



Busca por genes diferencialmente expressos em resposta à indução de hipertrofia ventricular em rato (*Rattus norvegicus*) através da técnica de microarranjos de DNA

Aluna: Ana Carolina Deckmann

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Ana Carolina</u> <u>Deckmann</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de
mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na
área de Bioquímica.

CAMPINAS – SP

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	711/unicamp
	D357b
V	EX
TOMBO BC/	59131
PROC.	16-111-04
C ☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/07/04
Nº CPD	

CM00200894-5

Bib id: 317751

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D357b **Deckmann, Ana Carolina**
 Busca por genes diferencialmente expressos em resposta à indução de hipertrofia ventricular em rato (*Rattus norvegicus*) através da técnica de microarranjos de DNA / Ana Carolina Deckmann. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Hipertensão. 2. Hipertrofia. 3. DNA. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 16 de março de 2004

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador)

Depto Genética e Evolução – Instituto de Biologia – Unicamp



Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Depto Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp



Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

Depto Fisiologia – Instituto de Biologia – Unicamp

Prof. Dr. José Camilo Novello

Depto Bioquímica – Instituto de Biologia – Unicamp

Dr. Marcos Antônio de Oliveira

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas

**“O erro não é o contrário da verdade, mas o esquecimento da verdade
contrária.”**

(Blaise Pascal)

Para que eu nunca me esqueça disso, enquanto a busca pelo
conhecimento for forte dentro de mim.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sigmar e Carla, pelo amor dedicado,
pela educação ofertada e pela liberdade concedida. Cada um a sua maneira,
permitiram meu crescimento no sentido mais amplo que a palavra possa ter.

Dedico ao Ulisses, meu pequeno tesouro, que surgiu em minha vida tão de
repente quanto dela se apossou. Tão exato em suas doces manobras que me
fez acreditar que sempre estive ali, de alguma maneira, esperando a hora de se
apresentar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e, desde o princípio, acreditado em meu potencial como pesquisadora, mesmo sabendo que na época eu pouco conhecia sobre a área molecular.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, por ter me apresentado sua linha de pesquisa, confiado em mim para conduzir uma parte importante do grande trabalho que seu grupo desenvolve mas, principalmente, por saber ser crítico na dose exata.

Ao Prof. Dr. Fernando José Von Zuben, por ter me indicado o caminho a seguir e acompanhado de perto os rumos que este caminho tomou.

Aos colegas do Laboratório de Genômica e Expressão, em especial aqueles que participaram do meu crescimento profissional, acompanharam minha evolução pessoal e sempre suportaram minhas tempestades emocionais.

À Maricene Sabha, por toda a perseverança, empenho e paciência, qualidades essenciais ao sucesso deste trabalho e de outros que ainda virão. À ela também agradeço todo o apoio e confiança depositados em mim e em meu trabalho.

À Diana Queiroz, por ter prosseguido com parte do meu trabalho no período da licença maternidade, mas acima de tudo, por ter sido companheira de todas as horas ao longo destes 3 anos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

À Raquel Bertolim, pela ajuda no seqüenciamento da biblioteca de cDNA e principalmente, por ser colega, amiga e ombro pra todas as fessas, companheira em todos os copos e coro em todas as risadas.

Aos meninos da Bioinformática, em especial Eduardo Fernandes Formighieri, Marcos Renato Araújo e Marcelo Carazzolle, pelos pequenos e grandes favores prestados, pelo auxílio na organização e análise dos meus dados e, acima de tudo, por terem me recebido como colega no grupo de Bioinfo.

Às colegas Ana Paula Dias Demasi e Carla Cristina Judice Maria, por terem me auxiliado nos primeiros ensaios de *Northern blot* e também pela força durante a gravidez.

À Thaís Holtz Theizen, do Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental (NMCE) da Unicamp, por ter realizado a parte que considero a mais difícil do meu trabalho: as cirurgias e coletas de tecido nos ratos.

À Andréia Assis Souza e Eliane Laranja Dias, pela ajuda nos entraves burocráticos e pedidos de compra, mas acima de tudo, pelo companheirismo comigo e carinho com meu filho.

À Andréia Vigilato e Marina Cruz, secretárias do Departamento de Bioquímica, pelo atendimento sempre gentil e atencioso.

À CAPES e FAEP, pelo apoio financeiro concedido.

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL	2
1.2	CARGA MECÂNICA E ADAPTAÇÃO ESTRUTURAL DO CORAÇÃO	4
1.3	CASCATAS DE MECANOTRANSDUÇÃO ATIVADAS NA HIPERTROFIA CARDÍACA	7
1.4	APLICAÇÃO DOS MICROARRANJOS DE DNA NO ESTUDO DE HIPERTROFIA CARDÍACA	9
2	OBJETIVOS.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	INDUÇÃO DE HIPERTROFIA EM RATOS.....	16
3.2	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	17
3.3	BIBLIOTECA DE cDNA DE CORAÇÃO DE RATO (R. NORVEGICUS)	18
3.3.1	<i>Isolamento dos clones</i>	19
3.3.2	<i>Amplificação dos clones</i>	20
3.4	PRODUÇÃO DOS MICROARRANJOS	21
3.4.1	<i>Delineamento experimental</i>	21
3.4.2	<i>Impressão dos clones</i>	22
3.4.3	<i>Pós-processamento dos microarranjos</i>	23
3.4.4	<i>Marcação das sondas</i>	23
3.4.5	<i>Purificação das sondas</i>	25
3.4.6	<i>Hibridação</i>	26
3.4.7	<i>Lavagem da lâmina</i>	26
3.5	SEQÜENCIAMENTO	27
3.6	CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR NORTHERN BLOT	28
4	RESULTADOS.....	31
4.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS E COLETA DOS TECIDOS	31
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	32
4.3	BIBLIOTECA DE cDNA DE CORAÇÃO DE RATO.....	33
4.3.1	<i>Isolamento dos clones</i>	33
4.3.2	<i>Amplificação dos clones</i>	33
4.4	PRODUÇÃO DOS MICROARRANJOS	34
4.5	PROCESSAMENTO DA IMAGEM	36
4.6	SELEÇÃO DE CLONES E SEQUENCIAMENTO	37
4.7	ESTIMATIVA COMPUTACIONAL DOS VALORES DE EXPRESSÃO GÊNICA	38
4.8	CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO POR NORTHERN BLOT.....	39
4.9	EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO DAS SONDAS	47
4.10	ANÁLISE DAS TRIPLICATAS.....	48
4.11	PRODUÇÃO DE REARRANJOS.....	49
4.12	COMPARAÇÃO DA EXCITAÇÃO DOS FLUORÓFOROS POR <i>SCANNER</i> A LASER E <i>SCANNER</i> A LUZ	52
4.13	ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA DE CLONES NA BIBLIOTECA DE cDNA	55
5	DISCUSSÃO.....	56
5.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROARRANJOS DE DNA	56
5.2	REDUNDÂNCIA DOS CLONES.....	63
5.3	INCOERÊNCIA DE SINAIS.....	64
5.4	GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NO ESTABELECIMENTO DA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA.....	66
6	CONCLUSÕES.....	75
7	PERSPECTIVAS.....	76

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
	APÊNDICE A.....	82
	APÊNDICE B.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Gráficos ilustrativos da importância das doenças cardiovasculares nos EUA e no Brasil.....	3
Figura 2. Gel denaturante de agarose para avaliação da qualidade das amostras de RNA total extraídas do ventrículo esquerdo do coração de ratos coarctados e o controle.....	32
Figura 3. Quantificação por eletroforese dos insertos da biblioteca de cDNA de coração de rato (5' <i>STRETCH PLUS rat heart cDNA Library</i>) (Clontech), amplificados diretamente do material colhido das placas de lise.....	34
Figura 4. Desenho esquemático da disposição dos clones nas lâminas de vidro.....	35
Figura 5. Microarranjos produzidos no presente trabalho.....	36
Figura 6. Comparação do perfil de expressão de genes selecionados por <i>Northern blot</i> e pelos microarranjos.....	40-46
Figura 7. Análise de correlação entre as intensidades observadas para uma mesma população de mRNA marcada por Cy3 e por Cy5, para verificar a eficiência de marcação pelas sondas fluorescentes.....	47
Figura 8. Detalhe de um par de grades equivalentes presentes nos dois microarranjos produzidos com a marcação invertida.....	48
Figura 9. Qualidade e reprodutibilidade dos sinais emitidos pelas triplicatas nos microarranjos, bem como exemplos de <i>background</i> local que podem gerar falsas estimativas pelo algoritmo computacional de análise da imagem.....	49
Figura 10. Grades 12x12.....	50
Figura 11. A. Rearranjo produzido a partir da deposição de 1536 clones distintos em triplicata, totalizando 4608 pontos impressos. B. Expressão de três genes cuja expressão foi confirmada por <i>Northern blot</i>	51
Figura 12. A. Imagem obtida do rearranjo Cx48h pelo <i>scanner</i> a laser. B. Imagem obtida do mesmo rearranjo pelo <i>scanner</i> a luz.....	53
Tabela 1. Valores referentes ao peso médio dos ratos e dos ventrículos esquerdos isolados e congelados em nitrogênio líquido.....	31
Tabela 2. Valores obtidos por espectrofotometria das amostras de RNA total.....	32
Tabela 3. Quantificação da expressão de alguns genes pelos <i>softwares</i> de processamento da imagem específicos de cada <i>scanner</i>	54
Tabela 4. Abundância e representatividade dos 14 genes mais abundantes na biblioteca de cDNA de coração normal de rato adulto (5' <i>STRETCH PLUS rat heart cDNA Library</i>).....	55

ABSTRACT

Myocardial hypertrophy is one of the major responses to hemodynamic overload imposed by arterial hypertension. This elicits several histological and physiological alterations that affect the performance of the cardiac muscle as a whole. However, little is known about the molecular basis of the process, mainly because its multifactorial and polygenic trait. In this study, the DNA microarrays technique was adopted to identify genes directly involved in the establishment of myocardial hypertrophy. The experiments were based on the production of microarrays from 2304 clones of unknown identity derived from a non-normalized rat heart library. The microarrays were hybridized against cDNA targets synthesized after samples collect at short intervals (1, 3, 6, 12 and 48 hours) following hypertrophy induction by aorta constriction in rats (*Rattus norvegicus*). The results had confirmed the great potential of microarray technique for identification of differentially expressed genes in response to arterial hypertension, identifying the genes α -MHC, β -MHC and cardiac α -actin, previously described as involved in the process. More interesting, the gene of synaptopodin-2, protein associated with actin cytoskeleton and involved in stress fiber formation in response to mechanical stimuli in podocytes, and the gene of a precursor protein of amyloid beta A4, which is important because of its interaction with a protein that promotes the aggregation of components of MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) cascade in a functional signaling module, were also identified. However, we concluded that it will be essential to utilize

normalized libraries to reduce the redundancy of the selected genes, increasing the possibility to find novel genes.

RESUMO

A hipertrofia do miocárdio é uma das principais respostas à sobrecarga hemodinâmica imposta ao coração em um quadro de hipertensão arterial, gerando diversas modificações histofisiológicas que afetam o desempenho do músculo cardíaco como um todo. Entretanto, pouco se sabe sobre a base molecular deste processo, uma vez que esta fisiopatologia possui um caráter poligênico e multicausal. O presente estudo utilizou a técnica de microarranjos de DNA para tentar identificar genes diretamente envolvidos no estabelecimento da hipertrofia cardíaca. Os experimentos basearam-se na produção de microarranjos a partir de 2304 fragmentos de DNA de sequência desconhecida, provenientes de uma biblioteca não normalizada de ESTs (*expressed sequence tags*) de coração controle de rato. Esses microarranjos foram hibridados contra amostras de cDNAs sintetizadas a partir do mRNA coletado a intervalos curtos de tempo (1, 3, 6, 12 e 48 horas) após a indução de hipertrofia em ratos (*Rattus norvegicus*). Os resultados demonstraram que a técnica tem grande potencial para a identificação de genes diferencialmente expressos em resposta à hipertensão cardiovascular, tendo sido identificados os genes α -MHC, β -MHC e α -actina cardíaca, previamente descritos como envolvidos neste processo, bem como os genes da sinaptopodina-2, proteína associada à actina e envolvida na formação de fibras de estresse em resposta à estímulo mecânico em podócitos, não descrito anteriormente como expresso neste tecido, e da proteína precursora de amiloide beta A4, importante porque atua sobre uma proteína que promove a agregação de componentes da cascata das MAPKs (*mitogen-*

activated protein kinase) para formar um módulo sinalizatório funcional. Entretanto, observou-se que será essencial usar bibliotecas normalizadas para reduzir a redundância dos genes selecionados e aumentar a possibilidade de encontrar genes novos.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a compreensão de processos biológicos em um nível molecular apresentou avanços significativos, impulsionados principalmente pelas novidades tecnológicas relacionadas ao seqüenciamento de DNA e às pesquisas em genômica. A progressão simultânea de diversos projetos genoma de organismos procariotos e eucariotos permitiu a caracterização gênica em larga escala, baseando-se nos índices de similaridade entre seqüências [1].

No entanto, a informação que pode ser extraída desse procedimento possui limitações no que se refere à caracterização funcional de genes presentes em genomas complexos. A existência de diversas etapas de processamento pós-transcricionais e traducionais determina as características célula-específicas e a similaridade entre seqüências não revela quais mecanismos regulatórios estão envolvidos em sua expressão [2].

Desta forma, tornaram-se necessários estudos que busquem aprofundar o conhecimento em genômica a partir de abordagens enfocando a expressão gênica, preferencialmente a partir de técnicas que permitam visualizar o nível de indução ou repressão dos genes durante condições metabólicas de interesse [3].

Estas técnicas atualmente incluem *Differential Display* de mRNA [4], SAGE (*Sequential Analysis of Gene Expression*) [5], RDA (*Representational Difference Analysis*) [6], RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*) [7] e microarranjos de DNA (*DNA Microarrays*) [8, 9]. Tais estratégias sustentam-se no fato de que, embora a regulação dos padrões de proteínas em uma célula

possam envolver estágios regulatórios traducionais, existe uma relação direta entre diferenciação celular ou respostas fisiológicas da célula com as mudanças na expressão de conjuntos de genes [10].

Assim, o conhecimento sobre expressão gênica global, possibilitado por tecnologias como os microarranjos de DNA, pode fornecer informações essenciais para a compreensão do funcionamento de vias bioquímicas envolvidas com a progressão de diversas patologias complexas, como a hipertensão arterial, e assim permitir a identificação de genes que possam servir como marcadores do processo ou como alvos potenciais para a sua interrupção.

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial constitui-se em uma das principais causas de morbidade e mortalidade em humanos, caracterizando-se por um quadro multifatorial sob controle poligênico [11]. Em linhas gerais, a hipertensão é diagnosticada através do aumento progressivo da pressão sanguínea média ao longo da vida do indivíduo. Isso expõe o coração a uma sobrecarga hemodinâmica que desencadeia uma resposta hipertrófica das células cardíacas. Uma vez que a hipertensão é assintomática, os indivíduos portadores desta patologia normalmente detectam a doença quando a função cardíaca se tornou bastante deteriorada e sintomas decorrentes começam a aparecer [12].

O interesse nesta patologia se justifica principalmente por estimativas recentes sobre as taxas de mortalidade derivadas de anomalias das funções cardiovasculares, que indicam que as doenças cardíacas e coronárias são

responsáveis por cerca de 48% dos óbitos anuais apenas nos Estados Unidos, e este padrão se confirma em praticamente todos os países desenvolvidos e em grande parte dos países em desenvolvimento, como o Brasil (AHA/Organização Mundial da Saúde). A Figura 1 apresenta alguns dados estatísticos sobre esta questão, nos EUA e no Brasil.

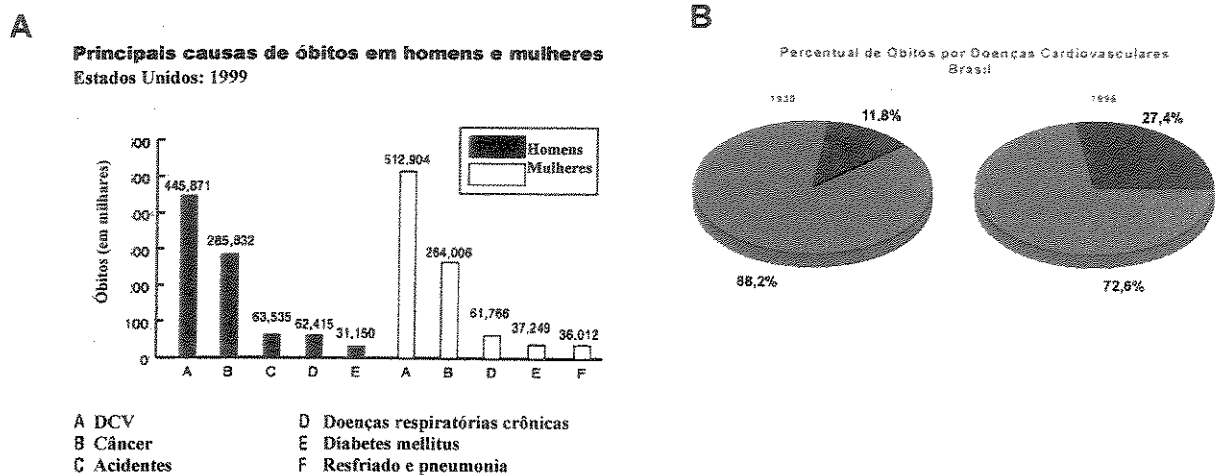


Figura 1. Gráficos ilustrativos da importância das doenças cardiovasculares nos EUA e no Brasil. A. Contribuição relativa das doenças cardiovasculares (DCV) para o total de óbitos de homens (barras escuras) e mulheres (barras brancas) no ano de 1999, nos EUA. B. Porcentual de óbitos decorrentes de doenças cardiovasculares no Brasil, nos anos de 1930 e 1996. Fontes: EUA, American Heart Association. Brasil, Ministério da Saúde.

Estudos têm demonstrado que cerca de 30% a 50% da variação na pressão sanguínea entre indivíduos é ocasionada por fatores genéticos [13], e estes determinantes genéticos interagem com diversos fatores ambientais, como tipo de dieta e carga de estresse cotidiano, para gerar um fenótipo que evidencie as doenças cardiovasculares através de mecanismos ainda não satisfatoriamente caracterizados [14].

Apesar de promissoras, as tentativas de detectar os múltiplos genes que contribuem para as formas poligênicas da hipertensão não têm atingido grandes avanços na elucidação dos programas transcricionais envolvidos com esta fisiopatologia cardiovascular [11]. Muitos laboratórios vêm utilizando linhagens hipertensivas e normotensivas da espécie *Rattus norvegicus* como modelo para investigar as bases moleculares da hipertensão, em estudos que culminaram com a detecção de vários *loci* de caráter quantitativo (QTL - *Quantitative Trait Loci*) responsáveis pela hipertrofia do ventrículo esquerdo, falência renal, infarto e resistência à insulina [11, 14]. Outras estratégias foram desenvolvidas para identificar as síndromes mendelianas raras, em que uma única mutação ocasiona alta pressão sanguínea através da interação recorrente com fatores ambientais e dietários [13]. Uma terceira linha de investigação têm se destacado particularmente nos últimos anos: as estratégias buscando uma análise global da expressão gênica [15].

Estas estratégias têm demonstrado enorme potencial na determinação das bases moleculares envolvidas com as respostas adaptativas do miocárdio à alterações na pressão arterial sistêmica, devendo por isso ser exploradas à luz dos conhecimentos sobre como o coração ajusta seu desempenho de acordo com a carga mecânica a qual está exposto.

1.2 Carga mecânica e adaptação estrutural do coração

Eventos que geram uma sobrecarga hemodinâmica determinam respostas autorreguladoras que permitem ao coração modificar seu

desempenho preservando estrategicamente a homeostase circulatória [16, 17]. Estas respostas dependem da intensidade e duração da condição de sobrecarga: aumentos agudos e breves da carga levam ao aumento da força de contração cardíaca por mecanismos celulares vinculados à disponibilidade de Ca^{+2} para o aparato contrátil responsável pela geração de força pelo músculo. Por outro lado, aumentos fixos e prolongados da carga hemodinâmica determinam alterações significativas nas propriedades contráteis intrínsecas, como por exemplo a afinidade por Ca^{+2} e atividade ATPásica das miofibrilas [17].

Outra consequência da sobrecarga prolongada aos cardiomiócitos é a entrada em um processo de crescimento hipertrófico, notadamente aqueles presentes no ventrículo esquerdo, câmara responsável pelo bombeamento de sangue através do circuito sistêmico [18]. A hipertrofia tende a reduzir a tensão na parede das câmaras através do aumento de sua espessura, conforme indicado pela relação de Laplace ($T = P \times R / 2e$). Ou seja, a tensão T no músculo é igual à pressão P exercida pelo sangue em uma câmara de raio R , e inversamente proporcional à espessura e desta câmara (multiplicada por fator 2). Assim, esta relação indica que a tensão é o próprio ou relaciona-se ao estímulo que sinaliza a necessidade de hipertrofia miocárdica [19]. Quando o aumento na espessura da parede miocárdica é suficiente para normalizar o aumento da pressão intraventricular, seja sistólica ou diastólica, diz-se que a hipertrofia é compensatória [20].

As cargas externas têm papel crítico na determinação da massa muscular e seu fenótipo no músculo cardíaco e em cardiomiócitos em cultura [21, 22]. É possível demonstrar-se experimentalmente que a massa cardíaca não é uma propriedade inata do coração mas, ao contrário, é regulada dinamicamente pela carga à qual o mesmo é submetido. Em experimentos em coração *in situ*, por exemplo, um pequeno segmento de músculo cardíaco não sobrecarregado dentro de um ventrículo sobrecarregado exibe atrofia enquanto o ventrículo como um todo apresenta hipertrofia [23]. Também em segmentos de miocárdio isolado [24] e miócitos em cultura [25, 26] a tensão é um estímulo suficiente para controlar tanto a massa como os processos bioquímicos que gerenciam o crescimento do miócito cardíaco.

Mais recentemente, estudos experimentais demonstraram que a síntese de proteínas em miócitos cardíacos isolados relaciona-se diretamente com a intensidade da carga à qual são submetidos. Procedimentos que induzem a sobrecarga através de coarctação da aorta (redução do diâmetro da artéria pela colocação de grampo de metal) induzem o aumento de 30-50% na população total de proteínas em 48 horas [27]. No entanto, o interesse em quantificar o *turn-over* protéico tem sido sistematicamente substituído pela busca por alterações transcricionais anteriores ao estabelecimento de um quadro hipertrófico, uma vez que esta resposta compensatória progride para um deterioramento da função cardíaca e isto por si só justifica o interesse em identificar alvos anteriores à biossíntese de proteínas sinalizada pelo estímulo fisiopatológico.

Devem ser, portanto, explorados os conhecimentos já acumulados sobre as vias sinalizatórias responsáveis pela mecanotransdução dos sinais gerados na membrana e que culminam com a alteração do padrão de expressão gênica normal.

1.3 Cascatas de mecanotransdução ativadas na hipertrofia cardíaca

As cascatas de mecanotransdução em miocárdio submetido a um quadro de hipertensão são bastante complexas, sendo este o principal motivo pelo qual não foram ainda completamente caracterizadas. No entanto, já foram descritos alguns mecanismos sensores de tensão na membrana celular e que servem como ponto de partida destas vias de sinalização: canais iônicos mecano-sensíveis, complexos de adesão focal e fatores parácrinos/autócrinos [28, 29].

A distorção dos canais iônicos provocada pelo estímulo mecânico deve iniciar eventos elétricos localizados, induzindo a despolarização ou hiperpolarização da membrana citoplasmática [28], fator que pode servir à ativação de enzimas e mobilização de proteínas associadas à membrana.

