

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Centro de Biotecnologia da UFRGS

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

**ATUAÇÃO DE LIPÍDEOS BIOATIVOS E ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO NA DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA**

Joice de Faria Poloni

**Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular (PPGBCM) da
UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Biologia Celular e Molecular**

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

Porto Alegre

Outubro de 2014

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; outorga no. 301149/2012-7)

Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT de Processos Redox em Biomedicina- REDOXOMA; outorga no. 573530/2008-4)

Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul FAPERGS (PRONEM outorga no. 11/2072-2)

Programa Binacional de Terapia Celular – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROBITEC-CAPES; outorga no. 004/12).

Instituição de origem

Laboratório de Radiobiologia Molecular, sala 219

Centro de Biotecnologia da UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*“A verdadeira viagem de descoberta não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.”*

-Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e por sempre estarem ao meu lado nos momentos de dificuldade. Palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão a vocês.

Ao Bruno, por se fazer presente na minha vida, compreender minhas frustrações e andar ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, sempre me incentivando a ser uma pessoa melhor.

Ao Dr. Diego Bonatto pela oportunidade de desenvolver este trabalho, acreditando no meu potencial e pela sua generosidade em compartilhar conhecimentos. Serei eternamente grata por esses ensinamentos que me acompanharão sempre.

Ao Henrique Chapola por me acompanhar neste período, sempre receptivo e disposto a dar o melhor de si em cada momento.

Aos meus queridos colegas de laboratório pela ajuda e apoio presente em todos os momentos. Saibam que a presença de vocês tornou esta trajetória muito mais alegre.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está dividida em uma introdução geral, três capítulos, discussão geral e conclusões.

A introdução aborda uma revisão sobre o desenvolvimento e morfogênese cardíaca, além dos principais aspectos moleculares e celulares que ocorrem durante a formação do coração. Posteriormente, a introdução aborda brevemente alguns conceitos de biologia de sistemas e lipídeos bioativos, que serão melhor discutidos nos capítulos 1 e 2, respectivamente.

O capítulo 1 consiste de um capítulo referente à biologia de sistemas pertencente ao *ebook* “Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular”, publicado em [<http://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>] e organizado pelo Prof. Dr. Hugo Verli (Centro de Biotecnologia da UFRGS, UFRGS). Neste capítulo, foram revisados os principais temas empregados na biologia de sistemas, como modularização, análises de ontologia gênica e centralidades, que serão utilizados nos capítulos posteriores.

O capítulo 2 apresenta uma revisão publicada na revista *Biology of the Cell*, que foca na relação entre estresse oxidativo e esfingolipídeos, e como esta relação poderia impactar no desenvolvimento e doenças cardíacas.

O capítulo 3 também é apresentado na forma de artigo e está submetido para a revista *The Journal of Biological Chemistry*. Neste capítulo é apresentada uma análise de quimio-biologia de sistemas que avalia o impacto de lipídeos bioativos durante o desenvolvimento cardíaco. Neste trabalho são utilizados dados transcritômicos provenientes de análises de microarranjo e RNA-seq de células tronco embrionárias de murino submetidos à diferenciação cardíaca, onde buscou-se investigar os processos biológicos que são influenciados pela atuação dos lipídeos bioativos.

Os capítulos são seguidos de uma discussão geral, com a inclusão de novos dados, e de uma conclusão sobre a atuação dos lipídeos bioativos durante o desenvolvimento cardíaco, conforme resultados observados nesta dissertação de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Desenvolvimento cardíaco	16
1.1.1 Morfogênese cardíaca	16
1.1.2 Aspectos moleculares e celulares da cardiogênese	21
1.3 Lipídeos bioativos	28
1.3.1 Esfingolipídeos	29
1.3.2 Glicerofosfolipídeos	31
1.3 Biologia de sistemas	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.1.1 Objetivos específicos	35
3 RESULTADOS	36
Capítulo I	36
Capítulo II	68
Capítulo III	84
4 DISCUSSÃO	107
4.1 Metabolismo energético e estresse oxidativo	107
4.2 Estímulo e metabolismo de lipídeos bioativos durante a cardiogênese	108
4.3 Resposta mediada por Ca^{+2}	110
4.4 Remodelagem e morfogênese durante o desenvolvimento cardíaco	111
4.4.1 Proteínas associadas à MEC	111
4.4.2 Proteínas associadas à inflamação	113
4.4.3 Apoptose	114
4.5 Relação entre lipídeos bioativos e fatores de crescimento	115

