

Avaliação da hiperexpressão de MEF2C na desdiferenciação de miotubos

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)

1. INTRODUÇÃO

A Desdiferenciação é um processo celular, frequentemente observados em formas de vida mais basais, tais como peixes, anfíbios e alguns invertebrados, no qual uma célula parcial ou terminalmente diferenciada reverte para estágios iniciais do desenvolvimento, usualmente como parte de um processo de regeneração. No entanto são descritos que células de mamíferos também podem ser induzidas à desdiferenciação. Miócitos esqueléticos diferenciados (miotubos C2C12) podem ser desdiferenciados em mioblastos ou células com propriedades de pluripotência a partir de estímulos diversos como: tratamento com moléculas orgânicas (Rosania et al., 2000); tratamento com fatores de crescimento (Chen et al., 2005); pela hiperexpressão de fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular (Meech et al., 2010); ou silenciamento de proteínas relacionadas à diferenciação miogênica (Mastroiannopoulo, 2012). Em todos os casos, é observada clivagem dos múltiplos núcleos dos miotubos em células mononucleadas, reentrada no ciclo celular e capacidade de rediferenciação. Estudos em nosso laboratório demonstram que a hiperexpressão da MEF2C (*Myocyte Enhancer Factor 2*) em miócitos cardíacos de ratos neonatos resulta na perda de proteínas sarcoméricas e no aumento de expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular (Cardoso AC., 2012), características também observadas em outros estudos que reportam desdiferenciação de miócitos adultos (Zhang et al., 2010). A proteína MEF2C é um fator de transcrição envolvida na diferenciação miogênica e na manutenção da integridade estrutural do músculo esquelético adulto, principalmente através da regulação da expressão de diversos genes sarcoméricos. Portanto, o objetivo deste projeto é investigar os efeitos da hiperexpressão da MEF2C na desdiferenciação de miotubos C2C12. Assim, miotubos esqueléticos tratados com partículas adenovirais para MEF2C serão analisados fenotipicamente por microscopia de fluorescência e molecularmente pela expressão proteica e gênica de proteínas sarcoméricas, do ciclo celular e relacionadas à diferenciação e pluripotência celular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da hiperexpressão da MEF2C na desdiferenciação de miotubos.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a expressão da MEF2C durante a diferenciação miogênica.
- Investigar o efeito da hiperexpressão da MEF2C em miotubos na expressão gênica e proteica de marcadores sarcoméricos, de proliferação e de diferenciação.
- Investigar o efeito da hiperexpressão da MEF2C na clivagem de miotubos através de análise por microscopia confocal e na aquisição de características de pluripotência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

Mioblastos C2C12 serão mantidas em cultura contendo meio de crescimento (DMEM, 10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina) em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, até atingirem 80% da confluência. Após esse período, o meio de crescimento será diariamente substituído por meio de diferenciação (DMEM, 2% HS e 1% penicilina-estreptomicina) durante 5 dias e realizado o tratamento com partículas adenovirais.

3.3. Partículas Adenovirais

No presente estudo serão utilizadas partículas adenovirais de MEF2C (Ad-MEF2C) e do controle β-Galactosidade (Ad-β-Gal) cedidas gentilmente pelo Dr. Jeffery Molkenin (*University of Cincinnati*) e utilizado conforme descrito em (Xu et al., 2006).

3.4. Análise da expressão de transcritos por PCR em tempo real

O PCR em tempo real (qRT-PCR) será realizada em um sistema MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA), utilizando sistema SYBR green. Cada qRT-PCR (volume final de 12 µl) contém 30 ng de RNA transcrito (cDNA), 400 nM de cada primer e 6 µl de *SYBR Green PCR Master Mix 2X* (Invitrogen).

3.5. Western Blotting

As amostras de proteínas normalizadas serão submetidas à eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD miniature slab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose será realizada por 90 min a 120V

em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A membrana será incubada com o anticorpo específica para diferentes proteínas de interesse, como por exemplo, MEF2C, ciclina, actina, miogenina etc.

3.4. Microscopia de Imunofluorescência

Células C2C12 em cultura serão fixadas em formaldeído 3,7% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, submetido à reação de imunofluorescência. A análise da morfologia celular será realizada utilizando a marcação com faloidina conjugada à rodamina (anti-actina) e DAPI (marcação nuclear). As imagens serão obtidas utilizando-se microscópio Confocal Invertido LSM780 NLO (Carl Zeiss AG, Germany).

4. INFORMAÇÕES RELEVANTES

Este projeto proporcionará ao aluno de graduação um contato direto com a atividade de pesquisa e métodos científicos. O aluno de iniciação científica estará em contato direto com pós-doutorando que auxiliará na execução deste projeto de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cardoso, A.C. Regulação do Fator de Transcrição MEF2C pela Quinase de Adesão Focal FAK: Implicações no controle da homeostase de cardiomiócitos. 2012. 223 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, universidade Estadual de Campinas, 2012.

Chen, X. et al. Dedifferentiation of Adult Human Myoblasts Induced by Ciliary Neurotrophic Factor In Vitro. *Mol Biol Cell*. 16, 3140-51 (2005).

Mastroiannopoulos, N.P. et al. Down-regulation of myogenin can reverse terminal muscle cell differentiation. *PLoS One*. 7, e29896 (2012).

Meech, R. et al. The Homeobox Transcription Factor Barx2 Regulates Plasticity of Young Primary Myofibers. *PLoS One*. 5, e11612 (2010).

Rosania, G.R. et al. Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects. *Nat Biotechnol*. 18, 304-8 (2000).

Zhang Y, et al. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS One*. 2010; 5(9):e12559.