Já os complexos de adesão focal (FACs – *focal adhesion complexes*) são regiões em que ocorre o acoplamento entre proteínas transmembranas mecano-sensíveis, as integrinas, e a malha tridimensional formada pelo citoesqueleto e as proteínas associadas. Por serem ricos em moléculas sinalizadoras, como FAK (*focal adhesion kinase*), Src (*nonreceptor protein-tyrosine kinase*), Grb2 (*GTPase regulator associated with FAK*) e Grb2-Sos (*guanine nucleotide exchange factor*), entre outras, estes complexos

desempenham um papel central no mecanismo de mecanotransdução em miocárdio [28, 30].

Por fim, a secreção de fatores autócrinos/parácrinos aumenta significativamente sob estímulo mecânico, bem como a permeabilidade da membrana a este tipo de peptídeos. Há evidências de que cardiomiócitos submetidos a estiramento produzem angiotensina II, endotelina-1 e FGF (*fibroblast growth factor*), proteínas fundamentais ao processo de crescimento dos cardiomiócitos induzido por estímulo mecânico [28].

Já no citoplasma, os estímulo sentido pela membrana e pelos componentes sensíveis descritos acima desencadeiam a ativação simultânea de múltiplos segundo mensageiros: PLC, PLD e PLA₂ (*phospholipase C, D e A₂*), IP₃ (*inositol 1,4,5 - triphosphate*), DAG (*diacylglycerol*) e ácido araquidônico, tirosina quinases, p21^{ras}, Raf-1, cascatas de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), JNK (*c-jun N-terminal protein kinase*), PKC (*protein kinase C*) e calcineurina, entre outros [30].

No núcleo, o estímulo induz a expressão dos genes *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* e *c-myc*, conhecidos como *early-responsive genes*, que atuam modificando o padrão de expressão de uma série de outros genes [28, 30]. Estudos recentes demonstram que ocorre uma reprogramação transcricional complexa, em que são re-expressos genes cardíacos fetais envolvidos na regulação das unidades motoras, do metabolismo energético e de componentes de vias hormonais [17, 31]. Entre outros, apresentam-se expressos de acordo com o padrão fetal a isoforma β da cadeia pesada da miosina (β -MHC), os fatores natriuréticos atrial

(ANF) e tipo B (BNP) [32], além de enzimas relacionadas à β -oxidação (cuja expressão é essencialmente reprimida, favorecendo as vias glicolíticas) [33]. Por outro lado, ocorre uma repressão dos genes responsáveis pela alteração da homeostase iônica intracelular como, por exemplo, a Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático 2 (SERCA-2) [34], acompanhada pelo aumento variável na atividade do trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) e dos receptores das vias parassimpática e simpática, como o receptor β_1 -adrenérgico e receptores de angiotensina II tipo 1 (AT_1) e tipo 2 (AT_2) [35].

Assim, por se caracterizar por uma intrincada rede de ativação e mobilização de proteínas sinalizadoras e efectoras, é de se esperar que um grande número de genes sejam simultaneamente ativados ou reprimidos de forma a responder a estes diversos estímulos. Neste contexto, trabalhos recentes têm adotado técnicas de investigação da expressão gênica global justamente em busca das alterações no programa transcricional cardíaco desencadeadas por estímulos hipertensivos e determinantes da hipertrofia do miocárdio [36, 37].

1.4 Aplicação dos microarranjos de DNA no estudo de hipertrofia cardíaca

Simplificadamente, a técnica de microarranjos de DNA consiste na deposição de fragmentos de DNA em lâminas de vidro à altas densidades através de um equipamento automatizado. Paralelamente, duas populações de mRNA obtidas em condições experimentais distintas são submetidas a reações

de transcrição reversa na presença de citosinas ou uracilas contendo diferentes fluorocromos fotossensíveis, Cy3 (emissão de fluorescência verde) e Cy5 (emissão de fluorescência vermelha), de forma a marcar diferencialmente cada população de cDNA gerada. Estas sondas são então misturadas e hibridadas contra as seqüências complementares depositadas na lâmina, permitindo inferir a abundância relativa de transcritos em cada um dos tratamentos realizados [8, 9].

As sondas são excitadas por uma potente fonte de luz e os sinais emitidos são armazenados em canais de imagens distintos para posterior quantificação. Após o processamento das imagens é possível aplicar ferramentas computacionais para extrair informações sobre o padrão de expressão de cada gene sob as condições experimentais amostradas, a partir da razão entre a emissão de fluorescência verde ou vermelha observada em cada posição na lâmina [38].

É importante assinalar que a técnica de microarranjos de DNA pode servir a diferentes tipos de estratégias, dependendo não só das condições experimentais coletadas para gerar as sondas, mas também do tipo de material depositado nas lâminas: bibliotecas de DNA genômico, bibliotecas de cDNA ou ainda oligonucleotídeos sintetizados diretamente na lâmina. Os fragmentos presentes nas bibliotecas podem ter as identidades conhecidas (por exemplo, bibliotecas montadas para sequenciamento) e assim sofrer uma pré-seleção antes da deposição, que constitui o uso tradicional da técnica de microarranjos, ou podem ser desconhecidos e selecionados para sequenciamento apenas

quando demonstrarem um perfil de expressão interessante, e neste caso os microarranjos servem como um método de *screening* das bibliotecas [39].

Diversos estudos aplicaram estas estratégias para identificar os genes expressos no miocárdio e aqueles expressos em resposta ao estabelecimento de cardiopatias. Também foram adotados métodos alternativos para avaliar a expressão gênica global, como hibridação subtrativa [37] e SAGE [40]. Enquanto a estratégia de hibridação subtrativa permite a normalização das bibliotecas através da subtração de genes constitutivos da população final e portanto eliminação de mensagens não-informativas do processo de interesse, a técnica SAGE mantém a exata proporção de transcritos na biblioteca e a quantificação da expressão gênica é feita através do seqüenciamento de fragmentos de aproximadamente 10 nucleotídeos (*tags*): o número de vezes que cada *tag* é seqüenciado está diretamente correlacionado a sua abundância na população [41].

A técnica SAGE foi utilizada por Anisimov e colaboradores [40, 41] para determinar o transcrito de coração normal de camundongo adulto. Os resultados indicaram uma alta prevalência de transcritos referentes aos genes envolvidos na cadeia respiratória e metabolismo energético, como citocromo c oxidase (subunidades I, II, III), NADH desidrogenase (subunidades 2, 4, 3 e 6), ATPase subunidade 6 e citocromo b. Tais resultados foram confirmados pela técnica de Q-PCR (*quantitative polymerase chain reaction*) e comparados com dados obtidos em microarranjos de cDNA contendo 15247 pontos impressos em triplicata e, apesar de haver significativa correlação estatística entre os dados de

SAGE e Q-PCR ($P=0,014$), esta correlação foi baixa entre SAGE e os microarranjos ($P>0,05$). Estes resultados são de grande importância ao presente estudo, servindo como base de referência às análises posteriores [40].

Johnatty e colaboradores [37] buscaram identificar o programa transcricional envolvido na hipertrofia cardíaca em ratos a partir do método de hibridação subtrativa. Neste caso, as amostras foram coletadas em miocárdios hipertrofiados provenientes de dois grupos de ratos adultos e comparadas com amostras do miocárdio de ratos controle. Em um dos grupos experimentais, a hipertrofia foi induzida por carga mecânica, e no outro, pela expressão constitutiva da calcineurina. Os autores identificaram cerca de 50 genes cuja expressão foi induzida no tecido hipertrofiado mecanicamente, nenhum deles tendo sido previamente caracterizado como envolvido nesta cardiomiopatia. Além disso, foi observado que o programa transcricional em miocárdios hipertrofiados através de carga mecânica é essencialmente distinto do conjunto gênico expresso em corações cuja hipertrofia foi induzida bioquimicamente [37].

Weinberg e colaboradores [42] utilizaram a técnica de microarranjos de oligonucleotídeos para investigar as respostas do miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à sobrecarga mecânica por um período de 24 horas e outro grupo por 30 semanas, de forma a comparar os quadros agudo e crônico do estabelecimento da hipertrofia ventricular, respectivamente, bem como comparar as respostas sexo-específicas. Foram investigados 12483 genes distintos, previamente selecionados e cujas sequências codantes foram sintetizadas diretamente nas lâminas pelo fabricante dos microarranjos

(Affymetrix). Os autores identificaram um maior número de genes regulados em resposta ao quadro agudo, e detectaram que existe uma diferença de resposta de acordo com o sexo do indivíduo [42].

Friddle e colaboradores [36] aplicaram microarranjos de DNA para investigar o perfil de expressão gênica durante a indução e regressão de hipertrofia cardíaca em rato. Os arranjos foram gerados a partir de coletas realizadas em intervalos de 24 horas durante 7 dias em animais com hipertrofia induzida pela administração de angiotensina II e isoproterenol, e coletas diárias durante 14 dias do tecido cardíaco após a suspensão do uso destas drogas. Este estudo identificou genes novos e reconheceu genes previamente caracterizados como pertencentes às vias envolvidas no estabelecimento da hipertrofia cardíaca, confirmando a possibilidade de detecção da resposta celular em um nível transcricional. Este estudo permitiu ainda verificar que conjuntos distintos de genes estão envolvidos na indução e regressão da hipertrofia cardíaca, o que pode permitir que sejam adotadas novas estratégias para limitar a hipertrofia e sua progressão à falência cardíaca [36].

Estes resultados evidenciam a eficiência de métodos de geração de dados de expressão gênica diferencial em larga escala para os estudos das bases genéticas da hipertensão arterial. Os trabalhos citados mantiveram o foco em genes diferencialmente expressos em situações-modelo (condição normal, hipertrofia miocárdica induzida por agentes distintos, respostas sexo-específicas, quadro agudo *versus* crônico e regressão da hipertrofia), e o acompanhamento da expressão gênica na progressão destas situações, quando observada, foi

feita a partir de intervalos de tempo relativamente longos (dias ou semanas). Sabe-se que a regulação gênica segue um modelo de cascata e portanto é importante que se busque analisar o comportamento dos genes de natureza transitória expressos logo no início do estímulo, na tentativa de identificar potenciais alvos de prevenção à progressão da hipertrofia miocárdica.

2 OBJETIVOS

O presente estudo concentrou-se em dois objetivos principais:

Padronizar a técnica de microarranjos de DNA para uso a partir de fragmentos de cDNA clonados em fago;

Aplicar os microarranjos para a identificação de genes expressos nas primeiras respostas do miocárdio à sobrecarga mecânica imposta ao coração de ratos (*Rattus norvegicus*) e potencialmente envolvidos na resposta hipertrófica do músculo cardíaco a esta situação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Indução de hipertrofia em ratos

A manutenção e cirurgia dos ratos foram conduzidas pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade de Campinas (Unicamp), sob coordenação do Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini.

Para os primeiros procedimentos cirúrgicos foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (6 semanas de idade), obtidos no Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB).

O procedimento para indução da hipertrofia do miocárdio baseou-se na coarctação da aorta ao nível da crossa e cirurgia fictícia no caso dos animais controle. Resumidamente, ratos anestesiados foram submetidos à colocação de um grampo de prata (diâmetro=500 μ m) na crossa da aorta entre o tronco braquicefálico e a carótida comum esquerda por abordagem através do timo. Sua pressão arterial foi monitorada por meio de catéteres posicionados na aorta ascendente e na aorta abdominal, permitindo assim a avaliação do gradiente de transcoarctação.

Para o procedimento de extração do coração, que se deu nos tempos de 1, 3, 6, 12 e 48 horas após a cirurgia de coarctação, os animais foram novamente anestesiados e o gradiente de transcoarctação avaliado para confirmar a condição hipertensiva. O coração então foi extraído e o ventrículo esquerdo isolado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido para preservar a integridade do tecido e das moléculas transcritas no momento da cirurgia.

Para cada um dos tempos e para a condição controle foram sacrificados 3 indivíduos (N=3) e deste material foi feito um *pool*, de forma a minimizar possíveis efeitos individuais. O material foi armazenado a -80°C para os procedimentos posteriores.

3.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído diretamente dos ventrículos esquerdos isolados através do protocolo baseado em *TRIZOL* (*Invitrogen*), que utiliza por princípio o método de fenol/guanidino isotiocianato. Resumidamente, o tecido foi macerado na presença de nitrogênio líquido, transferido para *eppendorfs* e imediatamente adicionado de *TRIZOL* para garantir degradação mínima das moléculas de RNA. O volume do reagente utilizado deve respeitar a proporção de 1 ml para cada 50-100 mg de tecido. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos para sedimentar o material insolúvel, como restos celulares, proteínas e lipídeos. O sobrenadante foi transferido para novo *eppendorf* e incubado a 30°C por 5 minutos para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas. Em seguida adicionou-se 200 μl de clorofórmio, incubando-se novamente a 30°C por 3 minutos e centrifugando-se por 15 minutos a 12000 g. Após esta etapa, a solução divide-se em duas fases, uma orgânica e uma aquosa, esta última contendo as moléculas de RNA. Transferiu-se esta fase aquosa para novo *eppendorf* e adicionou-se 500 μl de álcool isopropílico para precipitar o RNA. Após incubar o material a 30°C durante 5 minutos, centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos e, ao fim desse passo, pôde ser observado nos

tubos um *pellet* referente ao RNA total precipitado. Descartou-se o sobrenadante e o RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75°. As amostras foram novamente centrifugadas, desta vez a 7500 g durante 5 minutos apenas para sedimentar o RNA, descartando-se em seguida o sobrenadante. Após deixar secar brevemente, o material foi ressuspensionado em água DEPC (dietilpirocarbonato), incubando-se a 50°C por cerca de 10 minutos para garantir a completa dissolução do RNA. O material foi armazenado a -80°C.

O protocolo foi conduzido separadamente para o material extraído em cada intervalo de tempo (1, 3, 6, 12 e 48 horas, mais o controle) e a qualidade do RNA total obtido foi avaliado em gel denaturante de agarose .

3.3 Biblioteca de cDNA de coração de rato (*R. norvegicus*)

O presente trabalho utilizou uma biblioteca de cDNA de coração de rato pré-construída (5' *STRETCH PLUS rat heart cDNA Library*) (Clontech) . Conforme as especificações do produto, a totalidade das mensagens produzidas em um coração normal de rato foram utilizadas para a síntese de moléculas de cDNA que, por sua vez, foram clonadas em bacteriófago lambda.

O tamanho médio dos insertos é de 1.6 kb, variando entre 0.7 kb e 4.0 kb. O isolamento dos clones foi feito através do protocolo fornecido pelo fabricante, descrito a seguir.

3.3.1 Isolamento dos clones

A biblioteca 5' *STRETCH PLUS rat heart cDNA Library* (Clontech) foi montada pelo fabricante no vetor λ gt11, um bacteriófago do tipo exclusivamente lítico. Para o isolamento dos insertos, o protocolo fornecido pelo fabricante prevê a produção de placas de lise através da infecção de linhagens mutantes de *E. coli* (Y1090r) e plaqueamento em meio LB/MgSO₄. O protocolo adotado para a produção de placas de lise foi o seguinte: a linhagem de células para a infecção foi cultivada em placas de cultura simples (LB + ampicilina) e armazenada a 4°C. A partir destas placas, as células foram repicadas e cultivadas em meio líquido especial (LB + 10mM MgSO₄ + maltose 0,2%). O crescimento em maltose induz a produção do receptor λ (proteína lamB), necessário para o importe de maltose. Os íons Mg⁺² auxiliam a adsorção dos fagos na membrana celular das bactérias [38]. O lisado de fago foi, antes da infecção, diluído em tampão de diluição (1M NaCl + 0,1M MgSO₄ + 1M Tris-HCl pH 7,5) de forma a atingir uma concentração final 1:250.000. Em seguida foram preparados tubos contendo 100 μ l do tampão de diluição, 200 μ l do meio de cultura das células (cultivadas a 37°C *overnight* ou até uma OD=2.0) e 10 μ l da diluição de fago. Estes tubos foram incubados a 37°C por 15 minutos para permitir a infecção e em seguida foram adicionados 3 ml de top agarose (LB + 10mM MgSO₄ + 7,2 g/L agarose) a uma temperatura de 45°C. O conteúdo dos tubos foi imediatamente vertido sobre placas de cultura especiais (LB + 10 mM MgSO₄ + 15 g/L agarose) e estas foram incubadas a 37°C *overnight*. É importante ressaltar que a top agarose, que é preparada com metade da concentração normal de agarose, forma uma película sobre a placa

de cultura onde as colônias infectadas podem ser facilmente detectadas e isoladas.

As colônias infectadas foram isoladas e purificadas através do protocolo de preparação de DNA de fago para PCR [43]. Este procedimento exigiu a transferência das colônias infectadas (com a utilização de ponteiros cortadas) para microtubos contendo 50 µl de solução Tris (1 M) + EDTA (0,5 M) + proteinase k (5 mg/ml). Após incubar por 15 minutos a 55°C (temperatura de atuação da proteinase k) e 15 minutos a 80°C (para inativação desta enzima), o material foi centrifugado e o sobrenadante (fase que contém o λ DNA) isolado e armazenado em placas de 96 a -20. Aliquotas de 2 µl foram utilizadas para as reações posteriores de amplificação dos insertos por PCR.

3.3.2 Amplificação dos clones

Foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação dos insertos de cDNA a partir do λ DNA com base em seqüências flanqueadores conhecidas para este vetor (*λgt11 LD-Insert Screening Amplimers*) (*Clontech*). As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados foram as seguintes:

<i>λgt11 LD-Insert Screening Amplimers</i> <i>(Clontech)</i>	Sequência
5' – 3'	5' - GAC TCC TGG AGC CCG - 3'
3' – 5'	3' - CGC GGC CAG TGG - 5'

Foram conduzidas reações de PCR em placas de 96 *wells* segundo o seguinte protocolo: 860 µl água deionizada, 150 µl Tampão de PCR (10x) (*Invitrogen*), 50 µl MgCl₂ (50mM), 150 µl dNTP (1,25 mM), 35 µl oligo *forward* (15pmol/µl), 35 µl oligo *reverse* (15pmol/µl) e 20 µl TAQ polimerase (1U) (*Invitrogen*). Cada *well* recebe 13 µl dessa solução e 2 µl de λDNA, totalizando o volume final de 15 µl.

O termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem)* foi ajustado para realizar o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos e então 40 ciclos [94°C - 30 segundos (desnaturação); 57°C – 45 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos); 72°C – 30 segundos (polimerização)].

As placas contendo os produtos de PCR, bem como as placas contendo λDNA, foram estocadas a -20°C para os passos subseqüentes.

3.4 Produção dos microarranjos

3.4.1 Delineamento experimental

Como a identidade dos clones isolados a partir dos protocolos fornecidos pelo fabricante da biblioteca de cDNA não era conhecida, optamos por selecionar quais seriam seqüenciados somente após a identificação de sua expressão através dos microarranjos de DNA. Assim, os clones depositados foram pré-selecionados com base na verificação de sua concentração e tamanho por eletroforese em gel de agarose. Esta estratégia, que pode ser definida como “*blind array*”, foi adotada por constituir uma alternativa menos

dispendiosa em termos de tempo e custo de seqüenciamento dos clones isolados.

3.4.2 Impressão dos clones

O equipamento utilizado para construção dos microarranjos foi *Flexys[®] Robot* (Perkin Elmer) e, para digitalização, o *scanner GeneTAC[™] Microarray Analyzer* (Perkin Elmer).

O protocolo adotado pelo Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) prevê a utilização de lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina para a impressão dos clones de DNA. As lâminas tratadas com poli-L-lisina possuem uma superfície hidrofóbica e positivamente carregada, características que auxiliam a posicionar e reter as moléculas de DNA no exato local onde foram depositadas [39]. As lâminas tratadas com poli-L-lisina estão sendo correntemente produzidas pelo LGE, segundo o protocolo descrito em http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/1_slides.html

Previamente à impressão dos clones, as placas de 96 *wells* contendo os produtos de PCR foram rearranjadas em placas de 384 *wells*, disposição que atende aos requisitos do equipamento *Flexys[®] Robot* (Perkin Elmer). Para isso, 3 µl do produto de PCR foram adicionados a 3 µl de 3xSSC e a transposição desse material atendeu a um mapa de consolidação que permite correlacionar as posições de cada clone em ambos os tipos de placas. O equipamento realizou a transferência do material das placas 384 *wells* para as lâminas de vidro automaticamente, em ambiente mantido a 20°C e umidade do ar 37%.

3.4.3 Pós-processamento dos microarranjos

Após a impressão das lâminas, os microarranjos passaram por uma etapa de pós-processamento para a fixação definitiva do DNA à superfície da lâmina. O protocolo obedeceu a seguinte ordem: (1) reidratação do DNA (câmara úmida contendo 100 ml de 1xSSC, durante 2 hs); (2) secagem (bloco invertido a 85-90°C, durante 2 hs); (3) fixação (*cross-linking* por UV a 65 mJ); (4) fixação (banho de formalina, durante 1 minuto); (5) lavagem (imersão rápida, 5-10 vezes, em banho de água destilada); (6) secagem (centrifugação a 700 rpm, durante 7 minutos); (7) bloqueio da lâmina (imersão em solução de ácido succínico e ácido bórico durante 30 segundos, seguida por agitação no *shaker* orbital por 25 minutos); (8) desnaturação do DNA (banho em água destilada a 95°C, durante 5 minutos); (9) lavagem (imersão rápida, 5 vezes, em etanol 95%); (10) secagem (centrifugação a 700 rpm, durante 7 minutos); (11) armazenagem dos microarranjos em caixas de lâminas a temperatura ambiente.

3.4.4 Marcação das sondas

Previamente à marcação das sondas, as amostras de RNA total foram quantificadas, de acordo com a fórmula: $[RNA] = A_{260nm} \times 40\mu g/ml \times \text{fator de diluição}$. Assim, buscou-se determinar o volume necessário de cada amostra para atingir a concentração ideal para a síntese das sondas, aproximadamente 50 μg de RNA total.

Optou-se por marcar a população controle com o fluoróforo Cy3 e a população coarctada com Cy5 no decorrer dos experimentos (1h, 3h, 6h, 12h, 48h), além de um microarranjo com a marcação invertida para determinar a eficiência de marcação das sondas pelos fluoróforos. Este microarranjo foi feito com as amostras controle (marcada por Cy5) e 48h (marcada por Cy3), por constituírem as condições extremas amostradas no presente trabalho e portanto passíveis de apresentar os perfis de expressão mais distintos.

O protocolo adotado foi o seguinte (medidas expressas em sua concentração final): (1) seleção dos RNA mensageiros a partir da cauda poli-A (incubar RNA total e oligo dT (0,5 µg/µl) a 70°C, durante 2 minutos); (2) preparo das amostras para a reação de transcrição reversa, adicionando 31,5 µl de uma solução contendo 1x PCR *buffer* (1x), 2,5mM MgCl₂, 10mM DTT, 500µM A/G/CTP + 40 µM TTP; 3,6 µl de Cy3 ou Cy5 e, por fim, 300 U da enzima transcriptase reversa (*Superscript II / GIBCO*) a cada amostra; (3) incubação da reação a temperatura ambiente durante 10 minutos; (4) incubação a 39°C durante 120 minutos, adicionando mais 75 U da enzima na metade deste período; (5) finalização da reação através da desnaturação da enzima (incubada a 70°C, durante 15 minutos); (6) adição de 2U de RNase H para degradar o RNA molde (incubar a 37°C, durante 30 minutos); (7) mistura das amostras em um único tubo (perfazendo 180 µl de solução).

Neste ponto, o material está na forma de cDNA marcado (cada sonda sintetizada foi incorporada com um fluoróforo distinto) e pronto para o próximo

passo: a purificação das sondas para a eliminação do excesso de reagentes e material não incorporado.

3.4.5 Purificação das sondas

As etapas de purificação são conduzidas em 3 tipos distintos de colunas: por exclusão de tamanho, troca iônica e para concentração da amostra.