5	CONCLUSÕES GERAIS	117
6	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	118
7	REFERÊNCIAS	119
8	CURRICULUM VITAE	131

LISTA DE ABREVIATURAS

α MHC	cadeia pesada de miosina α
β MHC	cadeia pesada de miosina β
α -SMA	actina de músculo liso α
AA	arco aórtico
Acv	activina
AD	átrio direito
AE	átrio esquerdo
Ank1	anquirina
Anp	peptídeo natriurético atrial
Ao	aorta
ATP	adenosina trifosfato
Bcl2l1	<i>Bcl2-like</i>
Bid	domínio agonista de morte de interação com BH3
Bmp, -2, -4	proteínas morfogenéticas ósseas, -2, -4
Ca	caudal
Calm1	calmodulina 1
Casp8	caspase 8
CAV	canal atrioventricular
Cav1	caveolina
Cdc42	proteína de ligação à GTP
Cds1	CDP-diacilglicerol sintase
CE	coxim endocárdico
CEAV	coxim endocárdico do canal atrioventricular
CEDCT	coxim endocárdico distal do conotronco
CEPCT	coxim endocárdico proximal do conotronco
Cer	ceramida
Cox5b	citocromo c oxidase subunidade Vb

Cox6b2	citocromo c oxidase subunidade VIb polipeptídeo 2
CM	cardiomiócitos
CP	precursores cardíacos
Cr	cranial
CT	conotronco
CTE	células-tronco embrionárias
CTM	células-tronco mesenquimais
Cxcl12	quimiocina ligante 12
Cxcr4, -7	quimiocina 4, -7
Cyr61	proteína rica em cisteína 61
DAG	diacilglicerol
Dgk	diacilglicerol cinase
Do	dorsal
E	dia embrionário
Egf	fator de crescimento epidermal
Egfr	receptor de fator de crescimento epidermal
ErbB	receptor tirosina cinase
Erk1, -2	proteína cinase ativada por mitógeno 1, -2
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fak	proteína tirosina cinase 2
Fas	receptor de morte da superfície celular
Fgf, -10	fator de crescimento de fibroblastos, -10
Flk	receptor do fator de crescimento vascular endotelial
Fn1	fibronectina
Gata4, -5, 6	fator de transcrição GATA-4, -5, -6
GPX1, -3, -8	glutathiona peroxidase 1, -3, -8
Hand1, -2	proteína expressa em derivados da crista neural e coração 1, -2
Has2	ácido hialurônico sintase 2
Igf1	fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL-1, -6	interleucinas 1, -6
Isl1	fator de transcrição da família homeodomínio LIM
Jak2	janus cinase 2
Lama	laminina
LPA	ácido lisofosfatídico
Lpar	receptor de ácido lisofosfatídico
Mapk	proteína cinase ativada por mitógeno
MEC	matriz extracelular
Mef2, -c	fator de aumento de miócito 2, -C
Mesp1, -2	mesoderma posterior homólogo 1, -2
MMP	metaloproteinases de matriz
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
Myl2	miosina regulatória de cadeia leve 2V
Ndufaf1	NADH desidrogenase complexo I, fator de montagem 1
Ndufb3	NADH desidrogenase subcomplexo β 1, subunidade 3
Ndufb5	NADH desidrogenase 1 subcomplexo β 1, subunidade 5
Ndufb10	NADH desidrogenase 1 subcomplexo β 1, subunidade 10
Ndufc2	NADH desidrogenase 1 subcomplexo 1, subunidade 2
Ndufs1	NADH-coenzima Q redutase 1
Ndufs7	NADH-coenzima Q redutase 7
Ndufv1	NADH desidrogenase flavoproteína 1
Ndufv2	NADH desidrogenase flavoproteína 2
Nfatc	fator nuclear de células T ativadas
Nkx2.5	NK2 homeobox 5
Nodal	fator de diferenciação de crescimento
Nox, -4	NADPH oxidases, -4
PA	ácido fosfatídico
Pak	proteína ativadora de p21
PC	fosfatidilcolina

