain natriuretic peptide gene transcription. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **79**:640-645, 2001.

27. LORELL, B.H. & CARABELLO, B.A. - Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation.**, **102**:470-479, 2000.
28. LUEKING, A.; HORN, M.; EICKHOFF, H.; BÜSSOW, K.; LELVRACH, H.; WALTAR, G. - Protein microarrays for gene expression and antibody screening. **Anal Biochem.**, **270**(1):103-111, 1999.
29. MANN, D.L. - Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach. **Circulation.**, **100**:999-1008, 1999.
30. MIWA, T. & KEDES, L. - Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin gene. **Mol. Cell Biol.**, **7**:2803-2813, 1987.
31. MOLKENTIN, J.D. & DORN II, G.W. - Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annu Rev Physiol.**, **63**:391-426, 2001.
32. MOLKENTIN, J.D. & MARKHAM, B.E. - An M-CAT binding factor and an RSRF-related A-rich binding factor positively regulate expression of the cardiac myosin heavy chain gene in vivo. **Mol. Cell Biol.**, **14**:5056-5065, 1994.
33. NISHIO, Y.; WARREN, C.E.; BUCZEK-THOMAS, J.A.; RULFS, J.; KOYA, D.; AIELLO, L.P.; FEENER, E.P.; MILLER, T.B. JR; DENNIS, J.W.; KING, G.L. - Identification and characterization of a gene regulating enzymatic glycosylation which is induced by diabetes and hyperglycemia specifically in rat cardiac tissue. **J Clin Invest.**, **96**(4):1759-67, 1995.
34. OKUBO, K.; HORI, N.; MATOBA, R.; NEIJAMA, T.; FUKUSHIMA, A.; KOJIMA, Y.; MATSUBARA, K. - Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nature Genet.**, **2**(3):173-179, 1992.
35. OPEIE, L.H. - Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. Em: **Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine**. Editor: E. Braunwald. 5th Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1997.

36. PARMACEK, M. S. & LEIDEN, J. M. - Structure, function and regulation of troponin C. **Circulation.**, **84**:991-1003, 1991.
37. POMERANTZ, J.L. & BALTIMORE, D. - NF-kB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. **EMBO J.** **18**, 6694-6704, 1999.
38. PURCELL, N.H.; TANG, G.; YU, C.; MERCURIO, F.; DIDONATO, J.A.; ANNING, L. - Activation of NF- kB is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. **Proc Natl. Acad. Sci.**, **78**:6668-6673, 2001.
39. RUWHOF, C. & VAN DER LAASRSE, A. - Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. **Cardiovasc. Res.** **47**:23-37, 2000.
40. SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. - The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu. Rev. Physiol.**, **59**: 551-571, 1997.
41. SANGER, F.S.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. - DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **74**:5463-5467, 1977.
42. SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. - Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. **Science.**, **270**:467-470, 1995.
43. SINGH, K.; SIROKMAN, G.; COMMUNAL, C.; ROBINSON, K.G.; CONRAD, C.H.; BROOKS, W.W.; BING, O.H.; COLUCCI, W.S. - Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. **Hypertension.**, **33**(2):663-70, 1999.
44. SUN, B.; FAN, H.; HONDA, T.; FUJIMAKI, R.; LAFOND-WALKER, A.; MASUI, Y.; LOWENSTEIN, C.J.; BECKER, L.C. - Activation of NF kappa B and expression of ICAM-1 in ischemic-reperfused canine myocardium. **J Mol Cell Cardiol.**, **33**:109-119, 2001.

45. THAI, M.V.; GURUSWAMY, S.; CAO, K.T.; PESSIN, J.E.; OLSON A.L. - Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. **J Biol Chem.**, **273**:14285-14292, 1998.
46. TOJIMA, Y.; FUJIMOTO, A.; DELHASE, M.; CHEN, Y.; HATAKEYAMA, S.; NAKAYAMA, K.; KANEKO, Y.; NIMURA, Y.; MOTOYAMA, N.; IKEDA, K.; KARIN, M.; NAKANISHI, M. - NAK is an Ikappa kinase-activating kinase. **Nature.**, **404**:778-782, 2000.
47. TYAGI, S.C.; KUMAR, S.; VOELKER, D.J.; REDDY, H.K.; JANICKI, J.S.; CURTIS, J.J. - Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. **J Cell Biochem .**, **63**(2):185-98,1996.
48. UTANS, U.; LIANG, P.; WYNER, L.R.; KARNOVSKY, M.J.; RUSSELL, M.E. - Chronic cardiac rejection: identification of five upregulated genes in transplanted hearts by differential mRNA display. **Proc Natl Acad Sci USA.**, **91**(14):6463-7 1994.
49. VALEN, G.; PAULSSON, G.; VAAGE, J. - Induction of inflammatory mediators during reperfusion of the human heart. **Ann Thorac Surg.**, **71**:226-232, 2001.
50. YAMAMOTO, K.; OHKI, R.; LEE, R.T.; IKEDA, U.; SHIMADA, K. - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit cardiac hypertrophy in cardiac myocytes. **Circulation.**, **104**:1670-1675, 2001.
51. YANG, D.; YU, J.; LUO, Z.; CARTHY, C.M.; WILSON, J.E.; LIU, Z.; MCMANUS, B.M. - Viral myocarditis: identification of five differentially expressed genes in coxsackievirus B3-infected mouse heart. **Circ Res.**, **84**(6):704-12,1999.
52. ZHU, Y.Z.; ZHU, Y.C.; STOLL, M.; UNGER, T. - μ Identification of regulated genes in rat heart after myocardial infarction by means of differential mRNA display. **Jpn Heart J .**, **41**(1):59-66, 2000.