Antes de ser utilizada, a primeira coluna (*CENTRI-SEP / Princeton Separations*) foi hidratada por no mínimo 30 minutos em água deionizada. Só então as sondas foram adicionadas (cada 180 μ l requerem 3 colunas distintas, pois o volume máximo de cada coluna CENTRI-SEP é de 60 μ l). As colunas foram centrifugadas a 750 g durante 2 minutos, e o material eluído (aproximadamente 60 μ l) foi utilizado na coluna seguinte.

Na coluna de troca iônica (*QIAquick PCR Purification kit / QIAGEN*), ao material obtido no passo anterior foram adicionados 300 μ l de tampão PB (*binding buffer*) (*QIAGEN*) e esta solução foi inserida na coluna, centrifugando-se em seguida a 14000 g durante 1 minuto e descartando-se o filtrado. Em seguida adicionou-se 750 μ l de tampão PE (*wash buffer*) (*QIAGEN*), centrifugou-se por 1 minuto a 14000 g e novamente descartou-se o filtrado. A centrifugação foi repetida (14000 g por 1 minuto) e adiciona-se então 100 μ l de tampão EB (*elution buffer*) (*QIAGEN*). Esta solução foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e após este período, centrifugou-se a 14000 g por 2 minutos. O material eluído (aproximadamente 300 μ l) foi utilizado na última coluna.

A este volume foram adicionados 170 μ l de tampão TE pH 7.4 e esta solução foi aplicada em uma coluna *Microcon YM-30 (AMICON)* para a concentração das amostras purificadas. Centrifugou-se a coluna por 12 minutos a 10000 g e em seguida esta coluna foi transferida invertida para novo *ependorf*. Uma nova centrifugação, desta vez a 3000 g por 3 minutos, recuperou a amostra purificada e concentrada, em um volume final de aproximadamente 15 μ l.

3.4.6 Hibridação

A amostra obtida nas etapas anteriores foi incubada a 95°C por 5 minutos para permitir sua completa desnaturação. Em seguida preparou-se a solução de hibridação, composta pelos seguintes reagentes (medidas expressas em concentração final): sonicação de DNA de esperma de salmão (1 μ g/ μ l), 20x SSC, 10% SDS e o volume total das sondas desnaturadas, completando um volume final de 28 μ l (suficiente para cobrir a área estampada de 24 x 40 mm).

Finalmente, a sonda foi aplicada sobre a lâmina e coberta por uma lamínula para garantir o contato completo entre as sondas e o material depositado. A hibridação prosseguiu a 65°C por um período de 16-17 horas, em um forno de hibridação preservado da luz (para proteção dos fluoróforos).

3.4.7 Lavagem da lâmina

Previamente ao processamento digital dos microarranjos foram necessárias 3 etapas de lavagem da lâmina para eliminar sinais inespecíficos (*background*).

As soluções de lavagem foram, respectivamente, 0,1%SDS + 1xSSC (solução 1), 0,2xSSC (solução 2) e 0,05xSSC (solução 3). Os banhos foram realizados imergindo-se a lâmina em cada uma das soluções a temperatura ambiente e agitando-se levemente por 2 minutos. Após os 3 banhos, a lâmina foi centrifugada a 700 g durante 7 minutos para garantir a secagem completa de sua superfície.

Neste ponto o microarranjo está pronto para ser analisado, podendo alternativamente ser armazenado a 4°C por semanas antes da fase de digitalização. Os microarranjos produzidos no presente trabalho foram imediatamente digitalizados e armazenados em caixa para lâminas a temperatura ambiente.

3.5 Seqüenciamento

Os clones selecionados após a análise dos microarranjos foram seqüenciados utilizando-se o seqüenciador automático *ABI PRISM™ Model 377* (*Perkin Elmer*) (Instituto de Biologia – Departamento de Genética e Evolução, Unicamp). O protocolo adotado para o seqüenciamento foi o seguinte (medidas referentes a uma reação): 2 µl de *ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0* (*Applied Biosystems*), 2 µl tampão (Tris 200mM + MgCl₂ 50mM), 2 µl oligo (*forward* ou *reverse*) (3pmol/µl), 2 µl água deionizada e 2 µl de produto de PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos adotados no protocolo de amplificação dos clones da biblioteca. O termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystem*) foi ajustado para realizar o seguinte programa:

desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos e 35 ciclos [96°C – 45 segundos; 57°C – 45 segundos; 60°C – 4 minutos].

Após a amplificação, conduzida em placas de 96 *wells*, este material foi purificado segundo o seguinte protocolo (medidas referentes a uma reação): (1) precipitação do DNA (adição de 80 µl álcool isopropílico 60% e agitação para homogeneização, deixando em seguida 20 minutos em repouso a 4°C); (2) sedimentação do DNA precipitado (centrifugação a 4000 g durante 45 minutos, na temperatura de 4°C, descartando-se então o sobrenadante); (3) lavagem (adição de 200 µl etanol 65%); (4) sedimentação do DNA (centrifugação a 4000g durante 15 minutos, na temperatura de 4°C, descartando-se novamente o sobrenadante); (5) secagem (centrifugação com a placa invertida sobre papel absorvente a 300 g por 10 segundos). Após secas, as placas foram enviadas para seqüenciamento automático.

As seqüências obtidas foram submetidas aos *softwares* de avaliação de qualidade (*Phred/Phrap/Consed*) e alinhamento local para busca de similaridade com os bancos de dados de nucleotídeos (*blastn*) e proteínas (*blastx*). Com base nas identidades e no perfil de expressão observado nos microarranjos, alguns genes foram selecionados para confirmação de expressão por *Northern blot*.

3.6 Confirmação da expressão gênica por Northern blot

O protocolo adotado para *Northern blot* foi o seguinte: aproximadamente 20 µg de cada uma das amostras de RNA total (controle, 1h, 3h, 6h, 12h e 48h)

foram aplicadas em um gel denaturante de agarose e transferidas para uma membrana de nylon *Hybond-N+* (Amersham Pharmacia Biotech). A membrana foi incubada a 80°C durante 2 horas para a fixação do RNA. Em seguida, foi preparada uma solução de pré-hibridação contendo os seguintes reagentes: DNA sonificado de salmão (10µg/µl) previamente desnaturado (95°C por 10 minutos e gelo por 10 minutos), Denhardt's (100x), SSC 20x, SDS 10%, formamida e água deionizada. O volume final desta solução (25 ml) foi adicionado à garrafa de hibridação contendo a membrana e este conjunto foi então incubado por 6 horas a 40°C em forno de hibridação *Big SHOT Hybridization Oven* (Boeckel Scientifics). A pré-hibridação é necessária para diminuir a reatividade da membrana e assim minimizar sinais inespecíficos (*background*). Após este período, adicionou-se a sonda marcada por α -ATP³², preparada segundo o seguinte protocolo: 5 µl DNA desnaturado (produto de PCR) + 0,5mM dNTP (exceto ATP) + 1µg/µl oligo degenerado (PdN₆) + 10x tampão React 2 + água deionizada + 5U *Klenow* polimerase + α -ATP³², totalizando um volume final de 20 µl. Esta solução foi incubada a 37°C durante 30 minutos para permitir a polimerização da fita marcada de DNA. Em seguida, a sonda foi purificada com a coluna *Microspin Column* (Amersham Biosciences) para eliminar o excesso de nucleotídeos não incorporados e desnaturada (incubar a 95°C por 10 minutos e gelo por 10 minutos). Finalmente, a sonda foi adicionada à garrafa de hibridação e incubada a 42°C durante 16 horas (*overnight*).

Antes da etapa de exposição ao filme fotográfico, a membrana passou por uma fase de lavagem para eliminar a radiação em excesso. Esta lavagem consiste na substituição da solução de hibridação (que foi descartada em local apropriado) por soluções salinas em concentração serial: solução 1 (2xSSC + 0,1%SDS, 10 minutos a 25°C), solução 2 (1xSSC + 0,1%SDS, 15 minutos a 65°C) e solução 3 (0,1xSSC + 0,1%SDS, 15 minutos a 65°C). Após as lavagens, a membrana foi testada para a radioatividade por dosímetro (*Geiger*) para confirmar a eliminação do excesso de radiação então colocada em um cassete com filme fotográfico e mantida 3 dias a -80°C. A fase de revelação foi conduzida em uma câmara escura, consistindo nas etapas de revelação (o filme é imerso e levemente agitado por 3 minutos em solução reveladora), lavagem (30 segundos imerso em água) e fixação (5 minutos imerso e levemente agitado em solução fixadora).

As bandas evidenciadas pelos ensaios de *Northern blot* foram quantificadas pela integração das áreas das bandas definidas densitometricamente através do *software* que gerencia o fotodocumentador ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech), para posterior comparação com os resultados obtidos nos microarranjos de DNA.

4 RESULTADOS

4.1 Grupos experimentais e coleta dos tecidos

Os dados biométricos dos ratos utilizados no presente experimento podem ser consultados na **Tabela 1**. Estes dados foram coletados apenas como forma de controle interno, uma vez que não é possível observar alterações fenotípicas em intervalos de tempo tão curtos.

Tabela 1. Valores referentes ao peso médio dos ratos e dos ventrículos esquerdos isolados e congelados em nitrogênio líquido. Em ambos os casos, N=3 para cada tempo de coleta e o valor expresso é o cálculo da média $\pm$ desvio-padrão. VE=ventrículo esquerdo; CoAc=coarctação da aorta; desvpad=desvio-padrão.

Tempo CoAc	Média Peso animal $\pm$ desvpad	Média Peso VE $\pm$ desvpad
Controle	206 $\pm$ 21,17	0,70 $\pm$ 0,07
1 hora	203 $\pm$ 30,45	0,62 $\pm$ 0,03
3 horas	204,6 $\pm$ 33,25	0,69 $\pm$ 0,14
6 horas	187 $\pm$ 21,66	0,61 $\pm$ 0,10
12 horas	210 $\pm$ 10,00	0,61 $\pm$ 0,06
48 horas	195 $\pm$ 7,37	0,63 $\pm$ 0,01

Não houve perda de material biológico e os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos respeitando-se todas as normas éticas.

4.2 Extração de RNA total

A qualidade das amostras de RNA total obtidas a cada intervalo de tempo foram avaliadas através de gel denaturante de agarose, conforme a **Figura 2**.

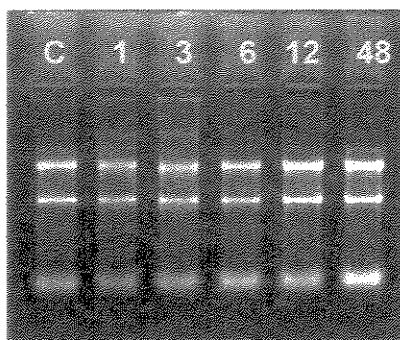


Figura 2. Gel denaturante de agarose para avaliação da qualidade das amostras de RNA total extraídas do ventrículo esquerdo do coração de ratos coarctados e o controle. A numeração utilizada refere-se ao tempo transcorrido a partir da cirurgia de coarctação: controle (C), 1 hora (1), 3 horas (3), 6 horas (6), 12 horas (12) e 48 horas (48).

Previamente à utilização deste RNA total para a produção das sondas dos microarranjos de DNA, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria para determinar a concentração e o grau de pureza. Os valores obtidos podem ser conferidos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores obtidos por espectrofotometria das amostras de RNA total. Os valores referentes à pureza são calculados pela razão A_{260}/A_{280} e devem permanecer em torno de 2,0 para a amostra ser considerada pura. A_{260} =absorbância a 260nm; A_{280} =absorbância a 280nm;

	A_{260}	A_{280}	Concentração	Pureza
Controle	0,070	0,053	2,5	1,32
1 hora	0,070	0,047	2,6	1,48
3 horas	0,065	0,038	2,4	1,71
6 horas	0,080	0,059	3,0	1,35
12 horas	0,093	0,063	3,5	1,47
48 horas	0,094	0,056	3,6	1,67

Estes valores foram utilizados para calcular o volume necessário de cada amostra de RNA total para atingir os 50 µg de RNAm necessários para a síntese das sondas fluorescentes (marcadas por Cy3 ou Cy5) nos procedimentos de produção dos microarranjos. Estas quantificações das amostras foram utilizadas também para a produção das membranas de *Northern blot* dos genes selecionados a partir dos microarranjos.

4.3 Biblioteca de cDNA de coração de rato

4.3.1 Isolamento dos clones

Foram produzidas 6 placas de petri para a individualização dos clones da biblioteca de cDNA de coração de rato (5' *STRETCH PLUS rat heart cDNA Library*) (Clontech). Foram isolados 2304 clones (placas de lise) organizados em 24 placas de 96 *wells*: esta foi a biblioteca de trabalho utilizada em todos os procedimentos conduzidos posteriormente.

4.3.2 Amplificação dos clones

Os insertos foram amplificados por PCR a partir das regiões flanqueadoras conhecidas para o vetor. O produto da amplificação das placas foi avaliado em termos de qualidade e concentração a partir de eletroforese em gel de agarose, conforme a **Figura 3**.

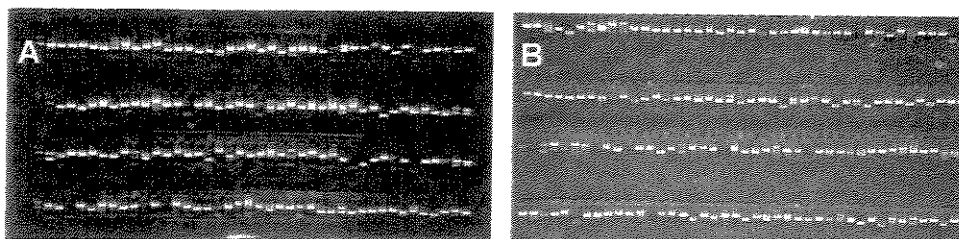


Figura 3. Quantificação por eletroforese dos insertos da biblioteca de cDNA de coração de rato (5' STRETCH PLUS rat heart cDNA Library) (Clontech), amplificados diretamente do material colhido das placas de lise. A. Placas 11 e 17 (96 clones cada). B. Placas 13, 15, 16, 19, 21, 23, 24, 25 (24 clones cada). Foram aplicados 5 μ l de cada amostra.

4.4 Produção dos microarranjos

A produção dos microarranjos foi uma etapa laboriosa, uma vez que foram necessárias diversas adaptações ao protocolo original fornecido pelo fabricante do equipamento (*Flexys[®] Robot* para a deposição dos clones nas lâminas de vidro e o *scanner GeneTAC[™] 1000* para a aquisição das imagens) (*Perkin Elmer*). Várias etapas de testes foram necessárias até que se chegasse a um protocolo eficiente e de baixo custo de execução. Como resultado de tanto esforço, atualmente os microarranjos produzidos pelo Laboratório de Genômica e Expressão (LGE – IB/Unicamp) são inteiramente “feitos em casa”, desde os banhos de poli-L-lisina nas lâminas de vidro até as etapas finais de análise dos dados gerados.

A deposição dos clones nas lâminas de vidro segue um desenho composto por 32 grades, uma vez que o equipamento automatizado trabalha com 32 pinos. A quantidade de pontos em cada grade é opcional e, no caso do presente trabalho, foram desenhadas 32 grades 11x11, totalizando 108 pontos impressos e 13 pontos *blank* (nenhum material depositado) em cada grade. Em termos de

clones distintos depositados, foram 36 em cada grade e 1152 no microarranjo todo. Os clones foram depositados em triplicata e em posições equivalentes para facilitar a inspeção visual. Foram produzidas 10 lâminas a partir deste desenho, que pode ser conferido na **Figura 4**.

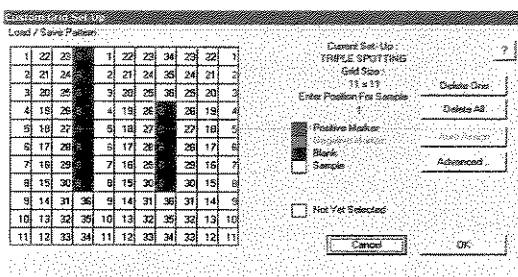


Figura 4. Desenho esquemático da disposição dos clones nas lâminas de vidro. A. Grades 11x11. Numeradas de 1 a 36, as áreas em que foram depositados 36 clones individuais e respectivas réplicas pelo equipamento. Em preto, as áreas *blank*, em que nenhum material foi depositado. Este esquema se refere a uma única grade dentre um total de 32 que compõe a lâmina inteira, todas com este mesmo padrão de impressão. Assim, em cada microarranjo foram depositados 1152 clones distintos em triplicata, totalizando 3456 pontos impressos.

No presente trabalho foram produzidos 5 microarranjos, sendo eles: Controle(Cy3) x 3 horas(Cy5), Controle(Cy3) x 6 horas(Cy5), Controle(Cy3) x 12 horas(Cy5), Controle(Cy3) x 48 horas(Cy5) e Controle(Cy5) x 48h(Cy3) (marcação invertida). O microarranjo referente à condição Controle x 1 hora não foi produzido, uma vez que iniciamos a produção a partir da condição mais extrema (Cx48h), em seguida por Cx12h e assim por diante. Uma vez que não obtivemos diferenças de expressão significativas no microarranjo Cx3h, consideramos que a produção de um experimento comparando diferenças de tempo ainda menores não seria justificável, em função do tempo e custo dispendidos para sua confecção.

A imagem digitalizada de cada um dos microarranjos produzidos pode ser observada na **Figura 5**.

4.5 Processamento da imagem

Os microarranjos produzidos foram digitalizados e as condições marcadas por cada fluoróforo (Cy3 ou Cy5) foram armazenadas em canais de imagem distintos. Este procedimento computacional é fundamental para que os *softwares* de processamento da imagem sejam capazes de quantificar a expressão gênica em função da intensidade do sinal emitido por Cy3 (fluorescência verde) e por Cy5 (fluorescência vermelha). O *software* utilizado para a quantificação dos sinais foi *GeneTAC Biochip Analyzer (Perkin Elmer)*. Abaixo, na **Figura 5**, as imagens obtidas para todos os microarranjos produzidos.

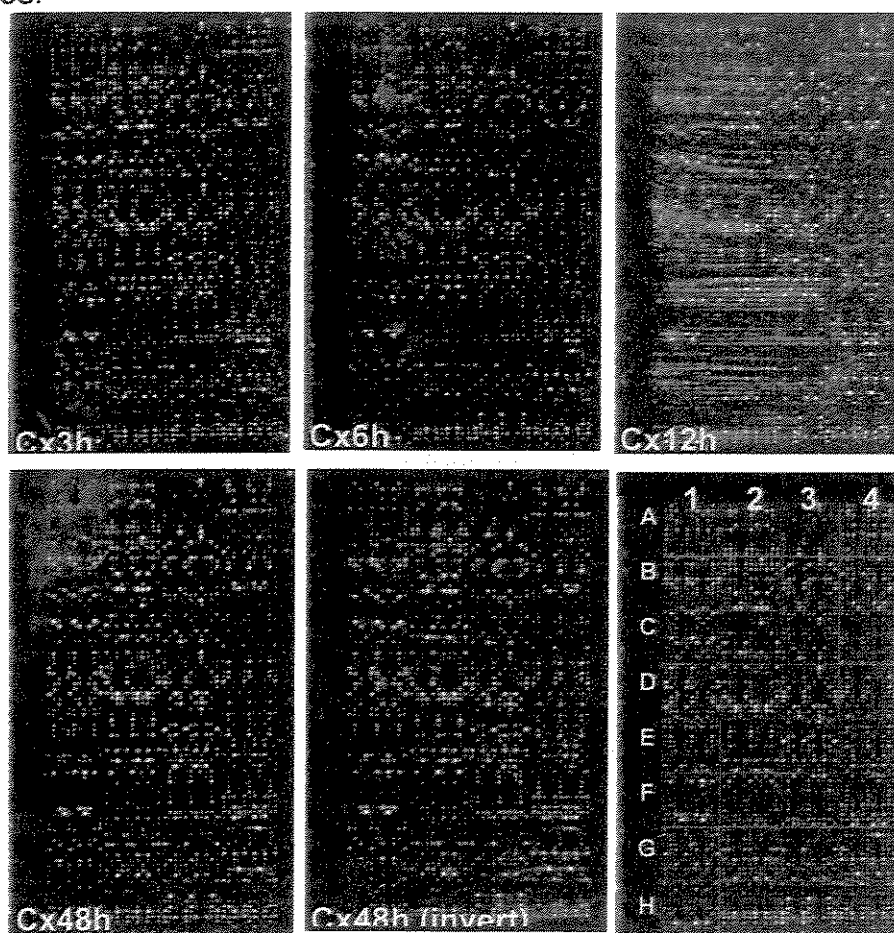


Figura 5. Microarranjos produzidos no presente trabalho. Em todos, a condição controle (C) foi marcada por Cy3 e as experimentais (3h, 6h, 12h e 48h) por Cy5, excetuando-se o microarranjo

identificado por Cx48h (invert), em que a condição controle foi marcada por Cy5 e a experimental por Cy3 (marcação invertida). Na última posição, um microarranjo ilustrando o esquema de endereçamento das grades na lâmina (A1 até H4).

4.6 Seleção de clones e sequenciamento

Uma vez que a biblioteca de cDNA utilizada no presente trabalho não foi normalizada pelo fabricante (Clontech) e as identidades dos clones eram desconhecidas, adotamos a estratégia de uso dos microarranjos para *screening* da biblioteca, ou seja, como forma de selecionar os clones que seriam enviados para sequenciamento. Com este objetivo, selecionamos clones que emitiram sinal detectável por inspeção visual independentemente de sua intensidade. A única condição imposta neste primeiro momento foi que o sinal emitido nas triplicatas fosse coerente ou, em situações em que o *background* local nitidamente interferiu no sinal emitido por uma das triplicatas, foram considerados os sinais em duplicata. Foram selecionados 384 clones, de um total de 1152 investigados (aproximadamente 33,5%).

Estes clones foram enviados para sequenciamento e em seguida submetidos às análises de qualidade das seqüências (*Phred/Phrap/Consed*) e similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados de nucleotídeos (*blastn*) e proteínas (*blastx*). É importante ressaltar que o objetivo do sequenciamento foi o reconhecimento da seqüência, uma vez que o genoma do organismo em estudo já foi feito e está disponível. Assim sendo, de forma similar ao que é feito na metodologia de SAGE, foi considerado que cerca de 20 bp de qualidade eram suficientes para a etiquetagem do gene.

Assim, a consulta por similaridade através de blastN foi conduzida para reconhecer os genes contidos nos fragmentos da biblioteca, identificando também possíveis introduções de contaminações durante a fabricação, isolamento e amplificação dos clones. Somente os clones que apresentaram similaridade alta com sequências de *Rattus norvegicus* foram considerados válidos. Já a consulta de similaridade por blastX buscou identificar os produtos gênicos codificados por tais sequências, através de sua tradução nos 6 quadros de leitura possíveis e comparação com proteínas depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Foram validados 186 clones (16,1% do total de 1152 investigados e 48,4% dos 384 sequenciados), e sua identidade pode ser consultada no **Apêndice A**. Os valores são apresentados com base nos seguintes parâmetros: endereço nos microarranjos, acesso no GeneBank e identidade por blastN e blastX, ambas acompanhadas pelos respectivos valores de qualidade (*e-value*). Aqui é importante notar que os valores de *e-value* são relativamente altos devido aos pequenos trechos considerados nas comparações, mas em todos os casos o primeiro *hit* foi sempre de *R. norvegicus*, o que assegura a sua identidade.

4.7 Estimativa computacional dos valores de expressão gênica

Paralelamente ao sequenciamento, os genes válidos foram investigados quanto ao valor de expressão calculada pelo *software* de processamento de imagem *GeneTAC Biochip Analyzer* (Perkin Elmer). Os dados obtidos para cada ponto na imagem foram calculados como a razão normalizada entre a

intensidade de fluorescência da condição experimental e a intensidade de fluorescência da condição controle. Ou seja, se a população experimental (tempo de coarctação) fosse marcada por Cy5 e a população controle fosse marcada por Cy3, como realmente foi o caso em todos os microarranjos (à exceção do microarranjo Cx48h invertido), então:

$$\text{Razão} = [\text{intensidade (Cy5)} * \text{fator de normalização}] / \text{intensidade (Cy3)},$$
sendo que o fator de normalização é calculado descartando-se os 20% maiores valores absolutos de Log_2 (razão) e calculando-se a mediana dos valores Log_2 (razão) válidos: o anti-log deste resultado é o fator de normalização.