Pdgf	fator de crescimento derivado de plaqueta
Pdgfβr	receptor do tipo β para fator de crescimento derivado de plaquetas
Pdhh	piruvato desidrogenase β
Pka	proteína cinase A
Pkc, -ζ	proteína cinase C, - ζ
PLC	fosfolipase C
PLD, -2	fosfolipase D, -2
Pp1a1, -2	proteína fosfatase α 1, -2
Ppap	ácido fosfatídico
Ppap2b	fosfatase de ácido fosfatídico tipo 2B
Pparg	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
Ppp3ca	subunidade catalítica de calcineurina
Prkar1a	proteína cinase dependente do AMP cíclico cadeia regulatória α
Prtf	cavina
Ptgs2	prostaglandina endoperóxido sintase
Rac1	proteína de ligação à GTP
Raf-1	proteína cinase serina/treonina
S1P	esfingosina-1-fosfato
SAP	septo atrial primário
Sdhd	complexo succinato desidrogenase subunidade D
Serpina1	inibidor do ativador de plasminogênio-1
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
SIV	septo interventricular
SM	esfingomielinase
Smad	membro da família SMAD
Smpd1	esfingomielina fosfodiesterase 1, ácida
Sod3	superóxido dismutase 3
SPC	esfingosilfosforilcolina
Sph	esfingosina

Sphk1	esfingosina cinase
Src	proteína tirosina cinase SRC-1
Srf	fator de resposta do soro
Stat3	transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
SVP	septo ventricular primário
T	<i>T-box brachyury</i>
Tbx2, -5, -20	fator de transcrição <i>T-box</i> 2, -5, -20
Tgf- β , -2	fator de transformação do crescimento β , -2
Tnc	tenacina
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TP	tronco pulmonar
TS	trato de saída
VD	ventrículo direito
Ve	ventral
VE	ventrículo esquerdo
Vegfa	fator de crescimento vascular endotelial A
Vim	vimentina
Wnt	<i>wingless</i>

RESUMO

Uma complexa maquinaria molecular é responsável pelo desenvolvimento cardíaco, e qualquer alteração nesta maquinaria pode ocasionar cardiopatias congênitas. Nesse sentido, lipídeos bioativos e espécies reativas de oxigênio (ERO) podem apresentar importante papel durante a regulação da morfogênese cardíaca. Os lipídeos bioativos apresentam papel na sinalização celular, sendo relacionados à pluripotência e diferenciação. Adicionalmente, ERO são essenciais para o desenvolvimento cardíaco, contudo, a excessiva produção de ERO está diretamente associada à malformação da estrutura do coração. Nesse sentido, ERO podem promover o acúmulo de ceramida e reduzir a síntese de esfingosina-1-fosfato, gerando alterações na concentração de esfingolipídeos.

Desta forma, esta dissertação de mestrado revisa a relação entre lipídeos bioativos e ERO, descrevendo o impacto desta relação no desenvolvimento e malformações da estrutura cardíaca. Posteriormente, são utilizados dados transcritômicos e ferramentas de quimio-biologia de sistemas para avaliar as funções potenciais de lipídeos bioativos durante o desenvolvimento cardíaco de *Mus musculus*. Os dados obtidos indicam que os lipídeos bioativos estão relacionados com a morfogênese cardíaca, associados à expressão gênica, rearranjo do citoesqueleto, motilidade e adesão celular. Esses lipídios podem participar da resposta celular a estímulos externos, alterando a dinâmica da membrana plasmática e influenciando a morfogênese cardíaca através da remodelagem da matriz extracelular. Adicionalmente, esses lipídios podem mediar o estímulo de secreção de citocinas, como IL-6, além da regulação da mobilização de Ca^{2+} e da atividade de fatores de crescimento.

ABSTRACT

A complex molecular machinery is responsible for the control of cardiac development, where any disruption of this system leads to congenital cardiopathies. In this sense, bioactive lipids and reactive oxygen species (ROS) show important roles in regulating cardiac morphogenesis. Bioactive lipids are observed in cellular signaling processes, and have been reported to be necessary for cellular pluripotency and differentiation. Additionally, redox homeostasis is crucial during embryonic development, since excessive ROS production is directly related to malformations of cardiac structures. In this sense, ROS can promote ceramide accumulation and reduce sphingosine-1-phosphate synthesis, generating an imbalance in the sphingolipid concentration.

Thus, this master's degree dissertation reviews the relationship between bioactive lipids and ROS, describing the impact of this relationship during cardiac structure development and malformations. Henceforth, transcriptomic data and systems chemo-biology tools were employed to evaluate the potential role of bioactive lipids during cardiac development in *Mus musculus*. Our analysis indicated that bioactive lipids are related to cardiac morphogenesis, gene expression, cytoskeletal rearrangement, cell adhesion and motility. Bioactive lipids can participate in the cellular response to external stimuli, altering the plasma membrane dynamics and influencing cardiac morphogenesis through the remodeling of the extracellular matrix. Additionally, these lipids may mediate the stimulation of cytokines release, such as IL-6, regulate the Ca^{2+} mobilization and the activity of growth factors.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento cardíaco

Durante o desenvolvimento embrionário, o coração é o primeiro órgão a ser formado, de forma a suprir a demanda de nutrientes e oxigênio requeridas pelo embrião em desenvolvimento (Van Vliet et al., 2012). O coração mamífero maduro apresenta uma estrutura formada de três camadas teciduais (endocárdio, miocárdio e epicárdio), estrutura esta que pode ser dividida em quatro câmaras: átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo (Rana et al., 2013). Além disso, apresenta valvas e septos que separam a circulação pulmonar da circulação sistêmica, garantindo o correto fluxo sanguíneo (Rana et al., 2013). Para a formação de todas essas estruturas, o desenvolvimento cardíaco requer vários tipos celulares e diversos passos de diferenciação e processos morfogenéticos. Esses passos são regulados em múltiplos níveis por uma série de componentes moleculares e celulares interdependentes entre si, que serão abordados a seguir para a melhor compreensão desta dissertação, usando como modelo o organismo murino.

1.1.1 Morfogênese cardíaca

No início do desenvolvimento de camundongos, o embrião consiste de um disco composto pelo epiblasto e hipoblasto (Figura 1) (Van Vliet et al., 2012). O epiblasto contém precursores de todos os tecidos antes do processo de gastrulação, inclusive precursores cardíacos na região posterior lateral (Figura 1) (Van Vliet et al., 2012). A gastrulação é marcada pelo desenvolvimento da linha primitiva na região média da extremidade posterior do epiblasto e a formação das três camadas germinativas

(ectoderma, mesoderma e endoderma) (Van Vliet et al., 2012). Adicionalmente, as células do epiblasto se submetem à transição endotélio-mesenquimal na linha primitiva, resultando na aquisição de comportamento migratório e ingresso através da linha primitiva para a formação do mesoderma e endoderma definitivo, que é essencial para a coordenação da migração (Van Vliet et al., 2012; Williams et al., 2013). As células precursoras cardíacas originadas da placa lateral do mesoderma migram para a porção anterior do embrião em torno do dia embrionário (E) 6.5 e formam dois campos bilaterais (Figura 1) (Rana et al., 2013). Por sua vez, as células pré-cardiogênicas mesodérmicas, derivadas dos dois campos cardíacos, convergem na região central do embrião, formando o crescente cardíaco em E7.5 (Figura 1) (Brade et al., 2013; Srivastava, 2006).