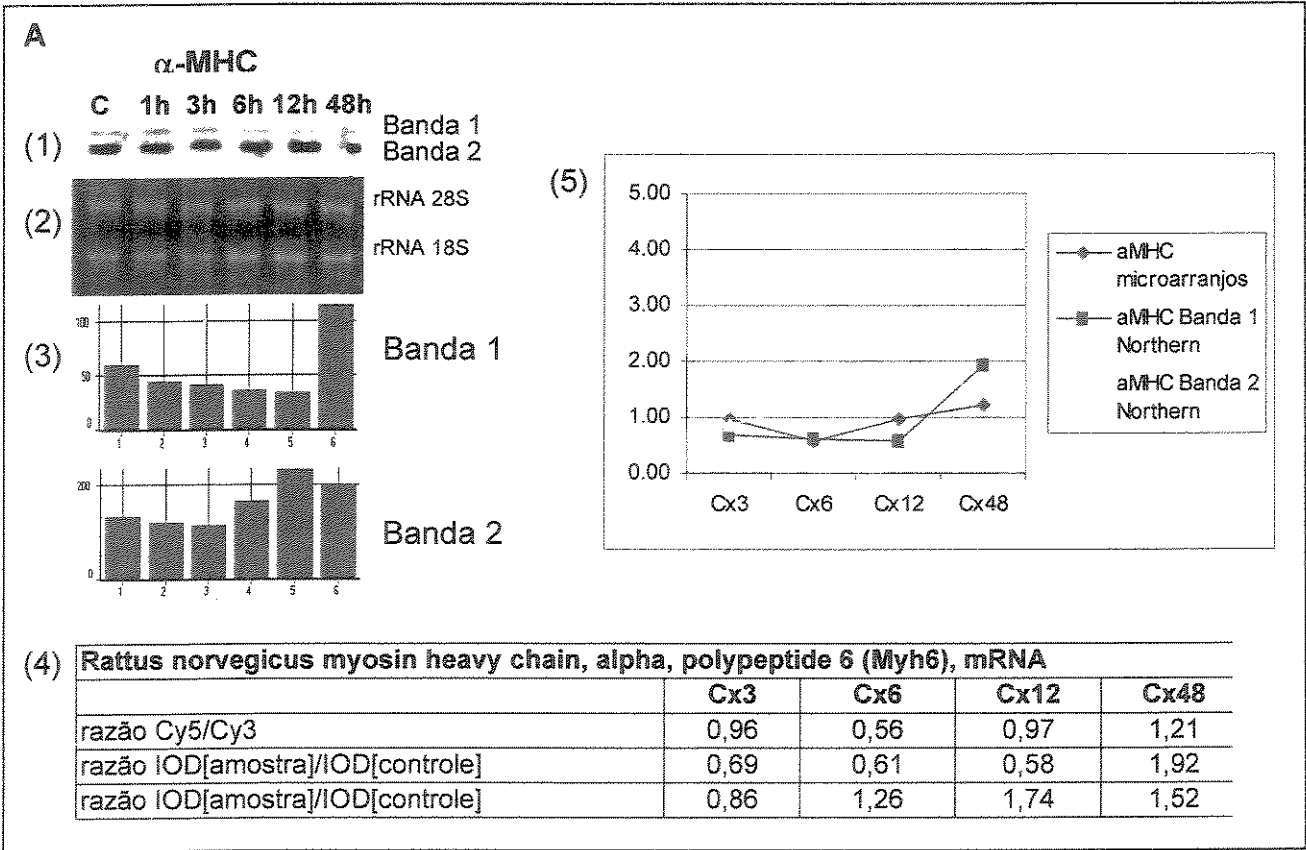
Os valores obtidos nas triplicatas foram analisados calculando-se a média das razões obtidas nos três pontos. Caso um dos pontos estivesse acima de 1 desvio-padrão, era simplesmente eliminado e a média era calculada para os outros dois valores. Caso dois pontos estivessem acima de 1 desvio-padrão, então todos os valores eram desconsiderados, uma vez que as triplicatas foram inconsistentes. Os valores de expressão obtidos para cada um dos 186 clones validados podem ser consultados também no **Apêndice A**. Os valores de expressão apresentados foram calculados de acordo com o especificado acima e se referem ao obtido no microarranjo referente a 3 horas (3h), 6 horas (6h), 12 horas (12h) e 48 horas (48h) pós-coarctação.

4.8 Confirmação da expressão por Northern blot

Alguns genes foram selecionados para confirmação da expressão por *Northern blot* com base no perfil detectado nos microarranjos produzidos. Como

não foram utilizados controles internos para a fabricação dos microarranjos, a expressão obtida por *Northern blot* destes genes foi utilizada para balizar a expressão dos demais genes observados nos microarranjos. Também através de *Northern blot* foram confirmados os perfis de expressão de alguns genes marcadores da hipertrofia ventricular, de forma a comprovar a indução desta condição fisiopatológica pelas cirurgias de coarctação da aorta conduzidas nos ratos utilizados.

A **Figura 6** apresenta os perfis de expressão destes genes obtidos por *Northern blot*, quantificados por densitometria no fotodocumentador *ImageMaster® VDS* (*Pharmacia Biotech*) e comparados com os valores obtidos nos microarranjos.

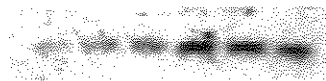


B

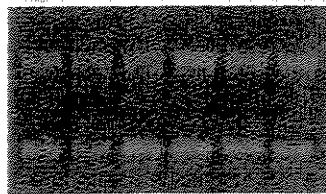
β -MHC

C 1h 3h 6h 12h 48h

(1)



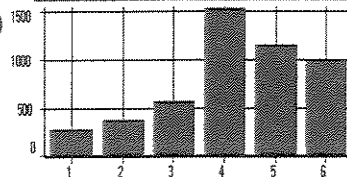
(2)



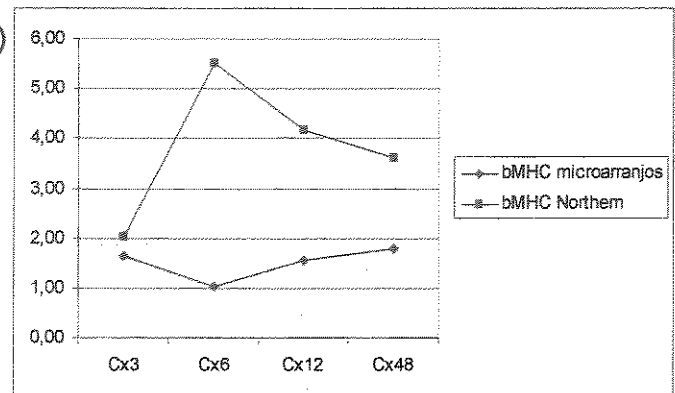
rRNA 28S

rRNA 18S

(3)



(5)



(4)

<i>Rattus norvegicus</i> myosin heavy chain, beta, polypeptide 7 (Myh7), mRNA				
	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,63	1,02	1,55	1,80
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	2,02	5,50	4,16	3,60

C

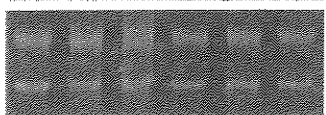
SNPTP-2

C 1h 3h 6h 12h 48h

(1)



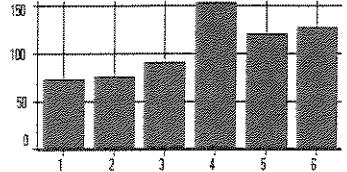
(2)



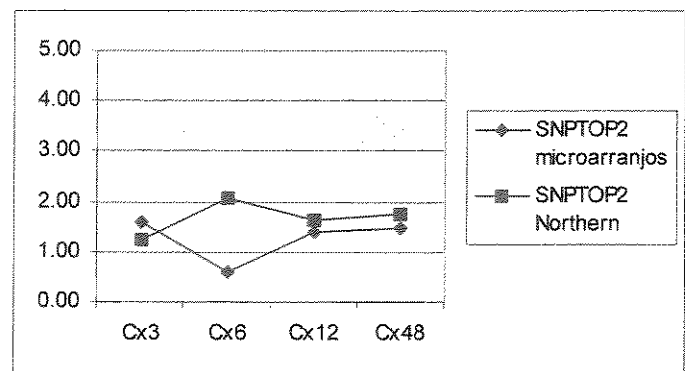
rRNA 28S

rRNA 18S

(3)



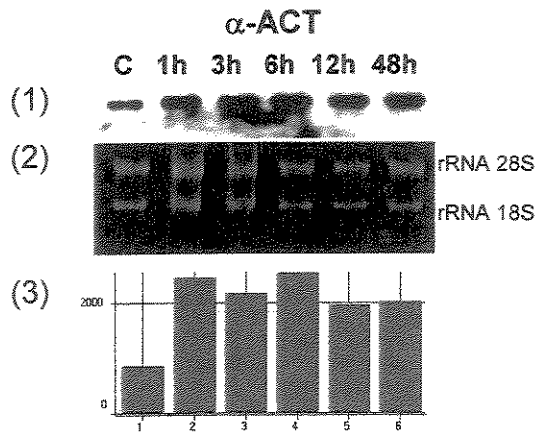
(5)



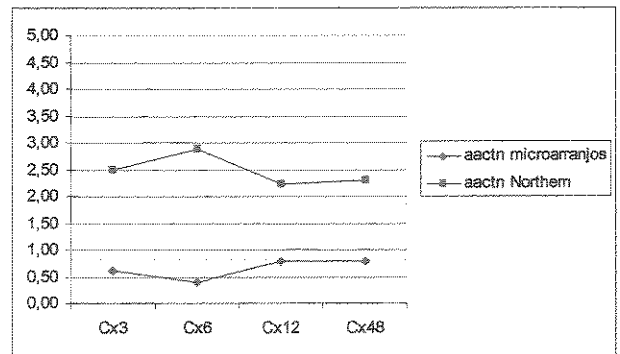
(4)

<i>Rattus norvegicus</i> similar to synaptopodin 2, mRNA				
	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,58	0,61	1,40	1,45
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	1,24	2,08	1,65	1,73

D



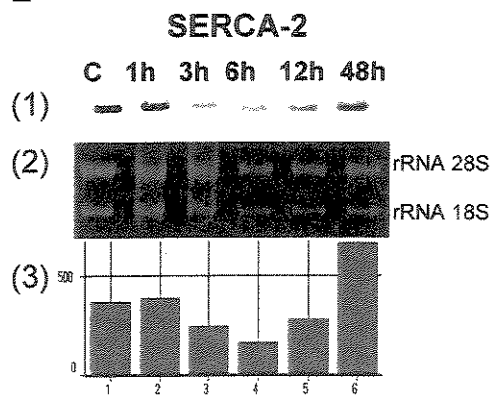
(5)



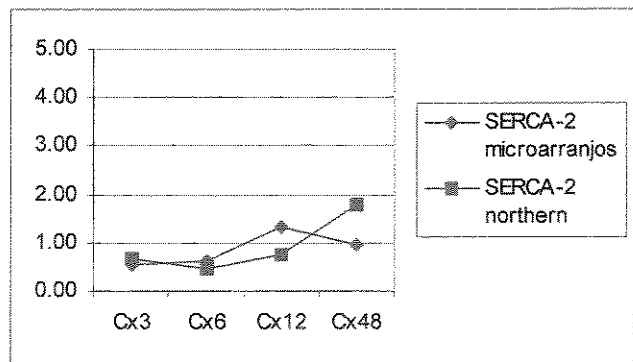
(4) **R.rattus mRNA for alpha-actin cardiac protein**

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	0,61	0,39	0,79	0,79
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	2,48	2,88	2,23	2,30

E



(5)



(4) **Rat Ca²⁺-ATPase mRNA, complete cds**

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	0,53	0,63	1,33	0,94
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	0,67	0,43	0,76	1,79

F

NCX

C 1h 3h 6h 12h 48h

(1)



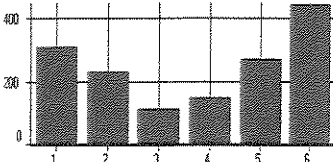
(2)



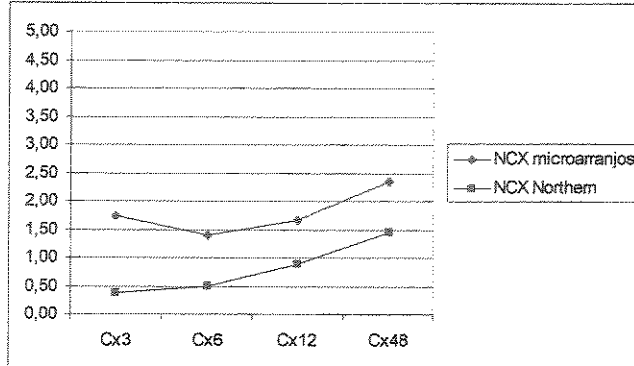
rRNA 28S

rRNA 18S

(3)



(5)



(4)

Rattus norvegicus Na⁺ Ca²⁺ exchanger, mRNA

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,73	1,39	1,67	2,35
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	0,37	0,48	0,88	1,43

G

MRG15

C 1h 3h 6h 12h 48h

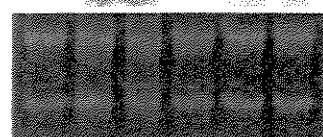
(1)



Banda 1

Banda 2

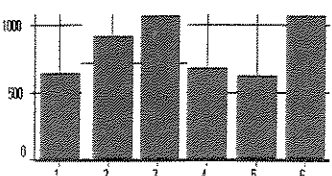
(2)



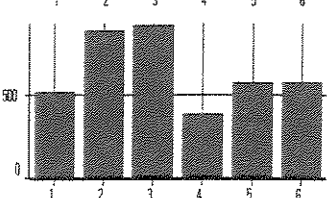
rRNA 28S

rRNA 18S

(3)

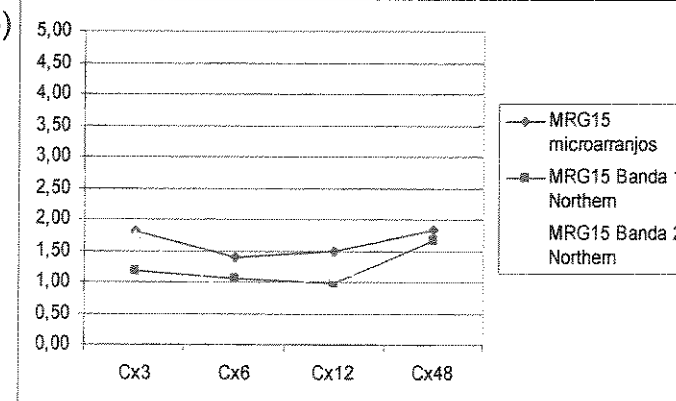


Banda 1



Banda 2

(5)

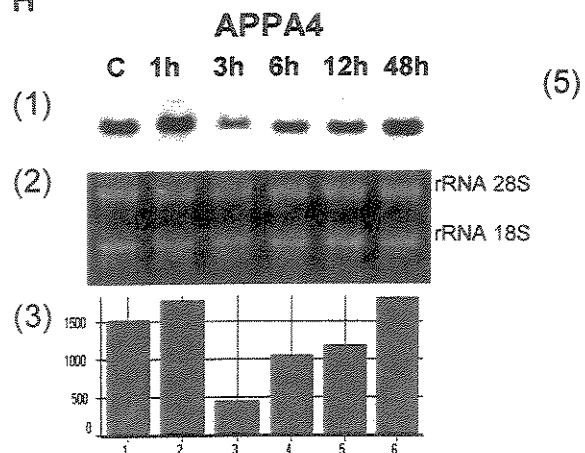


(4)

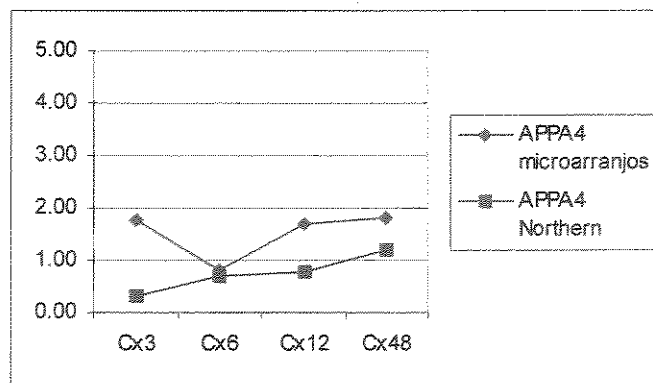
Rattus norvegicus similar to histone acetylase complex subunit MRG15-1, mRNA

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,81	1,39	1,49	1,82
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	1,17	1,06	0,97	1,66
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	1,76	0,75	1,10	1,12

H



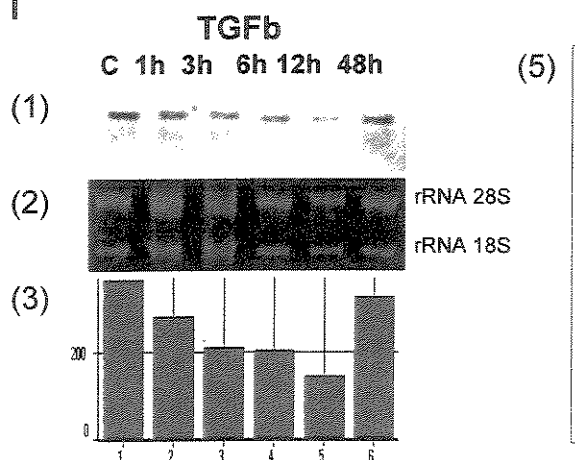
(5)



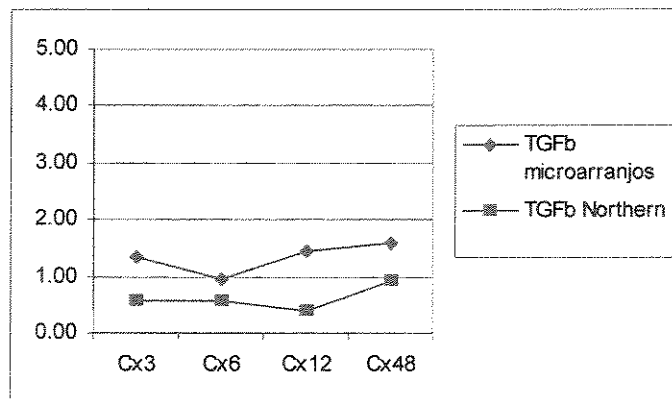
(4) **Rattus norvegicus Amyloid beta (A4) precursor protein (App), mRNA**

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,76	0,81	1,70	1,79
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	0,30	0,69	0,77	1,18

I



(5)

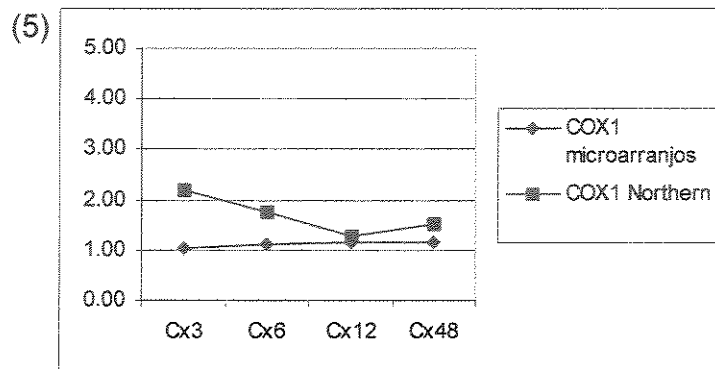
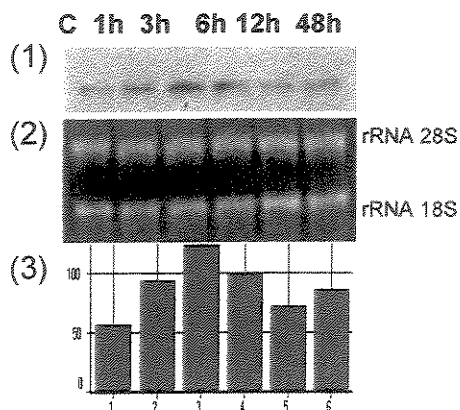


(4) **Rattus norvegicus Transforming growth factor beta , mRNA**

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,35	0,96	1,45	1,60
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	0,58	0,56	0,40	0,90

J

COX1

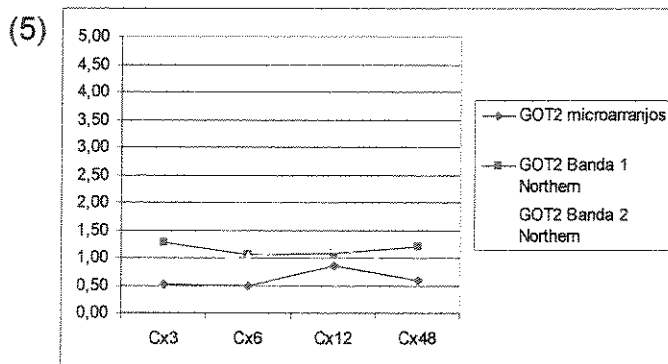
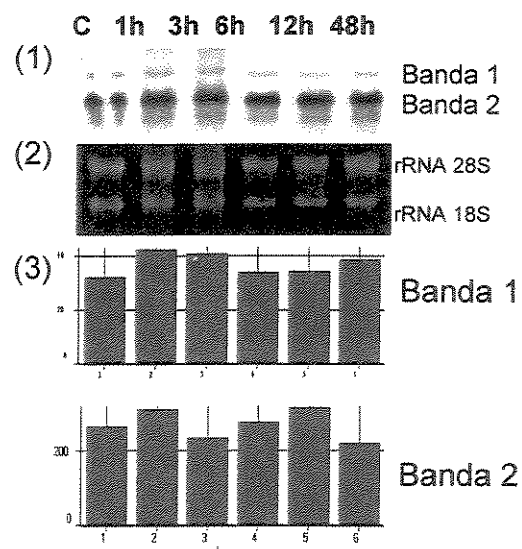


(4) **Rattus norvegicus cytochrome c oxidase I**

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	1,05	1,13	1,15	1,17
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	2,18	1,76	1,28	1,53

K

GOT2



(4) **Rattus norvegicus glutamate oxaloacetate transaminase 2 (Got2), mRNA**

	Cx3	Cx6	Cx12	Cx48
razão Cy5/Cy3	0,52	0,48	0,86	0,58
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	1,28	1,06	1,07	1,20
razão IOD[amostra]/IOD[controle]	0,88	1,04	1,18	0,82

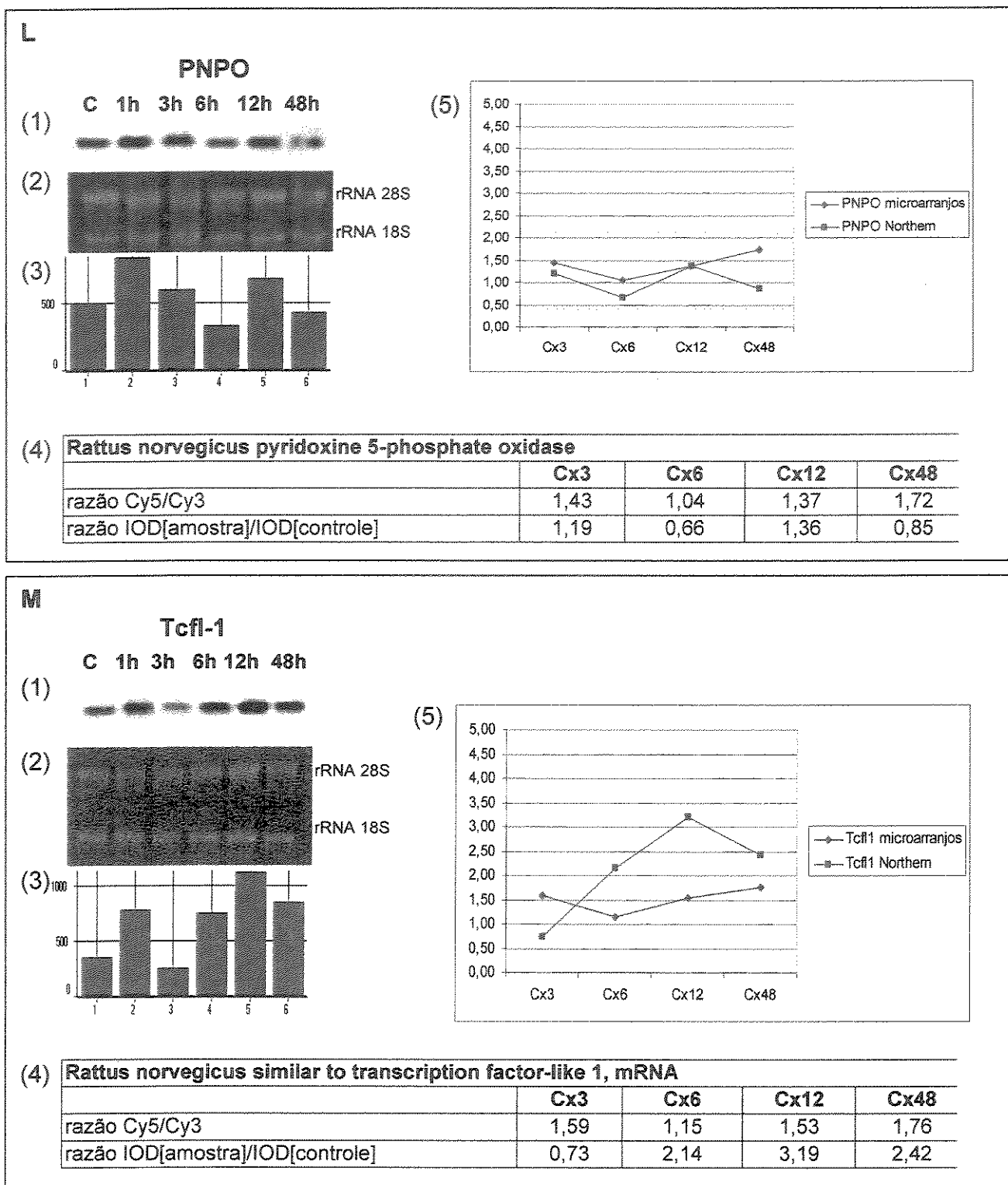


Figura 6. Comparação do perfil de expressão de genes selecionados por *Northern blot* e pelos microarranjos. Dentro dos painéis, (1) apresenta as bandas obtidas no ensaio de *Northern blot* para cada gene; (2) apresenta as bandas de rRNA coradas por brometo de etídeo, usadas como controle interno; (3) apresenta a normalização das bandas apresentadas em (1) pelas

bandas de rRNA de (2); (4) apresenta, na linha identificada pela razão Cy5/Cy3, os valores da razão dos diferentes tratamentos (3, 6, 12 e 48 horas) pelo controle. Na linha identificada pela razão IOD[amostra]/IOD[controle], as razões das intensidades obtidas pelos ensaios de *Northern blot* para cada tratamento contra o controle, conforme apresentado em (3). Note que a comparação de 1 hora contra o controle foi suprimida por não existir esse tratamento entre os microarranjos. (5) gráfico representativo dos dados da tabela (4). A. Cadeia pesada da miosina isoforma alfa (α -MHC, acesso gi56654). B. Cadeia pesada da miosina isoforma beta (β -MHC, acesso gi56656). C. Sinaptopodina-2 (snptop-2, acesso gbXM227662.1). D. α -actina cardíaca (α -act, acesso gi511130). E. Ca^{+2} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2, acesso gi8392934). F. Proteína associada ao trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX, acesso gi11602831). G. *Histone acetylase complex MRG15* (MRG15, acesso XP222925.1). H. Proteína precursora de amiloide beta A4 (APPA4, acesso gi27671158). I. *Transforming growth factor subunit 1* (TGF1, acesso). J. Citocromo c oxidase subunidade 1 (cox-1, acesso gbS79304.1). K. Glutamato oxaloacetato transaminase 2 (GOT2, acesso gi6980971). L. Piridoxal 5-fosfato (PNPO, acesso gi12018269). M. *Transcription factor-like 1* (Tcfl-1, acesso XM227428.1).

4.9 Eficiência de marcação das sondas

A eficiência de marcação das sondas pelos fluoróforos Cy3 e Cy5 é um fator que pode alterar as intensidades dos sinais emitidos e, portanto, alterar o real índice de expressão dos genes em cada condição experimental. Assim, um teste estatístico básico foi aplicado para avaliar este parâmetro: plotar as intensidades dos sinais emitidos por uma mesma população de mensagens marcadas tanto por Cy3 quanto por Cy5, ou seja, comparar os microarranjos feitos com a marcação invertida (**Figura 7**).

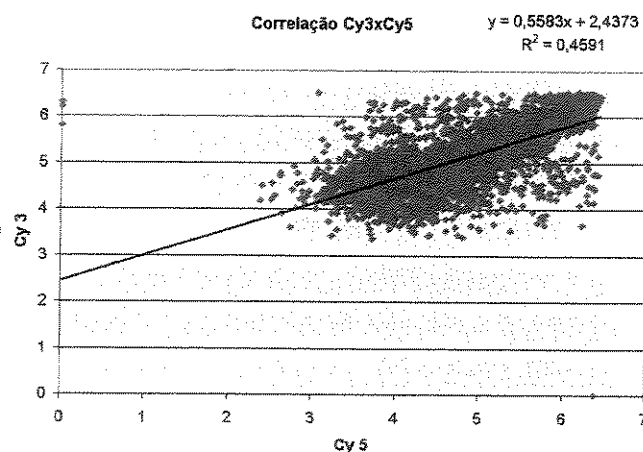


Figura 7. Análise de correlação entre as intensidades observadas para uma mesma população de mRNA marcada por Cy3 e por Cy5, para verificar a eficiência de marcação pelas sondas fluorescentes. No caso, a população testada foi a de 48h pós-coarctação, marcada por Cy5 em

um dos microarranjos (Cx48h) e por Cy3 em outro (Cx48h inv). Os valores foram transformados para log2 para fins de normalização. A dispersão dos pontos em torno da reta de regressão indica o quanto os valores variaram independentemente e, no caso analisado, houve uma dispersão maior do que a esperada, sugerindo que a eficiência de marcação pelas sondas variou significativamente.

Na **Figura 8** pode ser observada a comparação visual da intensidade de fluorescência emitida nos microarranjos com a marcação invertida.

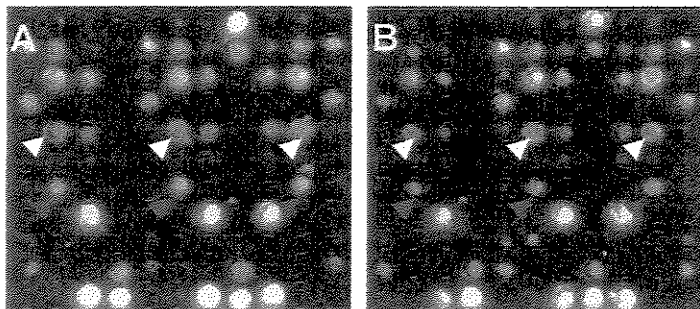


Figura 8. Detalhe de um par de grades equivalentes presentes nos dois microarranjos produzidos com a marcação invertida. A. Grade B2 presente no microarranjo C(Cy3) x 48h(Cy5). B. Grade B2 presente no microarranjo C(Cy5) x 48h(Cy3) (marcação invertida). Os pontos em triplicata destacados pelas setas vermelhas demonstram sinais nitidamente invertidos, sendo que em A há maior contribuição de Cy5 (fluorescência vermelha) e em B, maior contribuição de Cy3 (fluorescência verde). Este resultado está em coerência com o observado no *Northern blot*, já que este gene, β -MHC, tem sua expressão induzida em coração submetido à sobrecarga mecânica e portanto a marcação feita na condição experimental (48hs) deve sobressair-se. No entanto, nesta mesma grade obtivemos alguns sinais incoerentes (apesar de consistentes nas triplicatas), como o apontado pelas setas brancas.

4.10 Análise das triplicatas

Outro passo essencial à estimativa dos níveis de expressão gênica através da razão entre as intensidades relativas observadas em cada ponto na imagem é a análise das triplicatas. A qualidade e reprodutibilidade das triplicatas foi um fator bastante positivo em todos os microarranjos produzidos, introduzindo um alto grau de confiança aos resultados mesmo quando os sinais foram interrompidos por *backgrounds* locais. Estas interferências, que ocorrem devido

a eventuais irregularidades na camada de poli-L-lisina ou poeira depositada sobre a lâmina, são os principais fatores que levam à super- ou subestimativa dos sinais pelos algoritmos de detecção automática. Estes artefatos da técnica são minimizados pela reprodução do experimento em outras posições da lâmina, e é exatamente este o papel das réplicas. A qualidade das triplicatas e exemplos de *background* comuns nos microarranjos produzidos no presente trabalho pode ser conferida na Figura 9.

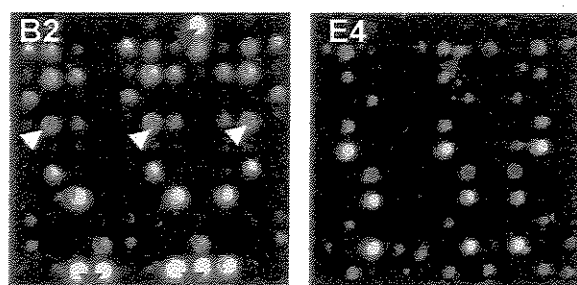
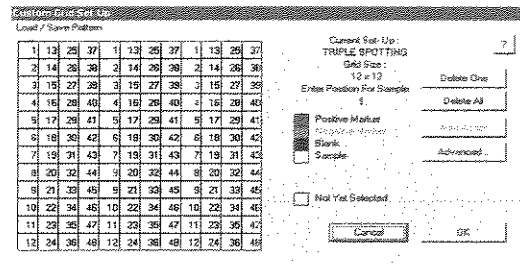


Figura 9. Qualidade e reprodutibilidade dos sinais emitidos pelas triplicatas nos microarranjos, bem como exemplos de *background* local que podem gerar falsas estimativas pelo algoritmo computacional de análise da imagem. As três setas brancas e as três setas azuis presentes na grade B2 apontam as triplicatas de um mesmo clone, respectivamente, atestando a reprodutibilidade dos sinais emitidos pelas réplicas. As setas vermelhas presentes na grade E4 apontam para o sinal emitido por sujeiras depositadas sobre a lâmina e que são identificados como sinais válidos pelo algoritmo computacional de análise da imagem. O clone indicado pelas setas azuis na grade B2 apresenta outro tipo de problema na detecção automática dos sinais: por ser muito expresso, o sinal extravasou os limiares do círculo gerado pelo *software* e foi desconsiderado. Ambos os tipos de erros nas estimativas automáticas geradas pelos *softwares* devem ser manualmente corrigidos após inspeção visual. O microarranjo utilizado para exemplificar os tópicos descritos nesta figura foi Cx3h, mas todos os outros microarranjos apresentaram a mesma qualidade das triplicatas e também o mesmo tipo de *background* local.

4.11 Produção de rearranjos

Na tentativa de ampliar o número de clones investigados e repetir os experimentos com os clones selecionados nos microarranjos anteriores arranjados em uma nova disposição, produzimos 10 novas lâminas. Neste grupo, a disposição dos clones atendeu um novo desenho de grades, de forma a aumentar a densidade de pontos impressos. Cada uma das 32 grades foi

montada a partir de 48 clones distintos em triplicata, totalizando 144 pontos impressos em cada grade e 1536 clones distintos no microarranjo todo. O



desenho esquemático de cada grade pode ser consultado na **Figura 10**.

Figura 10. Grades 12x12. Numeradas de 1 a 48, a posição dos 48 clones distintos e respectivas triplicatas. Nestes microarranjos foram depositados 1536 clones distintos, totalizando 4608 pontos impressos.

Fizemos um experimento utilizando este segundo grupo de microarranjos, referente à condição controle marcada por Cy3 e hibridada com a condição de 48h pós-coarctação marcada por Cy5, cuja imagem pode ser observada na **Figura 11**.

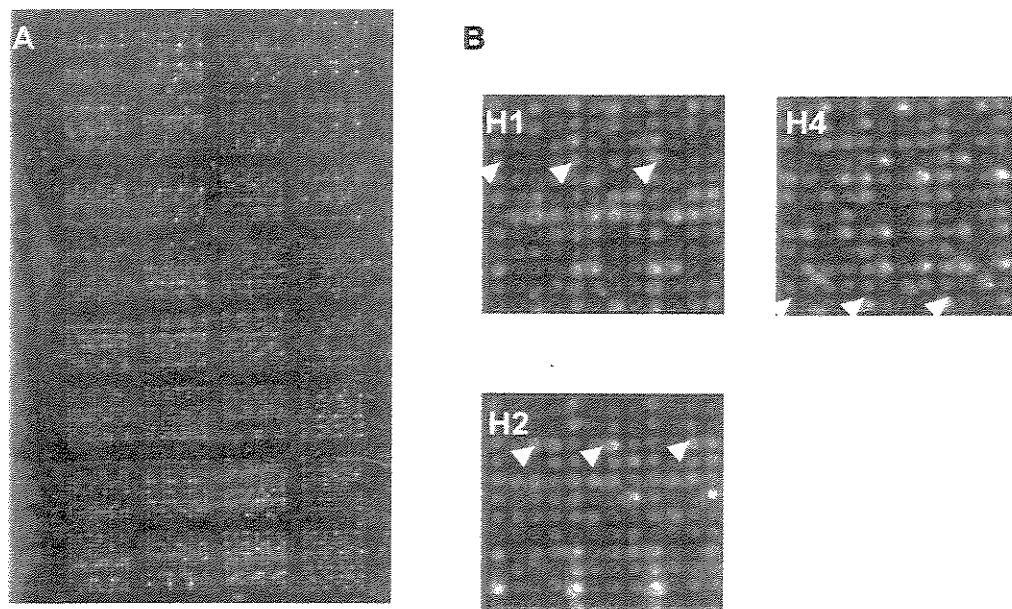


Figura 11. A. Rearranjo produzido a partir da deposição de 1536 clones distintos em triplicata, totalizando 4608 pontos impressos. Neste rearranjo, a condição controle foi marcada por Cy3 e a condição de 48h pós-coarctação foi marcada por Cy5. B. Expressão de três genes cuja

expressão foi confirmada por *Northern blot*. Na grade H1, o gene α -MHC apresentou-se mais expresso na condição controle; na grade H2, o gene *cox-1* apresentou-se mais expresso na condição de 48 horas pós-coarctação; na grade H4, o gene β -MHC também apresentou-se mais expresso na condição de 48 horas pós-coarctação. As triplicatas foram indicadas porque houve perda de sinal em um dos pontos replicados tanto na grade H1 como na grade H4, mas como as outras duas réplicas foram consistentes, então o sinal observado foi considerado válido.

Nossa intenção foi produzir microarranjos referentes a todo o *time course* de progressão de hipertrofia miocárdica também nestas lâminas rearranjadas. No entanto, um segundo microarranjo produzido, C(Cy3) x 12h(Cy5) apresentou alto *background* no canal de Cy5, impedindo qualquer tipo de análise. Antes de nova tentativa, foi conduzido teste de brometo de etídeo em outra lâmina, revelando novamente alto *background* (dados não apresentados). Como o material obtido a partir das primeiras lâminas de *screening* e no rearranjo Cx48h já haviam gerado bons resultados, optamos por não insistir na utilização dos rearranjos nos experimentos posteriores.

A partir deste rearranjo selecionamos 59 clones que apresentaram maior intensidade no canal de Cy5 (48 horas pós-coarctação) e enviamos para sequenciamento. Neste caso não calculamos o percentual sobre o total de clones depositados porque só selecionamos alguns dentre todos os que apresentaram sinal perceptível e consistente. Assim, como no primeiro grupo de microarranjos, só foram considerados válidos os clones que apresentaram alta similaridade com *Rattus norvegicus* após consulta em banco de dados de nucleotídeos através de *blastn*. As identidades e os valores de expressão dos 9 clones válidos podem ser consultados no **Apêndice B**.

4.12 Comparação da excitação dos fluoróforos por *scanner* a laser e *scanner* a luz

Como, de um modo geral, foram obtidos poucos sinais referentes a uma maior expressão no canal de Cy5 (emissão de fluorescência vermelha) nos microarranjos produzidos, independentemente da condição experimental marcada por este fluorocromo, conduzimos um teste de excitação dos fluorocromos por *scanner* a laser, *Scan Array Express Scanner* (Perkin Elmer) em comparação ao que utilizamos correntemente, o *scanner* a luz *GeneTAC™ 1000* (Perkin Elmer). A lâmina referente ao rearranjo Cx48h foi escolhida para esta comparação por apresentar a hibridação entre os pontos mais extremos do *time course*, controle *versus* 48 horas pós-coarctação, e por ser o microarranjo que apresentou os sinais mais nítidos de expressão diferencial. A imagem pode ser conferida na **Figura 12**.

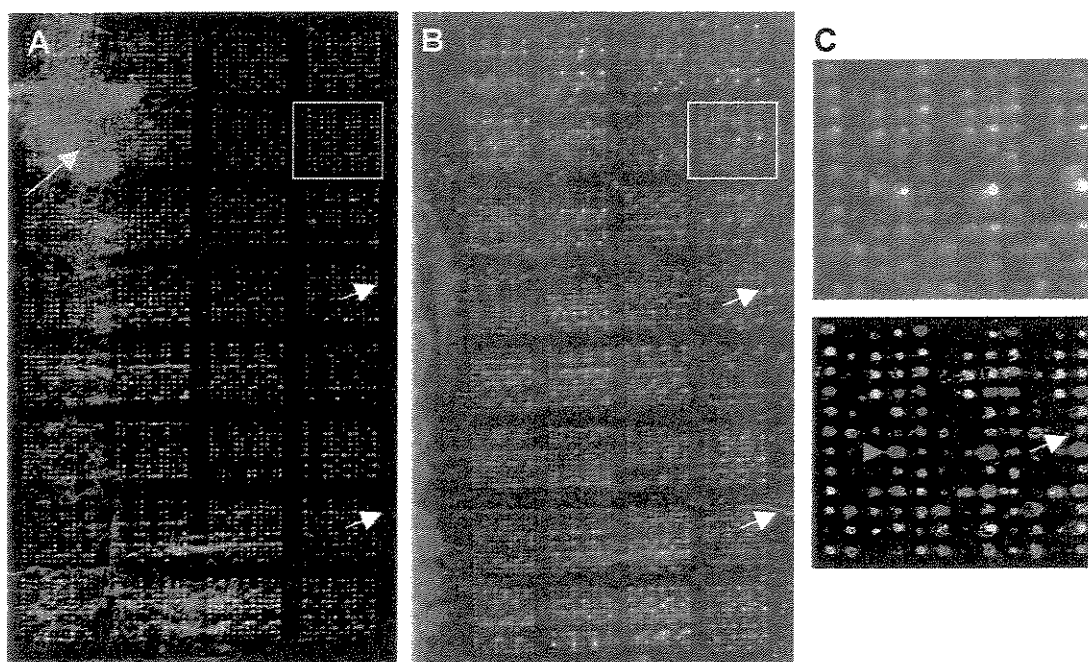


Figura 12. A. Imagem obtida do rearranjo Cx48h pelo *scanner* a laser. B. Imagem obtida do mesmo rearranjo pelo *scanner* a luz. A ocorrência de irregularidades na camada de poli-L-lisina é

evidenciada pelo *scanner* a laser (conforme apontado pela seta amarela), enquanto que *background* provocado por sujeiras depositadas sobre a lâmina, apontadas pelas setas brancas na imagem B, são automaticamente eliminadas. C. Detalhes de duas grades equivalentes (B4) na imagem a luz (acima) e a laser (abaixo), evidenciando a maior eficiência de excitação do fluoróforo Cy5 pelo *scanner* a laser. Apontados pelas setas azuis, um clone que aparenta ser expresso constitutivamente na imagem gerada pelo *scanner* a luz e, através do *scanner* a laser, percebemos estar induzido na condição de 48 horas pós-coarctação. As setas brancas evidenciam a eliminação da imagem de *background* local (sujeira depositada sobre a lâmina).

Também analisamos a coerência entre os valores estimados computacionalmente a partir da excitação por ambos os tipos de *scanner*. Os *softwares* utilizados foram *ScanArray Express Microarray Analysis System* (Perkin Elmer) para o *scanner* a laser e *GeneTAC Biochip Analyzer* (Perkin Elmer) para o *scanner* a luz. Estes valores, que consistem na razão entre as intensidades de fluorescência emitidas pelos fluoróforos, foram comparados para alguns dos genes cuja expressão foi confirmada por *Northern blot*.

Conforme já citado anteriormente, a quantificação dos *Northern blots* foi feita por densitometria através do fotodocumentador *ImageMaster® VDS* (Pharmacia Biotech), de forma que a razão entre as amostras pudesse ser calculada e comparada com os valores obtidos nos microarranjos. Como o microarranjo utilizado para esta comparação foi o rearranjo Cx48, então os valores dos ensaios de *Northern blot* apresentados foram apenas controle e 48 horas. Para cada gene, os valores obtidos em cada uma das triplicatas foram apresentados de maneira a atestar a eficiência da estimativa computacional em função de eventuais *backgrounds* locais. A comparação pode ser consultada na **Tabela 3**, abaixo.

Tabela 3. Quantificação da expressão de alguns genes pelos *softwares* de processamento da imagem específicos de cada *scanner*, no rearranjo Cx48. Os sinais emitidos por cada uma das triplicatas foram quantificados de acordo com a soma da intensidade normalizada dos pixels em cada *spot* no canal de Cy3 e no canal de Cy5 separadamente e, em seguida, calculada a razão entre ambos os valores obtidos. Os valores obtidos através da densitometria dos *Northern blots* também são apresentados e servem como base de comparação, tendo sido apresentados apenas as razões entre as amostras controle e 48 horas pós coarctação. *IOD* = *Integrative Optical Density*. β -MHC, cadeia pesada da miosina isoforma beta. α -act, α -actina cardíaca. cox-1, citocromo c oxidase subunidade. Tcfl-1, *Transcription factor-like 1*. APPA4, proteína precursora de amilóide beta A4. SERCA-2, Ca^{+2} ATPase do retículo sarcoplasmático. NCX, proteína associada ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. SNPTP-2, sinaptopodina-2. PNPO, piridoxal 5-fosfato.