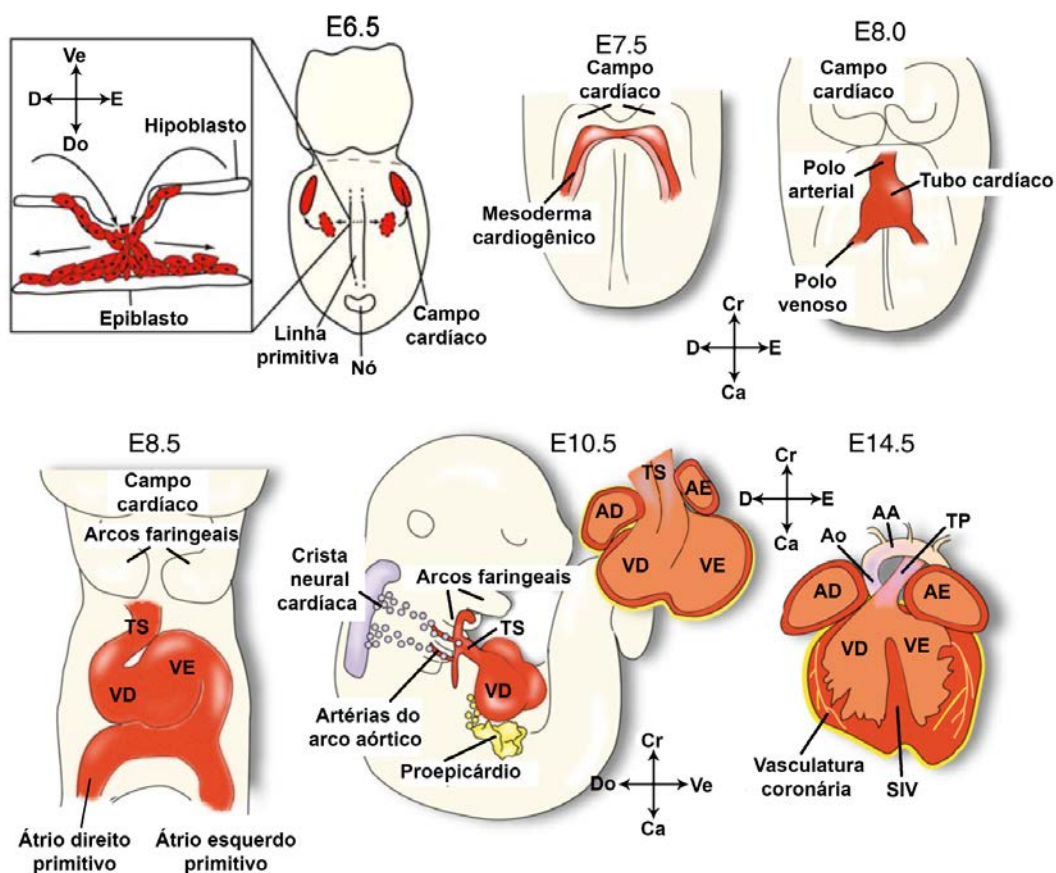


Figura 1. Representação da morfogênese cardíaca em murinos de acordo com a progressão temporal. Estão representadas também as três populações de células

(mesoderma cardíaco, células da crista neural e células proepicardiais) que colaboram para o desenvolvimento do coração. Abreviações: AA, arco aórtico; AD, átrio direito; AE, átrio esquerdo; Ao, aorta; Ca, caudal; Cr, cranial; D, direito; Do, dorsal; E, esquerdo; SIV, septo interventricular; TP, tronco pulmonar; TS, trato de saída; VD, ventrículo direito; Ve, ventral; VE, ventrículo esquerdo. Figura modificada de (Laugwitz et al., 2008) e (Brade et al., 2013).

Posteriormente, em E8 há a formação de um tubo linear cardíaco derivado das células do campo cardíaco primário do crescente cardíaco, cuja parede dupla consiste de uma camada endocardial interior e uma camada miocárdial exterior (Figura 1) (Brade et al., 2013). Adicionalmente, o espaço entre as camadas é preenchido por matriz extracelular (MEC) chamada de geleia cardíaca, secretada pelo miocárdio (Ray and Niswander, 2012; Srivastava, 2006). Este coração primitivo já apresenta contrações ritmadas que bombeiam o sangue unidirecionalmente do trato de entrada na região posterior para o trato de saída na região anterior, mesmo na ausência de estruturas funcionais, como átrio, ventrículo, valvas, septos e circulação coronária (Norden and Kispert, 2012). No entanto, a contratilidade celular e o fluxo sanguíneo que passa através do tubo linear geram uma força mecânica que influencia diretamente nos processos da morfogênese cardíaca (Jacot et al., 2011; Sheehy et al., 2012).