Gene ID	Posição triplicata	Scanner a laser			Scanner a luz			Northern blot		
		Sinal Cy3	Sinal Cy5	Razão Cy5/Cy3	Sinal Cy3	Sinal Cy5	Razão Cy5/Cy3	IOD [controle]	IOD [48h]	razão 48h: controle
β -MHC	H4.i1	373	561	1.78	477568	680392	2.33	275.97	992.24	3.60
	H4.i5	1465	5185	4.05	479840	696544	2.38			
	H4.i9	1258	4914	4.55	477568	680392	2.33			
α -act	A3.h1	893	1753	2.39	171568	184368	1.76	878.21	2019.70	2.30
	A3.h5	1096	2373	2.55	204352	233640	1.87			
	A3.h9	1000	2146	2.65	213600	240704	1.85			
Cox1	B2.j1	373	660	1.77	18160	23512	2.12	55.847	85.24	1.53
	B2.j5	403	652	1.62	48712	67376	2.27			
	B2.j9	379	403	1.06	115520	101264	1.44			
Tcfl-1	E3.a1	497	519	1.04	172400	40560	0.39	348.38	843.98	2.42
	E3.a5	423	451	1.07	321496	75584	0.39			
	E3.a9	533	443	0.83	236896	74920	0.52			
APPA4	D4.j1	313	298	0.95	30800	54864	2.92	1529	1804.7	1.18
	D4.j5	346	325	0.94	33464	98488	4.82			
	D4.j9	301	334	1.11	48416	136880	4.63			
SERCA-2	A1.i1	406	790	1.95	13808	37912	4.5	369.07	662.08	1.79
	A1.i5	427	1258	2.95	35936	42016	1.92			
	A1.i9	395	1140	2.89	23856	41512	2.85			
NCX	F3.b1	381	395	1.04	175008	87424	0.82	309.18	441.81	1.43
	F3.b5	347	303	0.87	371984	202000	0.89			
	F3.b9	318	295	0.93	311984	197536	1.04			
SNPTP-2	A3.b1	376	314	0.84	10016	16800	2.75	72.844	126.06	1.73
	A3.b5	351	289	0.82	19456	24656	2.08			
	A3.b9	363	334	0.92	32616	29216	1.47			
PNPO	B3.i1	331	327	0.99	79168	81880	1.69	498.2	421.42	0.85
	B3.i5	331	316	0.95	50256	49728	1.62			
	B3.i9	299	287	0.96	29488	42688	2.37			

4.13 Análise de redundância de clones na biblioteca de cDNA

Após a produção de dois tipos de microarranjos e sequenciamento dos clones que emitiram sinais consistentes nas triplicatas, buscamos avaliar o índice de redundância da biblioteca de cDNA utilizada. Para isso, agrupamos os 195 clones válidos (186 nos primeiros microarranjos e 9 no rearranjo) segundo a identidade encontrada por blastx, de maneira a nos fornecer um painel da representatividade dos genes mais abundantes. Os 12 genes mais abundantes na biblioteca estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Abundância e representatividade dos genes mais abundantes na biblioteca de cDNA de coração normal de rato adulto (5' *STRETCH PLUS rat heart cDNA Library*) (Clontech). Em (1), a soma da abundância destes 12 genes e o cálculo do porcentual sobre o total de genes válidos (195 genes). Em (2), a soma da abundância dos genes mitocondriais (ressaltados por um asterisco) sobre os genes válidos.

Identidade	Abundância	Representatividade (%)
Citocromo c oxidase I *	50	25,6
NADH desidrogenase 4 *	9	4,6
ATPase subunidade 6 *	8	4,1
Citocromo b *	8	4,1
Citocromo c oxidase III *	7	3,6
NADH desidrogenase 1 *	6	3,0
Citocromo c oxidase II *	4	2,0
α -actina cardíaca	4	2,0
NADH desidrogenase 2 *	3	1,5
ATPase cadeia beta *	3	1,5
Ca ⁺² ATPase do retículo sarcomplasmático	3	1,5
Cadeia pesada da miosina, beta (β -MHC)	3	1,5
(1) TOTAL	108	55,3
(2) TOTAL MITOCONDRIAL	98	50,2

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho devem ser analisados a partir de seus dois objetivos: a padronização da técnica de microarranjos de DNA e o problema biológico em si, ou seja, o perfil transcricional desencadeado em miocárdio submetido à sobrecarga mecânica. Considerando-se ambos, o trabalho buscou usar a técnica de microarranjos de DNA para identificar possíveis genes que pudessem ter a sua expressão diretamente relacionada ao estabelecimento do fenótipo da hipertrofia do miocárdio.

5.1 Padronização da técnica de microarranjos de DNA

A técnica de microarranjos de DNA é uma poderosa ferramenta para estudar o perfil transcricional global de uma célula ou um tecido submetido às mais variadas condições metabólicas. A possibilidade de estudar a expressão relativa de milhares de genes simultaneamente, comparando as respostas desencadeadas por duas condições distintas em um mesmo experimento, é certamente a característica mais importante dessa técnica [3, 10]. Mas, assim como acontece com qualquer estratégia de geração de dados em larga escala, os microarranjos de DNA exigem procedimentos que minimizem a inserção de erros, o que normalmente consegue-se a partir da padronização dos protocolos necessários para sua produção [38, 44]. No entanto, essa padronização exige a realização de testes seqüenciais que, além de dispendiosos e demorados, em grande parte dos casos sustentam-se em estratégias de tentativa e erro.

Devido a esta fase de intensos testes, atualmente temos experiência suficiente para afirmar que os protocolos devem ser ajustados de acordo com uma série de fatores: o organismo estudado, o tipo de biblioteca adotada, o vetor de clonagem utilizado, a técnica de extração e purificação dos insertos clonados, a concentração inicial do produto de PCR a ser depositado nas lâminas e a concentração inicial de RNA total utilizado para a síntese das sondas.

Recentemente foram conduzidos diversos testes para padronizar o protocolo de produção de microarranjos de DNA de leucemia linfóide humana (Diana Queiroz, projeto de mestrado, suporte CNPq), de *Crinipellis perniciosus*, fungo causador da vassoura-de-bruxa (Maricene Sabha, projeto de doutorado, suporte Capes) e de *Eucalyptus* (Maricene Sabha e Julio César Salvadori, projeto *Genolyptus*, suporte Fundo Verde e Amarelo/MCT), pois a metodologia empregada para a produção dos microarranjos de coração de rato usados no presente trabalho não foi eficiente quando aplicada nestes outros organismos.

Não temos ainda uma explicação definitiva para esta diferença de resultados, mas acreditamos se dever ao tipo de vetor utilizado e à forma como o DNA é isolado na biblioteca de rato. O fato de a biblioteca ter sido montada em fago (λ gt11) pelo fabricante (*Clontech*) foi, a princípio, considerado um problema devido à maior complexidade dos procedimentos para o isolamento dos clones. No entanto, o protocolo prevê o tratamento do DNA retirado diretamente das placas de lise por proteinase K, um composto enzimático que rompe preferencialmente complexos protéicos associados ao DNA. Este procedimento, ao purificar o DNA previamente à sua amplificação e deposição nas lâminas,

deve permitir o acesso integral das sondas ao DNA depositado e portanto deve aumentar a qualidade da hibridação. Em decorrência, obtivemos sempre sinais bastante nítidos em qualquer um dos arranjos produzidos.

Em relação a nossa estratégia, utilizamos os microarranjos como uma variação de técnicas como o *Differential Display* de mRNA [4], em que fragmentos gênicos desconhecidos são desafiados contra cDNA sintetizado a partir de mensagens produzidas em células submetidas a condições determinadas. Em nosso caso, o trabalho de investigação de expressão global se baseou em duas etapas. A etapa inicial concentrou-se no isolamento de genes relacionados ao processo de hipertrofia miocárdica a partir de uma biblioteca de cDNA de coração normal de rato (*R. norvegicus*) constituída por clones não identificados. A partir daí, os clones que apresentassem expressão diferencial nos microarranjos de *screening* seriam identificados e rearranjados em novas lâminas para uma investigação detalhada do processo, residindo aí a segunda etapa do trabalho.

No entanto, a biblioteca de cDNA de miocárdio rato apresentou sérias limitações para esses objetivos. Inicialmente, o fato de não estar normalizada possibilitou que um mesmo gene fosse isolado várias vezes em diferentes clones. O segundo problema foi a super representação de genes mitocondriais, provavelmente como consequência do fato de que esses genes têm sua expressão muito forte em tecido muscular. Isto dificultou a detecção de genes novos ou participantes de vias distintas das mobilizadas no metabolismo energético.

Assim, após a produção dos microarranjos para *screening*, em que utilizamos apenas a metade dos clones isolados da biblioteca (1152 clones) (Figura 5) e a partir dos quais selecionamos 384 clones cuja expressão foi consistente nas triplicatas, optamos por produzir um segundo conjunto de microarranjos para *screening*, utilizando para isto a outra metade dos clones isolados das placas de lise e adicionados destes 384 clones como forma de controle interno. Assim, produzimos as lâminas de rearranjo, contendo 1536 clones distintos impressos em triplicata (Figura 11).

Este procedimento, no entanto, foi limitado à produção de um único microarranjo (Cx48h), uma vez que detectamos alta inserção de *background* devido a, provavelmente, irregularidades da camada de poli-L-lisina particularmente a este grupo de lâminas. Não insistimos na utilização deste conjunto de microarranjos devido ao tempo dispendido na padronização dos protocolos e pela quantidade de resultados já obtidos nos microarranjos anteriores.

A necessidade de validar a técnica e os resultados obtidos fez com que prosseguíssemos com análises de eficiência de marcação pelos fluoróforos e de excitação das sondas por fontes de luz distintas (xenônio e *laser*). Para verificar a eficiência da marcação, produzimos um microarranjo com a marcação invertida, ou seja, a condição anteriormente marcada por Cy3 (controle) seria marcada então por Cy5 e vice-versa. Optamos por utilizar as condições mais extremas, controle x 48 horas, para possibilitar sinais mais contrastantes. Já para verificar a eficiência da excitação das sondas, submetemos o mesmo

microarranjo à exposição em dois tipos de *scanners*, um que utiliza fonte de luz xenônio e outro que utiliza laser, para assim capturar ambas as estimativas computacionais e permitir a comparação com os sinais verificados por *Northern blot* que, por constituir-se em um método mais robusto, utilizamos como controle experimental.

Conforme o resultado obtido quando comparamos as populações marcadas com os fluoróforos invertidos, detectamos baixa correlação entre os sinais ($R^2=0,4591$), e isto gerou uma certa desconfiança sobre os dados (Figuras 7 e 8). Neste ponto, a análise das triplicatas foi essencial para descartarmos a possibilidade de que os sinais emitidos fossem mero fruto de hibridação inespecífica e portanto não houvesse nenhuma tendência estatística, já que os valores se mantiveram sempre muito consistentes (Figura 9). Assim, como o experimento de inversão só foi feito uma única vez e a complexidade da técnica a torna passível de uma grande quantidade de erros, descartamos a contribuição dessa lâmina para a análise geral dos dados. Não conseguimos ainda detectar o porquê dessa baixa correlação entre as marcações invertidas e isto está sendo investigado nos outros trabalhos em andamento utilizando a técnica de microarranjos de DNA.

Já a comparação feita entre os *scanners* a laser *Scan Array Express Scanner* (Perkin Elmer) e a luz *GeneTAC™ 1000* (Perkin Elmer) revelou uma maior habilidade do *scanner* a laser em resolver problemas relativos ao *background* e, conseqüentemente, em estimar computacionalmente valores de

expressão compatíveis com os sinais quantificados através da densitometria dos ensaios de *Northern blot*.

Conforme observado na Tabela 3, os sinais emitidos por Cy3 e por Cy5 nas triplicatas dos genes selecionados mantiveram-se mais altos na estimativa feita pelo *scanner* a luz e, inversamente, a razão entre os sinais (Cy5: Cy3) permaneceu mais baixa. Isto deve ser um reflexo da contribuição final do *background* ao sinal emitido, gerando sinais mais fortes em ambos os canais e, por constituir-se em um acréscimo inespecífico (que ocorre em ambos os canais), acaba por gerar razões menores. Acreditamos que isto deve ocorrer porque o *software* de processamento de imagem *GeneTAC Biochip Analyzer* (*Perkin Elmer*) é pouco flexível na delimitação entre a borda do *spot* (ponto impresso) e a área adjacente (*background* local). O programa de processamento do *scanner* a laser ajusta automaticamente o diâmetro do *spot* à região em que efetivamente há emissão de sinal e portanto aproxima-se da realidade local para cada ponto impresso.

Passando à quantificação dos sinais emitidos por Cy3 e Cy5 pelo *scanner* a laser e pelo *scanner* a luz em comparação à densitometria dos *Northern blots*, tivemos que, dos nove genes avaliados, quatro genes (α -actn, cox1, APPA4 e PNPO) apresentaram razões semelhantes no *scanner* a laser e no *Northern blot*, um gene (NCX) apresentou maior semelhança entre as razões obtidas por ambos os *scanners* do que com a razão obtida pela densitometria do *Northern blot* e quatro genes (β -MHC, Tcfl-1, SERCA-2 e SNPT-2) apresentaram valores distintos em todas as três fontes de quantificação da expressão. No caso da β -

MHC e de SERCA-2, ocorre uma mesma tendência entre os valores apresentados por todas as fontes de quantificação (sugerindo indução da expressão as 48 horas pós-coarctação em relação ao controle), apesar da amplitude desta indução variar consideravelmente entre as quantificações apresentadas. Já no caso de SNPT-2, a tendência só é comum às estimativas do *scanner* a luz e da densitometria dos *Northern*s (indução da expressão em ambos os casos), sendo que na estimativa do *scanner* a laser ocorre tendência inversa em todas as triplicatas (repressão da expressão). No caso de Tcfl-1, ocorre 3 perfis distintos em cada uma das três quantificações: expressão constitutiva segundo o *scanner* a laser, repressão segundo o *scanner* a luz e indução segundo a densitometria.

Assim, apesar do *scanner* a laser aparentar maior habilidade em quantificar a expressão gênica a partir da razão entre os sinais emitidos pelas sondas em função de um *background* local, acreditamos que qualquer tipo de quantificação computacional deve ser avaliada com cautela e sempre acompanhada por inspeção visual minuciosa, considerando-se a natureza molecular da transcrição gênica. A variação é inerente ao processo biológico e as quantificações possuem essa limitação, apresentando portanto apenas um quadro aproximado do fenômeno transcricional.

Após os testes feitos para validar os procedimentos adotados para a produção dos microarranjos, ainda persistiam dois pontos problemáticos: a redundância de clones, no caso componentes mitocondriais, e a disparidade de

alguns sinais emitidos por clones identificados como seqüências de um mesmo gene, como *cox1*.

5.2 Redundância dos clones

Em se tratando de um tecido muscular submetido a ciclos de contração e relaxamento ininterruptos, é bastante razoável encontrarmos uma prevalência de clones referentes ao metabolismo energético mitocondrial (50,2%). No entanto, não esperávamos encontrar um número tão discrepante entre os transcritos de *cox1* (25,6%) e os outros transcritos mitocondriais (24,6%). Tampouco que os produtos mitocondriais fossem tão mais abundantes que componentes sarcoméricos, como genes que codificam para proteínas contráteis (4,6%) e ciclo do cálcio (2,0%) (Tabela 5).

No entanto, este resultado está em conformidade com os resultados obtidos por Anisimov e colaboradores, que adotaram a estratégia SAGE para investigar o transcrito em coração normal de camundongos adultos [40]. Neste trabalho, transcritos mitocondriais contribuíram com 18,7% do total de 88860 transcritos investigados, sendo que os quatro transcritos mais abundantes foram *cox1* (8,4%), *cox2* (1,9%), *cox3* (2,1%) e NADH desidrogenase subunidade 2 (1,3%).

Poderíamos questionar então a significativa diferença entre a abundância de *cox1* obtida pelos autores (8,4%) e em nosso trabalho (25,6%). No entanto, investigamos uma população de transcritos muito menor (4608 transcritos totais, sendo que apenas 195 foram considerados válidos e utilizados para as análises

de abundância) e esta redução no grupo amostrado é estatisticamente capaz de aumentar a contribuição relativa dos transcritos mais abundantes.

Este argumento é confirmado por um trabalho anterior dos mesmos autores [41], em que propunham o uso da técnica SAGE para avaliar o transcrito cardíaco e, para ilustrar o uso da técnica, investigaram apenas 505 transcritos. Dentre estes, *cox1* contribuiu com 21% do total e dez outros transcritos apresentaram abundância de 1 a 4,2%: NADH desidrogenase subunidades 2, 4 e 6, *cox2*, *cox3* e citocromo b [41].

Desta forma, tivemos um indício forte de que nossa biblioteca de trabalho está em conformidade com o que é esperado de uma biblioteca de cDNA de coração normal de rato adulto, não-normalizada, dissipando nossas dúvidas sobre a possibilidade de contaminação durante sua produção ou isolamento dos clones. No entanto, esta análise só vem a confirmar a inadequação deste tipo de biblioteca para um dos objetivos do nosso trabalho, a identificação de genes novos envolvidos no estabelecimento da hipertrofia do miocárdio induzida por estímulo mecânico.

5.3 Incoerência de sinais

O segundo ponto problemático que encontramos foi a incoerência entre os sinais emitidos por clones identificados como sendo o mesmo gene, notadamente o gene *cox1*. O fato das triplicatas apresentarem sinais consistentes na maioria dos casos tornava improvável a ocorrência de artefatos como hibridação inespecífica.

Também neste caso encontramos respaldo no trabalho de Anisimov e colegas [40] uma vez que, além da investigação do transcritoma por SAGE, os autores produziram arranjos de cDNA (em membranas de *nylon*) a partir de clones em triplicata hibridados com a biblioteca de SAGE, de forma a permitir uma análise comparativa entre ambos os resultados. Interessantemente, os arranjos de cDNA revelaram que clones redundantes frequentemente apresentavam sinais díspares, como foi o caso de *cox3*, NADH desidrogenase subunidade 4 e citocromo b. Segundo os autores, a qualidade da hibridação pode variar em função do tamanho e da região do gene a que o clone corresponde e, portanto, a intensidade do sinal pode diferir entre clones representando um mesmo gene [40].

Assim, os trabalhos citados acima foram particularmente importantes nas análises dos nossos resultados uma vez que, por termos padronizado os protocolos de produção dos microarranjos anteriormente à produção dos experimentos, bem como ter sido inédita a experiência de trabalhar com uma biblioteca clonada em fago, consideramos que ambos os problemas (redundância e incoerência) possivelmente se devessem a falhas em alguma etapa dos procedimentos. A comparação entre nossos resultados e os do grupo de Anisimov, no entanto, validaram tanto nossa biblioteca quanto nossos protocolos para fabricação dos microarranjos.

Também a quantificação por *Northern blot* apresentou, em muitos casos, nítida incoerência entre o que pôde ser percebido pela inspeção visual e o que o densitômetro efetivamente acusou. Foi o objetivo deste trabalho automatizar ao

máximo essas análises, tentando quantificar todos os resultados com os equipamentos e metodologias padrão, mesmo quando os dados obtidos não pareciam satisfatórios. Por esta razão, foram apresentadas todas as figuras dos experimentos, para que a inspeção visual também possa ser feita.

Em seguida, passamos à análise dos genes envolvidos na geração de força pelo músculo cardíaco, no ciclo de cálcio e genes potencialmente relacionados com as respostas imediatas dos cardiomiócitos à sobrecarga pressória.

5.4 Genes potencialmente envolvidos no estabelecimento da hipertrofia miocárdica

Como o presente trabalho priorizou a investigação por genes expressos em intervalos curtos de tempo, ou seja, horas após o início do estímulo hipertrófico desencadeado por sobrecarga mecânica, já esperávamos obter alterações pontuais na expressão gênica global. Assim, inicialmente buscamos confirmar por *Northern blot* a expressão de genes cuja expressão já foi bem caracterizada por outros estudos em um quadro agudo de sobrecarga mecânica imposta ao miocárdio, de forma a confirmar que os procedimentos cirúrgicos adotados no presente trabalho realmente foram eficientes em estabelecer esta condição experimental.

Dentre estes genes, confirmamos a expressão daqueles que codificam para componentes do aparato contrátil: as duas isoformas da cadeia pesada da miosina, α -MHC e β -MHC, e a principal isoforma de actina presente no miocárdio, a α -actina cardíaca. Também buscamos confirmar a expressão de

dois componentes do ciclo de cálcio, a Ca^{+2} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2) e de uma proteína associada ao trocador $\text{Na}^{+} \text{Ca}^{+2}$ (NCX).

Confirmamos ainda a expressão de alguns genes cuja identidade suscitou interesse ao presente trabalho, como aqueles que codificam para uma proteína associada à actina, sinaptopodina 2, uma proteína pertencente à família de histona-acetilases denominada *MORF-related gene on chromosome 15* (MRG15-1), uma proteína precursora de amiloide beta A4 (APPA4), o fator de crescimento *Transforming Growth Factor beta* (TGFb), a enzima glutamato oxaloacetato transaminase 2 (GOT2), a enzima piridoxina 5-fosfato oxidase (PNPO), o fator de transcrição *Transcription Factor-like 1* (Tcfl-1) e finalmente, o gene que apresenta maior abundância de transcritos em nossa biblioteca de cDNA, citocromo c oxidase subunidade 1 (cox1).

Estes dois últimos genes, Tcfl-1 e cox1, apresentaram sinais bastantes fortes e constitutivos nos microarranjos, tendo sido selecionados para confirmação da expressão por seu potencial em servir como controles internos em novos experimentos utilizando os microarranjos. O ensaio de *Northern blot* apresentou alguma flutuação na expressão de ambos ao longo dos seis tempos amostrados (1, 3, 6, 12, 48 horas e o controle), mas a tendência foi realmente em constância de expressão, confirmando assim o resultado dos microarranjos e seu potencial como genes balizadores.

Os genes que codificam proteínas do aparato contrátil e do ciclo de cálcio foram selecionados por sua importância nas vias bioquímicas essenciais à contração e geração de força pelo músculo cardíaco. As alterações na

contratilidade do miocárdio são particularmente interessantes ao presente trabalho uma vez que nossas condições experimentais induzem a hipertrofia miocárdica através da imposição de sobrecarga mecânica, e portanto era esperado que estes genes fossem primeiramente mobilizados para adaptar a contração muscular à nova demanda.

Em miocárdio de mamíferos, as MHCs podem ser expressas sob duas isoformas, α -MHC e β -MHC: a α -MHC é quase que exclusivamente expressa em tecido cardíaco, enquanto β -MHC é expressa tanto em tecido cardíaco quanto em músculo esquelético [45]. Sua expressão em miocárdio é regulada durante o desenvolvimento, hormonalmente e pela carga hemodinâmica. Similarmente, as α -actinas sarcoméricas podem ser expressas como duas isoformas, a α -actina cardíaca e a α -actina esquelética, sendo que a isoforma cardíaca predomina em miocárdio adulto de ratos. Sua expressão também é regulada pelos mesmos fatores mencionados acima, incluindo a sobrecarga hemodinâmica e a hipertrofia [45].

Os genes que codificam as isoformas da cadeia pesada da miosina tiveram sua expressão alterada em miocárdio submetido à sobrecarga mecânica, de maneira que a indução de uma isoforma (β -MHC) foi concomitante à repressão da outra (α -MHC). Esta expressão diferencial deve desempenhar um importante papel na dinâmica de contração e adaptação do miocárdio, uma vez que ambas diferem em sua atividade ATPásica [45]. Aqui devemos ressaltar o fato de que o ensaio de *Northern blot* da α -MHC apresentou 2 bandas distintas, aparentemente com perfis distintos (Figura 5A). Acreditamos que o fragmento

utilizado para a produção da sonda pode se referir a uma região conservada entre ambas as isoformas e por isto a hibridação foi cruzada neste caso.

Também de acordo com o esperado, a α -actina cardíaca apresentou indução da expressão a partir de 1 hora pós-coarctação, o que novamente confirma a adequação dos procedimentos adotados pelo presente trabalho para induzir a hipertrofia miocárdica.

Dentre os componentes do ciclo de cálcio, a Ca^{+2} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2) apresentou expressão aparentemente reprimida após 3 horas de coarctação, com um pico de repressão às 6 horas e início de indução a partir de 12 horas transcorridas desde o início do estímulo. O mesmo perfil é apresentado pelo gene que codifica para uma proteína associada ao trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX), mas neste caso o pico de repressão ocorre às 3 horas pós-coarctação e o início de indução, a partir de 6 horas. Em ambos os casos este perfil variável possivelmente se deve à necessidade imediata do aumento da força de contração dos cardiomiócitos, refletindo diretamente em uma depressão da atividade do trocador de cálcio (NCX) e diminuição da quantidade de ATPases da membrana do retículo sarcoplasmático (SERCA-2), de forma a aumentar a disponibilidade de cálcio no meio citoplasmático. Em seguida, alterações nas características intrínsecas das miofibrilas devem aumentar sua afinidade pelo cálcio transiente, diminuindo a necessidade de maior disponibilidade deste íon para a geração da força de contração.