Em E8.5 o tubo linear se submete a alongação, seguida por um arco em direção à direita, e recruta células do segundo campo cardíaco que são adicionadas ao pólo venoso e arterial (Figura 1) (Brade et al., 2013). Ocorre, então, o reposicionamento do trato de entrada e saída, bem como a separação da estrutura cardíaca em quatro câmaras diferentes (Evans et al., 2010). O desenvolvimento destas partições envolve a formação do canal atrioventricular (CAV), que proporciona um limite entre o átrio e o ventrículo, e também a formação dos coxins endocárdicos (CE) no trato de saída e na região

atrioventricular, que são estruturas precursoras das valvas cardíacas (aórtica, pulmonar, mitral e tricúspide) (Evans et al., 2010).

Entre os dias E9.5 e 10.5, os lados opostos do CE começam a crescer no CAV e trato de saída (Figura 2) (Ray and Niswander, 2012). O CE cresce por meio da proliferação de células endoteliais que se submetem à transição endotélio-mesenquimal e migram em direção a geleia cardíaca progressivamente até que as extremidades entrem em contato e fusionem (Figura 2) (Ray and Niswander, 2012). Desta forma, o CE cresce na região CAV, separando o átrio do ventrículo (Figura 2) (Ray and Niswander, 2012). Simultaneamente, são formados o septo ventricular primário (inferior) e o septo atrial primário (superior) que se expandem pelo crescimento do miocárdio e fusionam à junção atrioventricular, promovendo a formação das quatro câmaras cardíacas entre E12.5 e E13.5 (Figura 2) (Ray and Niswander, 2012).

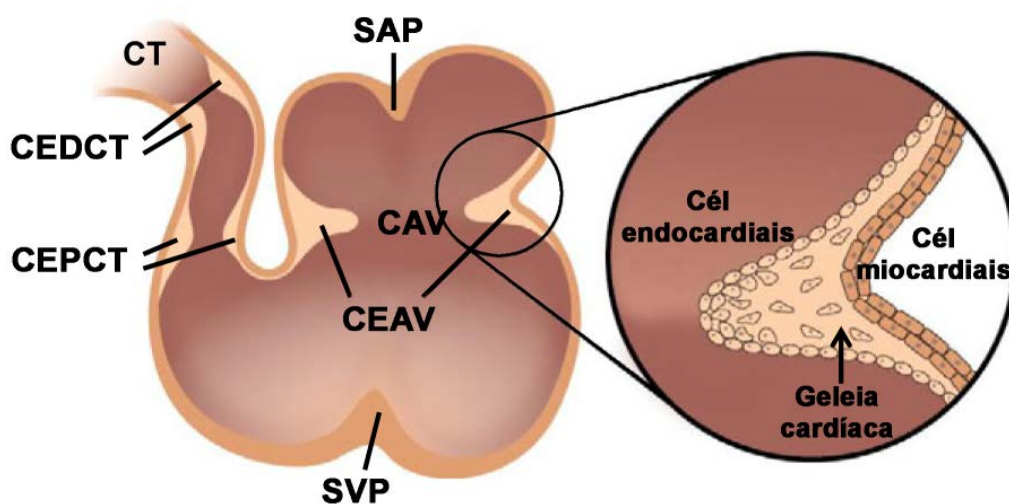


Figura 2. Representação do crescimento e fusão dos coxins endocárdicos (CE) na região do conotronco e atrioventricular, bem como dos septos primários atrial e ventricular. Em destaque, células endocárdicas que proliferam e se submetem à transição endotélio-mesenquimal, seguida pela migração dessas células para a geleia cardíaca, produzida pelas células miocárdicas. Abreviações: CAV, canal atrioventricular; CEAV, coxim endocárdico do canal atrioventricular; CT, conotronco; CEDCT, coxim

endocárdico distal do conotronco; CEPCT, coxim endocárdico proximal do conotronco; SAP, septo atrial primário; SVP, septo ventricular primário. Figura modificada de (Ray and Niswander, 2012).

Em E11.5 ocorre a formação das valvas cardíacas primordiais que, por sua vez, são derivadas do CE e correspondem a folhetos e cúspides (Combs and Yutzey, 2009). As valvas primordiais crescem e se alongam com o aumento da deposição de MEC e proliferação de células endoteliais, além de sofrerem remodelagem para o desempenho da sua função (Combs and Yutzey, 2009; Schroeder et al., 2003). Adicionalmente, diferentes populações celulares também contribuem para a formação do coração. Por exemplo, as células da crista neural migram para o trato de saída através do terceiro arco faríngeo, entre E9.5 a 12.5 (Figura 1), contribuindo para a formação das valvas cardíacas e inervação parassimpática (Brade et al., 2013; Ray and Niswander, 2012; Snider et al., 2007). No trato de saída, a septação requer células da crista neural, onde a fusão do CE conotroncal separa a região distal em tronco aórtico e pulmonar, enquanto que a região proximal é dividida em saída ventricular esquerda e direita (Lin et al., 2012). Adicionalmente, entre E9.5 e 11.5, populações de células do proepicárdio migram em direção à estrutura cardíaca para compor a camada mais externa, o epicárdio (Figura 1) (Brade et al., 2013). As células derivadas do epicárdio podem diferenciar em fibroblastos cardíacos, células do músculo liso, células endoteliais e cardiomiócitos, contribuindo assim para a maturação do coração e formação da vasculatura coronária (Brade et al., 2013).

1.1.2 Aspectos moleculares e celulares da cardiogênese

Durante o desenvolvimento embrionário, a determinação do mesoderma é regulada por diferentes proteínas, dentre eles o Tgf- β (fator de transformação do crescimento β), Nodal (fator de diferenciação de crescimento), Acv (activina), Bmp (proteínas morfogenéticas ósseas), Fgf (fator de crescimento de fibroblastos), Shh (*sonic hedgehog*) e Wnt (*wingless*) (Brade et al., 2013; Van Vliet et al., 2012). Essas moléculas atuam como sinalizadores extracelulares, promovendo a formação da região cardíaca (Brade et al., 2013; Van Vliet et al., 2012).

A sinalização proveniente de Wnt/ β -catenina é essencial para a expressão do fator de transcrição T (*T-box Brachyury*) e ingresso das células através da linha primitiva (Brade et al., 2013). Contudo, a especificação do mesoderma cardíaco requer a ativação da via não canônica da Wnt, por meio de Wnt5 e Wnt11, e inibição da via canônica (Brade et al., 2013; Ménard et al., 2004; Van Vliet et al., 2012). O endoderma anterior, que está subposicionado ao crescente cardíaco, contribui para a geração de um gradiente de morfógenos, como Bmp e inibidores da via canônica de Wnt, sendo essencial para a especificação de células progenitoras cardiovasculares primordiais e para coordenar o correto posicionamento do coração (Brade et al., 2013; Harvey, 2002; Van Vliet et al., 2012).

As células progenitoras T⁺ originam o mesoderma cardiogênico; contudo, podem apresentar destinos celulares distintos conforme a expressão de Flk (receptor do fator de crescimento vascular endotelial) (Figura 3) (Brade et al., 2013; Van Vliet et al., 2012). Assim, as células Flk⁺/T⁺ compõem uma população geradora de hemangioblastos, contribuindo para o desenvolvimento do sistema hematopoiético e vascular (Figura 3) (Brade et al., 2013). Por sua vez, as células Flk⁻/T⁺ podem,

posteriormente, expressar Flk+, originando às células miocárdias (Figura 3) (Brade et al., 2013).

Dentre os principais genes expressos em progenitores cardíacos estão os fatores de transcrição *Mesp1* e *Mesp2* (mesoderma posterior homólogo), essenciais para a transição endotélio-mesenquimal e migração dos precursores cardíacos pela linha primitiva (Figura 3) (Brade et al., 2013; Buckingham et al., 2005; Rana et al., 2013; Van Vliet et al., 2012).

Os campos cardíacos primários e secundários, derivados dos progenitores cardíacos, encontram-se em graus variados de diferenciação. Por exemplo, o campo cardíaco secundário apresenta células progenitoras não diferenciadas em estado proliferativo e expressa o gene *Isl1* (fator de transcrição da família homeodomínio LIM) dependente da sinalização desencadeada por Wnt, enquanto que o campo cardíaco primário fica mais exposto às citocinas das famílias Bmp e Fgf, diferenciando para cardiomiócitos e células de músculo liso (Brade et al., 2013). Desta forma, as populações do campo cardíaco primário e secundário apresentam diferenças entre a expressão dos principais marcadores, sendo encontrados no campo cardíaco primário *Tbx5* (fator de transcrição *T-box*) e *Hand1* (proteína expressa em derivados da crista neural e coração 1), enquanto que *Isl1*, *Hand2* e *Fgf10* são expressas no campo cardíaco secundário (Figura 3) (Brade et al., 2013; Cyganek et al., 2013; Van Vliet et al., 2012).