Dentre os genes que buscamos confirmar a expressão devido ao interesse em conhecer seu papel na fase aguda da indução de hipertrofia miocárdica,

ressaltamos o gene que codifica para sinaptopodina-2, membro de uma recém descrita família de proteínas associadas à actina e que está particularmente relacionada com as respostas ao estresse mecânico imposto aos podócitos, um dos tipos celulares presentes nos capilares dos glomérulos renais [46]. Neste tecido, o estresse mecânico desencadeia a reorganização do citoesqueleto de forma a estimular a formação de fibras de estresse perpendiculares à força aplicada. Outros tecidos apresentam esta resposta, entre os quais músculo liso, endotélio, osteoblastos e neurônios presentes na coluna cervical [46, 47]. Assim, é bastante interessante a expressão da sinaptopodina em miocárdio, um tecido sabidamente exposto ao estresse mecânico e que, em situações de sobrecarga hemodinâmica, também altera a disposição dos sarcômeros de forma a estabilizar a tensão nas paredes das câmaras. De acordo com o ensaio de *Northern blot*, sua expressão é aparentemente induzida ao longo do *time course*, o que constituiria um resultado bastante interessante para a compreensão das adaptações compensatórias do miocárdio em resposta ao incremento de carga. No entanto, a relação entre a sinaptopodina-2 e estas respostas deve ser melhor explorada a partir de testes específicos de imunocitoquímica, por exemplo, para permitir avaliações sobre sua localização e padrão de acúmulo da proteína ao longo das células.

Também devido ao interesse em conhecer seu perfil de expressão nas primeiras horas pós-indução de hipertrofia cardíaca por sobrecarga mecânica, em que as vias de sinalização intracelular responsáveis pelo estabelecimento deste fenótipo são desencadeadas, buscamos confirmar a expressão do gene

que codifica para a proteína precursora da beta-amilóide A4 (APPA4). As proteínas beta-amilóides são quelantes de metais transientes, como cobre, ferro e zinco. Também interagem, através da extremidade carboxílica, com diversas proteínas citoplasmáticas, como JIP1 (*C-jun-amino-terminal kinase interacting protein 1*). Esta interação é particularmente interessante ao presente trabalho porque a JIP1 citoplasmática possui uma ação inibitória sobre JNK (*C-jun-amino-terminal kinase*), enquanto promove a agregação de componentes da cascata das MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) para formar um módulo sinalizatório funcional [48]. O ensaio de *Northern blot* revelou um pico de indução deste gene à 1 hora pós-coarctação, forte repressão às 3 horas e indução progressiva até às 48 horas, nossa última amostra. A indução imediata deste gene deve ser melhor estudada, mas claramente condiz com a ativação da via das MAPKs logo no início do estímulo sentido pelos cardiomiócitos. A repressão observada em seguida talvez indique uma maior contribuição da sinalização via JNK para desencadear alterações moleculares nestas células. A natureza da interação entre APPA4 e JIP1 ainda não foi bem determinada e aí reside outro tema bastante interessante para estudos aprofundados.

Genes envolvidos em funções diversas também foram detectados, todos identificados a partir de um único clone dentre os 2304 investigados. Entre estes, buscamos conhecer a expressão de dois genes que codificam duas enzimas inter-relacionadas e que os microarranjos sugeriam apresentar perfis de expressão semelhantes: a enzima glutamato oxaloacetato transaminase 2 (GOT2), que atua na conversão do aspartato a oxaloacetato e glutamato (via de

metabolismo dos aminoácidos), e a enzima piridoxina 5-fosfato oxidase (PNPO), essencial na biossíntese de piridoxal 5-fosfato (PLP), que vem a ser cofator de GOT2. No ensaio de *Northern blot* utilizando a sonda sintetizada a partir de GOT2, novamente detectamos duas bandas. Uma vez que existem duas isoformas (GOT1 e GOT2), possivelmente a sonda foi produzida a partir de um fragmento conservado entre ambas. À exceção da amostra referente às 6 horas pós-coarctação, a densitometria da banda 2 de GOT2 e de PNPO apresentam o mesmo perfil de expressão, com dois picos de indução (1 hora e 12 horas pós coarctação, respectivamente). Este resultado dá suporte ao uso da técnica de microarranjos para investigar possíveis correlações entre proteínas a partir de semelhanças no perfil de expressão dos genes que as codificam.

Finalmente, selecionamos para confirmação da expressão por *Northern blot* um gene que codifica para uma histona-acetilase (MRG15) e o gene do fator de crescimento TGFb1.

O ensaio de *Northern blot* do gene que codifica uma histona-acetilase denominada *MORF4-related gene on chromosome 15* (MRG15) apresentou duas bandas que provavelmente correspondem às duas formas de *splicing* alternativo desta proteína (MRG15-a e MRG15-b) [49]. Segundo estudos recentes, esta proteína é expressa ubiquamente em diversos tecidos e deve desempenhar importante papel na regulação do ciclo celular, tendo sido observado que sua expressão diminui em fibroblastos senescentes [49]. No ensaio de *Northern blot*, a expressão apresentou-se um ligeiro pico de indução

em 3 horas e 48 horas pós-coarctação na banda superior (Banda 1) e em 1 hora e 3 horas na banda inferior (Banda 2) (Figura 5G).

Estes resultados, se comparados com o observado para o gene da APPA4, podem indicar que ocorrem 2 momentos críticos para a sinalização intracelular na fase aguda da indução de hipertrofia miocárdica, o período de 1-3 horas após o estímulo e novamente dentro de 48 horas, mas tais conjecturas devem ser confirmadas por estudos mais aprofundados.

Já o gene que codifica para o fator de crescimento TGFb1 (*Transforming Growth factor beta 1*) apresentou-se reprimido ao longo do período amostrado no ensaio de *Northern blot*, exceptuando-se o tempo de 48 horas pós-coarctação, quando apresenta uma indução. TGFb1 tem sido destacado por sua importância no estabelecimento de doenças fibróticas, uma vez que tem importante papel na diferenciação de miofibroblastos e síntese de colágeno [50]. Especificamente no caso da hipertensão arterial, acredita-se que TGFb1 possui um importante papel na resposta hipertrófica do miocárdio, apresentando aumento da expressão a partir de 1 dia após a indução por sobrecarga pressória [51]. Como nossas amostras concentraram em períodos menores que 1 dia e estenderam-se apenas até 48 horas, sendo que nesta última amostra a expressão de TGFb1 apresentou-se induzida, acreditamos que estes resultados podem ser coerentes entre si.

Assim, acreditamos que seria interessante ao presente trabalho que fosse ampliado o *time course* de indução de hipertrofia miocárdica, de forma a confirmar se o aumento na expressão observado para alguns genes na última

amostra coletada, 48 horas pós-coarctação, se deve ao início de uma curva de indução gênica ou se reflete um simples retorno aos níveis de expressão normais.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho foi fundamental para a padronização e consolidação da técnica de microarranjos de DNA no Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Unicamp. A partir dos resultados obtidos, outros estudos empregando esta técnica puderam avaliar a adequação dos protocolos de isolamento e purificação dos clones de suas bibliotecas de DNA para a obtenção de sinais de boa qualidade nos microarranjos, utilizando para isto material de rato como controle interno dos experimentos.

No que diz respeito aos nossos resultados, ficou bastante clara a inadequação de bibliotecas de cDNA não-normalizadas para a produção dos microarranjos, uma vez que a alta redundância dos clones diminui a possibilidade de detecção de genes diferencialmente expressos em qualquer condição fisiológica que mobilize vias metabólicas distintas daquela presente no tecido a partir do qual as mensagens foram coletadas para produzir a biblioteca.

No entanto, pudemos confirmar a adequação desta técnica como um método de *screening* de bibliotecas de ESTs, uma vez que, mesmo lidando com poucos clones individuais, pudemos identificar um gene não descrito anteriormente como expresso em miocárdio, sinaptopodina-2, que participa da formação de fibras de estresse em células submetidas a pressão mecânica. Também foi identificado um gene candidato a estudos mais aprofundados, o gene que codifica para uma proteína precursora de amilóide beta A4 (APPA4).

7 PERSPECTIVAS

A consolidação da técnica de microarranjos de DNA em nosso laboratório gera grandes possibilidades para o estudo da expressão gênica de forma ampla e simultânea. O processo de padronização nos forneceu experiência suficiente para compreendermos a correlação entre estratégia e adequação técnica e este conhecimento será uma ferramenta valiosa em estudos futuros.

O problema biológico investigado no presente trabalho, a progressão de hipertrofia ventricular decorrente de sobrecarga mecânica, é de grande interesse para o entendimento das bases moleculares da hipertensão arterial. A detecção de genes cuja função pode ser relevante ao estabelecimento fenotípico da hipertrofia miocárdica, como sinaptopodina-2, APPA4, MRG15 e TGFb1, abre a possibilidade de estudos mais aprofundados, buscando sua melhor caracterização. Em especial, o gene que codifica para APPA4 pode vir a constituir objeto de técnicas robustas de quantificação da expressão gênica, como *Northern blot* e RT-PCR, de forma a ampliar o *time course* de indução da hipertrofia miocárdica, além da realização de ensaios de imunocitoquímica e interação proteína-proteína, de forma a analisar o perfil de atividade da proteína.

Como projeto futuro, ampliaremos o uso dos microarranjos, já corrigindo as limitações detectadas no presente trabalho, para avaliar de forma comparativa o perfil de expressão gênica desencadeado na proteção miocárdica por condicionamento isquêmico e por compostos quinazolinicos em miocárdio de ratos (*Rattus norvegicus*) através de protocolos estabelecidos de isquemia/reperfusão e administração da droga, respectivamente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blumenthal, H.T., *Milestone or genomania? The relevance of the Human Genome Project to biological aging and the age-related diseases*. J.Gerontology, 2001. **56A (9)**: p. M529-M537.
2. Pertsemidis, A., Fondon III, J.W., *Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy)*. Genome Biol., 2001. **2(10)**(reviews): p. 2002.1-2002.10.
3. Brown, P.O., Botstein, D., *Exploring the new world of the genome with DNA microarray*. Nature Genetics Supp., 1999. **21**: p. 33-37.
4. Liang, P., Pardee, A.B., *Differential display of eucariotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction*. Science, 1992. **257**: p. 967-971.
5. Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., *Serial analysis of gene expression*. Science, 1995. **270**: p. 484-487.
6. Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M., *Cloning the differences between two complex genomes*. Science, 1993. **259**: p. 946-951.
7. Jiang, H., Kang, D., Alexandre, D., Fisher, P.B., *RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes*. PNAS, 2000. **97**: p. 12684-12689.
8. Schena, M., Shalon, D., Davies, R.W., Brown, P.O., *A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization*. Genome Res., 1996. **6**: p. 639-645.
9. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**: p. 467-470.
10. DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale*. Science, 1997. **278**: p. 680-686.
11. Dominiczak, A.F., Negrin, D.C., Clark, J.S., Brosnan, M.J., McBride, M.W., Alexander, M.Y., *Genes and Hypertension : From Gene Mapping in*

- Experimental Models to Vascular Gene Transfer Strategies*. Hypertension, 2000. **35**: p. 164-172.
12. Lips, D.J., et al., *Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy*. Eur Heart J, 2003. **24**(10): p. 883-96.
 13. Ward, R., *Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure.*, in *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management*, J.H. Laragh, Editor. 1990, Raven Press, Ltda.: New York.
 14. Phillips, M.I., *Is gene therapy for hypertension possible?* Hypertension, 1999. **33**: p. 8-13.
 15. Debouck, C., Goodfellow, P.N., *DNA microarrays in drug discovery and development*. Nature Genetics Supp., 1999. **21**(1): p. 48-50.
 16. Cooper, G., *Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms*. Annu. Ver. Physiol., 1987. **49**: p. 501-518.
 17. Opie, L.H., *Mechanisms of cardiac contraction and relaxation.*, in *Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*, E. Braunwald, Editor. 1987, W.B. Saunders company: Philadelphia.
 18. Bugaisky, L.B., Gupta, M., Zak, R., *Cellular and molecular mechanisms of cardiac hypertrophy.*, in *The heart and cardiovascular system*, H.A. Fozzard, Editor. 1992, Raven Press, Ltda.: New York.
 19. Gunther, S., Grossman, W., *Determinants of ventricular function in pressure overload hypertrophy in man*. Circulation, 1979. **59** (4): p. 679-687.
 20. Caro, C.G., Pedley, T.J., Shroter, R.C., Seed, W.A., *The mechanics of the circulation*. 1978: Oxford University Press.
 21. Vandeburgh, H.H., *Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro*. Am. J. Physiol., 1992. **262**: p. R350-R355.
 22. Morgan, H.E., Baker, K.M., *Cardiac Hypertrophy mechanical, neural and endocrine dependence*. Circulation, 1991. **83**: p. 13-25.

23. Cooper, G., Kent, R.L., Uboh, C.E., et al., *Hemodynamic versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy*. J. Clin. Invest., 1985. **75**(1403-1414).
24. Kent, R.L., Uboh, C.E., Thompson, E.W., et al., *Biochemical and structural correlates in unloaded and reloaded cat myocardium*. J. Mol. Cell. Cardiol., 1985. **17**: p. 153-165.
25. Cooper, G., Mercer, W.E., Hooper, J.K., et al., *Load regulation of the properties of adult feline cardiocytes: the role of sub-strate adhesion*. Circ. Res., 1986. **58**: p. 692-705.
26. Mann, D.L., Kent, R.L., Cooper, G., *Load regulation of the properties of adult feline adipocytes: growth induction by cellular deformation*. Circ. Res., 1989. **64**: p. 1079-90.
27. Nair, K.G., Cutilletta, A.F., Zak, R., Koide, T., Rabinowitz, M., *Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. I. Experimental model; changes in heart weight, RNA content, and nuclear RNA polymerase activity*. Circ. Res., 1968. **23**(3): p. 451-62.
28. Franchini, K.G., *Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares*. Rev. Bras. Hipertens., 2001. **8**: p. 125-142.
29. Lehoux, S., Tedgui, A., *Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall*. Hypertension, 1998. **32**: p. 338-345.
30. Sadoshima, J. and S. Izumo, *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 551-71.
31. Kang, M.J., Kim, J.S., Chae, S.W., Koh, K.N., Koh, G.Y., *Cyclins and cyclin-dependent kinases during cardiac development*. Moll.Cells., 1997. **7**: p. 360-366.
32. McBride, K., Nemer, M., *Regulation of the ANF and BNP promoters by GATA factors: lessons learned for cardiac transcription*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2001. **79**(8): p. 673-678.

33. Sack, M.N., Rader, T.A., Park, S., Bastin, J., McCune, S.A., Kelly, D.P., *Fatty Acid Oxidation Enzyme Gene Expression Is Downregulated in the Failing Heart*. Circulation, 1996. **94**: p. 2837-2842.
34. Thuerauf, D.J., et al., *Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase-2 expression is regulated by ATF6 during the endoplasmic reticulum stress response: intracellular signaling of calcium stress in a cardiac myocyte model system*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 48309-17.
35. Wisloff U., L., J.P., Falck, G., Beisvag, V., Currie, S., Smith, G., Ellingsen, O., *Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats*. Cardiovasc. Res., 2001. **50**(3): p. 495-508.
36. Friddle, C.J., Koga, T., Rubin, E.M., Bristow, J., *Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy*. PNAS, 2000. **97**: p. 6745-6750.
37. Johnatty, S.E., Dyck, J.R.B., Michael, L.H., Olson, E.N., Abdellatif, M., *Identification of genes regulated during mechanical load-induced cardiac hipertrophy*. J. Mol. Cell. Cardiol., 2000. **32**: p. 805-815.
38. Kerr, M.K., Churchill, G.A., *Statistical design and the analysis of gene expression microarray data*. Genet. Res., 2001. **77** (2): p. 123-8.
39. Hayward, R.E., et al., *Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in Plasmodium falciparum malaria*. Mol Microbiol, 2000. **35**(1): p. 6-14.
40. Anisimov SV, T.K., Stern MD, Lakatta EG, Boheler KR., *A quantitative and validated SAGE transcriptome reference for adult mouse heart*. Genomics, 2002. **80**(2): p. 213-222.
41. Anisimov SV, L.E., Boheler KR., *Discovering altered genomic expression patterns in heart: transcriptome determination by serial analysis of gene expression*. European Journal of Heart failure, 2001. **3**: p. 271-281.
42. Weinberg, E.O., et al., *Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload*. Physiol Genomics, 2003. **12**(2): p. 113-27.

43. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., *Current protocols in molecular biology*, ed. J. Wiley. Vol. Sons Inc. 1989, New York: S.
44. Hegde, P., Qi R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J.E., Shesrud, E., Lee, N., Quackenbush, J., *A concise guide to DNA microarray analysis*. Biotechniques, 2000. **29**(3): p. 548-562.
45. Boheler KR, C.C., Martin X, Wisnewsky C, Schwartz K., *Cardiac expressions of α - and β -myosin heavy chains and sarcomeric α -actins are regulated through transcriptional mechanisms*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12979-12985.
46. Endlich N, K.K., Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, Endlich K., *Podocytes respond to mechanical stress in vitro*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**: p. 413-422.
47. Deller T, H.C., Deissenrieder K, Del Turco D, Coulin C, Gebhardt C, Drakew A, Schwarz K, Mundel P, Frotscher M., *Laminar distribution of synaptopodin in normal and reeler mouse brain depends on the position of spine-bearing neurons*. J.Comp.Neurol., 2002. **453**(1): p. 33-44.
48. Yasuda, J., et al., *The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7245-54.
49. Tominaga, K. and O.M. Pereira-Smith, *The genomic organization, promoter position and expression profile of the mouse MRG15 gene*. Gene, 2002. **294**(1-2): p. 215-24.
50. Thannickal, V.J., et al., *Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12384-9.
51. Li, J.M. and G. Brooks, *Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(8): p. 2213-24.

APÊNDICE A

Endereço nos microarranjos	First Hit (Blastn)	E-Value	First Hit (Blastx)	E-Value	3h	6h	12h	48h
A1.a2	Rattus norvegicus LOC312062 (LOC312062), mRNA	0.085	unknown protein	7E-17	1.245	0.88	0.955	1.03
A1.b2	Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I mRNA, partial cds; and tRNA-Ser gene, complete sequence; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	cytochrome oxidase subunit 1 [Mus musculus]	2E-41	1.295	0.87	1.115	1.05
A1.f1	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain 2 - rat mitochondrion	3E-20	1.365	0.66	1.205	1.08
A1.h1	Rattus norvegicus strain BN/SSNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome oxidase subunit III [Peromyscus slevini]	4E-48	1.01	0.55	0.665	0.2
A1.i1	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	0.485	1.01	0.415	0.06
A1.i4	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	1.E-07	cytochrome c oxidase subunit I [Eumetopias jubatus]	4E-47	0.9	0.73	0.91	0.22
A1.k1	Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I mRNA, partial cds; and tRNA-Ser gene, complete sequence; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	4E-36	1.29	0.92	1.35	1.34
A1.k2	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Mus musculus]	7E-49	1.175	0.96	1.065	1.31
A2.a2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys,	0	cytochrome oxidase c subunit 1 [Pipistrellus abramus]	5E-29	1.34	1.06	1.195	0.66

	and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,							
A2.b3	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	2E-45	cytochrome c oxidase subunit I [Nycticebus coucang]	0.22	1.83	1.19	1.55	2.44
A2.e3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	0.33	1.915	0.84	1.385	1.75
A2.f2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	4E-30	2.055	0.67	1.595	2.05
A4.a2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	1E-13	NO HITS FOUND	-	1.42	1.22	0.84	1.85
A4.b2	Rattus norvegicus mitochondrial ribosomal protein L17 (Mrpl17), mRNA	2E-46	brain Na ⁺⁺ /Ca ⁺⁺ exchanger-associated protein [Rattus norvegicus]	8.E-05	1.73	1.39	1.67	2.35
A4.c3	Rat mitochondrial genome fragment from Sprague-Dawley strain female	4E-63	cytochrome b [Proteles cristatus]	1E-17	1.59	1.38	1.505	1.94
A4.g1	Rattus norvegicus ribosomal protein L6 (Rpl6), mRNA	5E-68	similar to ribosomal protein L6 [imported] - rat [Rattus norvegicus]	5E-32	1.755	0.99	1.94	2.38
A4.g2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 5 [Rattus norvegicus]	2E-51	1.7	1.36	1.845	2.08
A4.g3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH-dehydrogenase (NDI) (att start codon)	1E-59	1.37	1.35	1.08	2.24
B1.c2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen,	1E-19	cytochrome c oxidase subunit 1 [Arcyria cinerea]	2.E-03	0.9	0.54	1.075	0.19

	Denmark)							
B1.d1	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	0.875	0.56	1.03	0.68
B1.e1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Myoxus glis]	4E-31	1.495	1.13	1.38	1.35
B1.e3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	4E-25	1.4	1.10	0.885	1.02
B1.f1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	2E-19	0.645	0.55	0.525	0.47
B1.f2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	4.E-04	Chromate transport protein ChrA [Corynebacterium glutamicum ATCC 13032]	6.4	1.785	0.98	1.47	1.37
B1.g2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	E-07	cytochrome c oxidase subunit I [Eumetopias jubatus]	4E-47	1.305	1.31	1.47	0.27
B1.g3	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	cytochrome b [Apomys sp. F]	2E-38	1.1	0.96	0.98	0.99
B1.h2	Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I mRNA, partial cds; and tRNA-Ser gene, complete sequence; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	5E-50	0.65	0.59	1.475	0.47
B1.h3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	3E-63	NADH dehydrogenase subunit 4 [Talpa europaea]	4E-12	0.52	0.58	1.355	0.83
B2.b1	Rattus norvegicus similar to histone acetylase complex subunit MRG15-1 [Mus musculus]	5E-37	unknown [Homo sapiens]	2E-17	1.805	1.39	1.49	1.82

	(LOC304997), mRNA							
B2.c2	Rattus norvegicus similar to synaptopodin 2 [Mus musculus] (LOC310842), mRNA	8E-67	similar to synaptopodin 2 [Mus musculus] [Rattus norvegicus]	2E-17	1.58	0.61	1.4	1.45
B2.c3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	4E-28	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	6.E-09	1.43	1.07	1.36	1.78
B2.e2	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products	5E-28	cytochrome c oxidase subunit 3 [Pan troglodytes]	1.E-06	0.43	0.23	0.45	0.25
B2.g2	Rattus norvegicus myosin heavy chain, polypeptide 7 (Myh7), mRNA	0	myosin heavy chain, polypeptide 7; myosin heavy chain, cardiac muscle, fetal; myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta [Rattus norvegicus]	2E-52	1.63	1.02	1.55	1.8
B2.i1	Rat mRNA for sarcomeric mitochondrial creatine kinase	0	creatine kinase, mitochondrial 2 [Mus musculus]	5E-62	1.195	1.61	1.445	0.66
B2.k3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome oxidase subunit I [Galaxias zebratus]	9E-51	0.69	1.01	1.135	0.76
B2.k4	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	E-04	mutant ATP synthase subunit 6 [Rattus norvegicus]	2E-12	1.13	0.98	1.215	0.99
B3.c1	Rattus norvegicus complement C4-like protein C4I (C4) pseudogene, partial sequence	0	NO HITS FOUND	-	1.825	1.26	1.78	2.01
B3.e2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	1E-96	cytochrome b [Trichechus manatus]	1E-18	1.715	1.52	1.58	1.84
B3.f1	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	1.715	1.09	1.66	2.18

B3.f2	Rattus norvegicus 2 BAC CH230-197E15 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	0	Ab2-051 [Rattus norvegicus]	9E-51	1.54	0.65	1.785	1.51
B3.k1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome oxidase III [Rattus norvegicus]	2E-35	1.245	0.83	1.440	1.36
B3.k4	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	1.45	0.99	1.475	1.53
B4.a1	Rattus norvegicus pyridoxine 5-phosphate oxidase (U91561), mRNA	E-04	prolyl-tRNA synthetase [Caulobacter crescentus CB15]	0.57	1.43	1.04	1.365	1.72
B4.a2	Rat mitochondrial NADH-dehydrogenase (NDI) gene, complete cds	7E-92	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	1E-33	1.3	1.24	1.525	1.5
B4.c2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	3E-17	NO HITS FOUND	-	1.69	0.84	1.63	1.69
B4.e3	Rattus norvegicus Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd), mRNA	0	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (38 kDa BFA-dependent ADP-ribosylation substrate) (BARS-38)	4E-89	1.02	1.04	1.14	1.32
B4.i1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	2E-77	cytochrome oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	4E-14	1.025	1.04	1.210	1.32
B4.j3	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence;	0	cytochrome oxidase subunit III [Rattus norvegicus]	5E-74	1.58	1.11	1.46	1.69

	and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products							
B4.k1	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	1.31	0.98	1.695	1.38
C1.b3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	2E-28	1.205	1.05	1.435	1.2
C1.d3	Rattus norvegicus 2 BAC CH230-285C2 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	0	probable RNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.49) (clone MH2C) - rat retrotransposon L1 (fragment)	3E-56	0.76	0.44	0.935	0.47
C1.f2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	cytochrome oxidase subunit I; COX I [Rattus sp.]	2E-46	0.965	0.82	1.305	0.71
C1.g3	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	1.295	0.74	1.295	1.38
C2.e3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	5E-35	0.975	0.69	1.295	1.12
C2.j3	Rattus norvegicus BHE/Cdb tRNA-Lys gene, partial sequence; and ATP synthase subunit 8 (atp8) gene and mutant ATP synthase subunit 6 (atp6) gene, atp6-b allele, mitochondrial genes encoding mitochondrial products, complete cds	0	ATP synthase F0 subunit 6 [Rattus norvegicus]	2E-38	0.975	0.43	1.255	1.1

C3.a2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	1E-24	0.86	0.36	0.84	0.8
C3.a3	Rattus norvegicus mitochondrial ribosomal protein L17 (Mrpl17), mRNA	E-04	NO HITS FOUND	-	1.405	1.05	1.5	1.68
C3.h3	Rattus norvegicus Amyloid beta (A4) precursor protein (App), mRNA	5E-22	amyloid-beta precursor protein-like protein long isoform [Mus musculus]	2E-50	1.76	0.81	1.695	1.79
C3.i4	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	3E-16	1.525	0.76	0.975	1.3
C3.j4	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	NO HITS FOUND	-	1.705	1.49	1.24	1.66
C4.a2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0.064	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	8.E-04	1.195	1.23	1.205	1.58
D1.a2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	2E-27	1.255	0.80	1.28	1.27
D1.b3	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	cytochrome oxidase subunit III [Rattus norvegicus]	4E-79	0.69	0.71	0.81	0.7
D1.d1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	cytochrome oxidase subunit I; COX I [Rattus sp.]	4E-42	1.265	0.77	1.55	1.51
D1.e2	Rattus norvegicus ATP synthase, H ⁺ transporting,	0	F ₀ -ATPase subunit b precursor	4E-47	0.79	0.22	1.02	0.94

	mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 (Atp5f1), mRNA							
D1.f3	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	cytochrome c oxidase subunit I [Hemiechinus auritus]	6E-43	0.87	0.95	1.26	1.13
D1.h2	Rattus norvegicus clone RP31-547A5 strain Brown Norway, complete sequence	1E-09	NO HITS FOUND	-	1.075	0.66	1.225	1.25
D1.i1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	1E-62	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	3E-11	1.07	0.69	1.255	1.42
D1.j1	Rattus norvegicus BHE/Cdb tRNA-Lys gene, partial sequence; and ATP synthase subunit 8 (atp8) gene and mutant ATP synthase subunit 6 (atp6) gene, atp6-b allele, mitochondrial genes encoding mitochondrial products, complete cds	0	mutant ATP synthase subunit 6 [Rattus norvegicus]	3E-40	0.835	0.50	2.115	0.95
D1.j2	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit II [Rattus norvegicus]	9E-40	0.57	0.67	0.58	0.82
D1.j3	Rattus norvegicus ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1), mRNA	0	ferritin, heavy polypeptide 1; Ferritin subunit H [Rattus norvegicus]	1E-64	0.44	0.64	0.95	0.64
D2.a1	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial	0	ATP synthase F0 subunit 6 [Rattus norvegicus]	2E-21	1.505	0.76	1.4	1.39

	products							
D2.d1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	cytochrome oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	7E-36	0.635	0.50	0.655	0.76
D2.f2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	5E-13	NO HITS FOUND	-	0.27	0.34	0.475	0.44
D2.g1	Rattus norvegicus mitochondrial genome	5.E-03	cytochrome C oxidase subunit I [Tarsius bancanus]	9E-12	1.015	0.43	1.125	1.34
D2.i3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome C oxidase subunit I [Tarsius bancanus]	4E-19	0.58	0.81	0.89	0.09
D2.j2	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit II [Rattus norvegicus]	3E-39	1.55	0.65	1.225	1.39
D2.j3	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	2E-36	ATPase [Rattus norvegicus]	3E-03	1.3	0.75	1.53	1.49
D3.d3	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	cytochrome oxidase subunit 1 [Mus musculus domesticus]	3E-48	1.265	1.11	1.46	1.56
D3.e2	Rattus norvegicus myosin heavy chain, polypeptide 7 (Myh7), mRNA	0	cardiac alpha-myosin heavy chain [Homo sapiens]	2.9	1.045	0.91	1.19	1.34

D3.f2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene	2E-39	cytochrome oxidase subunit I; COX I [Rattus sp.]	4E-09	0.67	1.26	1.025	0.84
D3.g2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	4E-22	0.965	1.14	1.14	1.27
D3.h1	Rattus norvegicus Transforming growth factor beta stimulated clone 22 (Tgfb1i4), mRNA	0	putative	5E-43	1.345	0.96	1.45	1.6
D3.i3	Rattus norvegicus mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds	0	cytochrome b [Rattus norvegicus]	2E-76	1.27	0.89	1.18	1.11
D3.i4	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome oxidase subunit 1 [Mus musculus domesticus]	8E-64	0.95	0.82	1.03	1.02
D4.b2	Rat stomach non-muscle Ca+2-ATPase mRNA, complete cds	0	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2; sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-dependent ATPase 2 [Rattus norvegicus]	1E-41	0.525	0.63	1.33	0.94
D4.e2	Rattus norvegicus cardiac ankyrin repeat kinase (Cark), mRNA	2E-27	cardiac ankyrin repeat kinase [Rattus norvegicus]	5E-24	1.355	1.21	1.35	1.66
D4.g3	Ralstonia solanacearum GMI1000 chromosome, complete sequence; segment 12/19	0.33	NO HITS FOUND	-	0.755	0.86	1.010	1.07
E1.a2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion,	8E-95	NADH-dehydrogenase (NDI) (att start	2E-14	0.945	0.74	0.94	0.99

	complete genome		codon)					
E1.a3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NADH dehydrogenase subunit 4L [Rattus norvegicus]	3E-13	0.26	0.32	0.76	0.4
E1.d2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	cytochrome c oxidase subunit I [Echinosorex gymnura]	2E-56	0.895	0.72	1.075	1.22
E1.j1	Rattus norvegicus similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2-23 kDa (Ubiquitin-protein ligase) (Ubiquitin carrier protein) (LOC295686), mRNA	0	Similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3, UBC4/5 homolog (yeast) [Danio rerio]	1E-63	0.855	1.01	0.805	1.47
E1.k4	Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L13a (Transplantation antigen P198) (Tum-P198 antigen) (LOC292895), mRNA	0	ribosomal protein L13A [Rattus norvegicus]	2E-10	0.065	0.05	0.35	0.23
E2.d2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	0.545	0.24	0.745	0.73
E2.f2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	4E-10	cytochrome c oxidase subunit I [Hemiechinus auritus]	4E-06	0.44	0.33	1.015	0.93
E2.i1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	7E-49	cytochrome oxidase subunit 1 [Tricholepidion gertschi]	2E-11	0.92	0.46	1.34	1.02
E2.j1	Rattus norvegicus mitochondrial genome	2E-76	NADH dehydrogenase subunit 2 [Rattus norvegicus]	3E-29	0.26	0.21	1.27	0.33
E3.d2	Rattus norvegicus Phosphorylase, glycogen; muscle (McArdle syndrome) (Pygm), mRNA	1E-78	NO HITS FOUND	-	0.6	0.53	0.82	0.82
E3.d3	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	3E-11	1.085	1.00	1.54	1.23
E3.e1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion,	2E-55	cytochrome c oxidase subunit 1 [Nucras tessellata]	2E-04	0.9	0.82	1.055	1.17

	complete genome							
E3.f2	R.rattus mRNA for alpha-actin cardiac protein	4E-38	alpha-smooth muscle actin	7E-16	0.605	0.39	0.79	0.79
E3.i1	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products	1E-40	mutant ATP synthase subunit 6 [Rattus norvegicus]	6E-03	1.645	0.83	1.495	1.45
E3.j1	Rattus norvegicus LOC295044 (LOC295044), mRNA	0	NO HITS FOUND	-	1.09	0.74	1.27	1.24
E4.b1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	4E-90	cytochrome c oxidase subunit II [Rattus norvegicus]	3E-12	1.345	0.96	1.26	1.41
E4.b2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	1E-47	cytochrome oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	3E-23	0.93	1.00	0.815	1.26
E4.e2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	2E-80	mutant ATP synthase subunit 6 [Rattus norvegicus]	2E-18	0.915	0.88	0.78	1.16
E4.f2	Rattus norvegicus similar to transcription factor-like 1 [Mus musculus] (LOC310661), mRNA	7E-55	NO HITS FOUND	-	1.585	1.15	1.525	1.76

E4.j3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	NO HITS FOUND	-	1.74	1.22	1.555	1.6
E4.k2	Rattus norvegicus similar to Tryptophanyl-tRNA synthetase (Tryptophan--tRNA ligase) (TRPRS) (IFP53) (hWRS) (LOC314442), mRNA	2E-36	tryptophanyl-tRNA synthetase [Mus musculus]	2E-27	0.75	1.02	1.135	1.19
F1.a3	Rattus norvegicus 7 BAC CH230-309G3 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	0	hypothetical protein XP_299777 [Homo sapiens]	9.7	0.225	0.67	0.34	0.53
F1.b2	Rattus norvegicus ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide (Atp5b), mRNA	0	ATPase beta, F1	6E-32	1.04	0.33	1.015	1.06
F1.i3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome oxidase subunit III [Rattus norvegicus]	2E-42	1.09	0.59	1.03	4.88
F1.i4	Rattus norvegicus mitochondrial H ⁺ -ATP synthase alpha subunit (Atp5a1), mRNA	0	ATP synthase alpha chain liver isoform, mitochondrial precursor	2E-44	0.5	0.45	0.65	1.37
F2.b2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	cytochrome c oxidase subunit I [Gymnothorax kidako]	2E-26	0.9	0.35	0.995	0.97
F2.d3	Rattus norvegicus clone RP31-446A15 strain Brown Norway, complete sequence	5E-25	Aa1114 [Rattus norvegicus]	8E-07	1.045	0.75	1.18	1.3
F2.f1	Rattus norvegicus 14 BAC CH230-186B23 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	2E-30	Aa1114 [Rattus norvegicus]	4E-05	0.685	0.32	0.745	0.96
F2.h1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser	0	cytochrome c oxidase chain I [Mesocricetus auratus]	0.01	1.12	0.44	1.16	1.48

	and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,							
F2.i3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	3E-11	Myosin IC heavy chain	E-03	0.555	0.29	0.91	0.69
F2.i4	Rattus norvegicus Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform 1 (Ppp1cc), mRNA	0	NO HITS FOUND	-	0.545	0.27	0.615	0.69
F3.b2	Rat stomach non-muscle Ca ²⁺ -ATPase mRNA, complete cds	0	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase [Rattus norvegicus]	3E-04	0.74	0.68	0.695	1.04
F3.c2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome b [Rattus norvegicus]	2E-39	0.46	0.39	0.32	0.38
F3.d2	Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I mRNA, partial cds; and tRNA-Ser gene, complete sequence; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	7E-33	0.815	0.69	1.345	1.21
F3.g2	Rattus norvegicus mitochondrial cytochrome B gene; Pro-, Thr-, Glu-tRNA genes; and URF6	6E-71	cytochrome b	9E-33	0.765	1.04	1.115	1.14
F3.j3	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	E-07	Myosin IC heavy chain	E-03	0.895	0.71	0.96	0.83
F3.k1	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	9E-76	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	3E-05	1.345	0.67	1.08	1.13
F3.k4	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome oxidase subunit III [Rattus norvegicus]	5E-51	0.755	0.60	NA	0.95
F4.d2	Rattus norvegicus Phosphorylase, glycogen; muscle (McArdle syndrome) (Pygm), mRNA	2E-15	NO HITS FOUND	-	0.71	0.75	0.96	1.11

F4.f2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	cytochrome b [Microtus rossiaemeridionalis]	2E-29	0.625	0.79	1.2	1.37
F4.g1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome c oxidase subunit II [Rattus norvegicus]	6E-18	0.88	0.84	1.005	1.26
F4.g3	Rattus norvegicus Myosin light chain 3, alkali, cardiac ventricles (Myl3), mRNA	0	gene_id:F1D9.26~unknown protein [Arabidopsis thaliana]	1E-38	0.68	0.76	0.89	1.02
F4.i3	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	ATPase [Rattus norvegicus]	7.E-04	1.39	0.90	1.385	1.76
F4.j4	Rattus norvegicus ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (Atp2a2), mRNA	0	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2; sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 2 [Mus musculus]	3E-45	0.67	0.49	0.77	0.8
F4.k3	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	cytochrome oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	3E-65	1.245	0.91	1.06	1.18
G1.b1	Rattus norvegicus golgi SNAP receptor complex member 1 (Gosr1), mRNA	9.E-05	cytochrome oxidase subunit 1 [Echinops telfairi]	2.E-08	0.93	0.87	1.125	1.56
G1.c2	Rattus norvegicus 7 BAC CH230-309G3 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete	5.E-06	RIKEN cDNA 9030605E16 [Mus musculus]	2E-12	0.155	0.75	0.155	0.82

	sequence							
G1.d2	Rattus norvegicus ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide (Atp5b), mRNA	1E-13	NO HITS FOUND	-	0.5	0.34	0.885	0.62
G1.f1	Rattus norvegicus hemoglobin beta chain complex (Hbb), mRNA	0	major beta-hemoglobin	1E-54	1.335	0.76	1.425	1.49
G1.h3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	NADH dehydrogenase subunit 2 [Rattus norvegicus]	4E-50	1.275	0.65	1.19	1.6
G2.a1	Rattus norvegicus glutamate oxaloacetate transaminase 2 (Got2), mRNA	2.E-08	ENSANGP0000001 3695 [Anopheles gambiae]	4.8	0.515	0.48	0.855	0.58
G2.c1	Rattus norvegicus golgi SNAP receptor complex member 1 (Gosr1), mRNA	0	NADH dehydrogenase subunit 2 [Rattus norvegicus]	4E-41	0.795	0.68	1.11	0.93
G2.e1	Rattus norvegicus mitochondrial genome	6E-55	cytochrome b [Rattus norvegicus]	3E-12	0.59	0.53	1.230	0.77
G2.e2	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	ATPase synthase subunit 6 [Rattus norvegicus]	4E-12	1.835	0.96	1.41	1.86
G2.g1	Rat mitochondrial NADH-dehydrogenase (NDI) gene, complete cds	0	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	4E-48	0.585	0.72	0.525	0.59
G2.g3	R.rattus mRNA for alpha-actin cardiac protein	0	alpha-muscle actin	6E-72	0.97	0.65	0.9	1.05
G2.j1	Rattus norvegicus mitochondrial genome	3E-14	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	1.E-08	1.055	0.89	1.015	1.08
G2.k1	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	hypothetical 18K protein - goldfish mitochondrion	0.66	0.775	0.86	0.915	0.85

G3.a2	Rattus norvegicus 2 BAC CH230-203P11 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	3.E-02	ORF2 consensus sequence encoding endonuclease and reverse transcriptase minus RNaseH [Rattus norvegicus]	7E-63	1.185	0.86	0.905	1.45
G3.c2	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC28083 [Mus musculus] (LOC296654), mRNA	0	similar to hypothetical protein MGC28083 [Mus musculus] [Rattus norvegicus]	4E-63	0.74	1.12	0.52	0.89
G3.e1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	3E-51	1.29	0.87	1.400	1.33
G3.h2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	2E-43	cytochrome oxidase subunit I; COX1 [Platynereis dumerilii]	8E-10	1.575	1.03	1.51	1.73
G3.i1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	2E-49	1.045	0.93	1.255	1.4
G3.i3	Rattus norvegicus golgi SNAP receptor complex member 1 (Gosr1), mRNA	0	NADH dehydrogenase subunit 2 [Rattus norvegicus]	1.E-03	0.295	0.21	0.29	0.31

G4.b2	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds; cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; tRNA-Gly gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	ATPase subunit 6 [Rattus norvegicus]	4E-19	0.7	0.73	0.89	0.96
G4.e2	Rattus norvegicus smooth muscle-specific 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (LOC84013), mRNA	3E-26	smooth muscle-specific 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type [Rattus norvegicus]	3.E-03	1.27	1.11	1.51	1.76
G4.f1	Rattus norvegicus eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (Eef1a1), mRNA	2E-52	ENSANGP00000010498 [Anopheles gambiae]	4E-13	1.215	0.98	1.38	1.38
G4.g3	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein LOC51061 [Homo sapiens] (LOC302899), mRNA	0	NO HITS FOUND	-	1.09	0.91	1.27	1.35
G4.h3	Rattus norvegicus mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds	0	NO HITS FOUND	-	1.315	1.09	1.465	1.75
H1.b3	R.rattus mRNA for alpha-actin cardiac protein	0	similar to alpha 2 actin [Bos taurus]	1E-18	1.16	0.70	1.07	0.44
H1.i3	Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I mRNA, partial cds; and tRNA-Ser gene, complete sequence; mitochondrial genes for mitochondrial products	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	4E-78	1.33	0.55	1.335	0.85
H1.j1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene,	0	NADH dehydrogenase subunit 4 [Rattus norvegicus]	2E-37	0.83	0.62	0.345	1.2

H2.a2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	NO HITS FOUND	-	0.95	0.89	1.135	1.13
H2.c1	Rattus norvegicus similar to Retrovirus-related POL polyprotein (Endonuclease) (LOC295110), mRNA	5E-53	NO HITS FOUND	-	0.395	0.51	0.670	0.75
H2.c2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	1E-22	NO HITS FOUND	-	0.87	1.05	0.9	1.11
H2.g2	Rattus norvegicus eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5) (Eif5), mRNA	0	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	2E-28	1.265	2.36	NA	1.09
H2.g3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	9E-80	1.365	1.15	1.45	1.35
H2.h1	Rattus norvegicus troponin 1, type 3 (Tnni3), mRNA	0	troponin I, cardiac [Mus musculus]	7E-35	0.955	0.89	0.97	1.21
H2.i1	Rattus norvegicus myosin heavy chain, polypeptide 6 (Myh6), mRNA	0	Myosin heavy chain, cardiac muscle alpha isoform (MyHC-alpha)	2.E-05	0.96	0.56	0.97	1.21
H3.a1	Rattus norvegicus mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds	0	cytochrome b [Rattus norvegicus]	3E-30	0.695	0.69	1.225	1.04
H3.d2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	0	cytochrome oxidase subunit 1 [Mus musculus]	1E-37	1.42	0.98	1.44	1.23
H3.e2	Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome	3E-29	NO HITS FOUND	-	1.03	0.56	0.915	0.94
H3.g2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	0	unnamed protein product [Mus musculus]	9.E-06	1.015	0.97	0.83	1.27
H3.h3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	2E-64	1.05	1.13	1.15	1.17
H3.k1	Rattus norvegicus myosin heavy chain, polypeptide 7 (Myh7), mRNA	0	myosin heavy chain slow [Bos taurus]	2E-35	1.025	0.70	0.57	1.58

H4.a1	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene	1E-78	cytochrome oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	5E-23	1.455	1.34	1.62	1.88
H4.a2	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit I (COXI) gene, complete cds; tRNA-Ser and tRNA-Asp genes, complete sequence; cytochrome oxidase subunit II (COXII) gene	0	cytochrome c oxidase subunit I [Oryctolagus cuniculus]	1E-29	1.13	1.43	1.49	1.57
H4.c3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	2E-76	1.06	1.58	1.315	1.36
H4.f1	Rattus norvegicus ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide (Atp5b), mRNA	7E-80	ATP synthase beta chain, mitochondrial	8E-16	1.21	1.47	1.55	1.78
H4.f2	Rattus norvegicus complete mitochondrial genome, wild-caught animal (Copenhagen, Denmark)	1E-69	cytochrome oxidase subunit I [Picolides mixtus]	2E-19	1.48	1.40	1.41	1.73
H4.g3	Rattus norvegicus 18 BAC CH230-71N8 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	1.6	gene_id:F1D9.26~unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2E-11	1.51	1.18	1.420	1.38
H4.h1	Rattus norvegicus NADH ubiquinone oxidoreductase subunit (IP13) gene, complete cds	0	similar to NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) complex I 13K-A chain precursor - rat [Mus musculus]	4E-38	1.575	1.14	1.495	1.92
H4.h3	Rattus norvegicus mitochondrial genome	0	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	1E-75	1.135	1.59	1.345	1.4

H4.i2	Rat mitochondrial NADH-dehydrogenase (ND1) gene, complete cds	0	NADH dehydrogenase subunit 1 [Rattus norvegicus]	1E-43	1.165	1.06	1.21	1.45
-------	--	---	---	-------	-------	------	------	------

APÊNDICE B

Endereço no rearranjo	First hit (Blastn)	E-value	First hit (Blastx)	E-value	48h
A3.i10	Rattus norvegicus apoptosis repressor with CARD (ARC), mRNA	1.9	cytochrome c oxidase subunit I [Rattus norvegicus]	6,00E-10	4.92
H2.c11	Rattus norvegicus apoptosis repressor with CARD (ARC), mRNA	2e-08	similar to hypothetical protein MGC2628 [Homo sapiens] [Mus musculus]	7,5	1.95
A4.e1	Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6	2e-51	ATPase synthase subunit 6 [Rattus norvegicus]	1,00E-06	3.25
H3.c1	Rattus Norvegicus Strain CH230-62B6 BAC, BN/SsNHsd/MCW	1.6	ENSANGP0000001069 9 [Anopheles gambiae]	4,6	1.63
C4.c1	Rattus norvegicus 2 BAC CH230-103N18	1e-04	COG4133: ABC-type transport system involved in cytochrome c biogenesis, ATPase component [Haemophilus somnus 129PT]	7,6	3.17
D2.i10	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence;	4e-04	cytochrome c oxidase subunit I [Gambusia affinis]	0,18	1.37
B4.j10	Rattus norvegicus tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, and tRNA-Tyr genes, complete sequence;	1e-65	cytochrome c oxidase subunit I [Odobenus rosmarus rosmarus]	1,00E-06	4.61
H1.c1	Rattus norvegicus similar to actin, alpha, cardiac	3e-05	similar to actin gamma, cytoskeletal - rat [Mus musculus]	6,00E-08	1.73
A2.c1	Rattus norvegicus similar to LAF-4 protein (Lymphoid nuclear protein related to AF4) (LOC363220), mRNA	5.9	similar to transmembrane receptor [Oikopleura dioica]	6,7	3.68