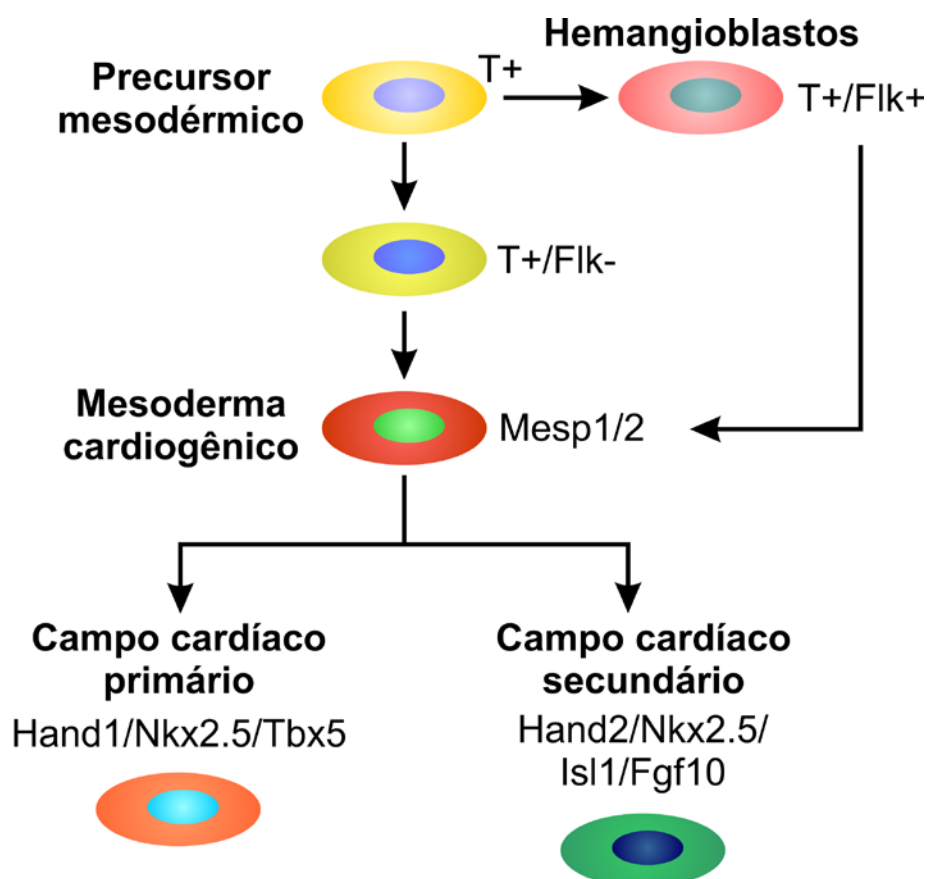


Figura 3. Modelo de hierarquia celular das células progenitoras cardíacas e alguns marcadores essenciais para a especificação da linhagem.

A regulação transcricional das células precursoras cardíacas é realizada por um conjunto de fatores de transcrição, composto principalmente pela proteína homeobox $Nkx2.5$, $Mef2c$ (fator de aumento de miócito), os fatores de transcrição do tipo dedos de zinco $Gata4$ a 6 , além de $Tbx5$ -20 e $Hand1$ -2 (Brade et al., 2013; Buckingham et al., 2005; Cyganek et al., 2013; Ménard et al., 2004). Essas moléculas regulam muitos alvos à jusante e promovem a expressão de genes que codificam para proteínas que atuam no estabelecimento do fenótipo cardíaco, como troponina I, T ou C, miosina, α -actinina e canais iônicos (Cyganek et al., 2013).

A transição endotélio-mesenquimal é necessária para o estabelecimento dos precursores cardíacos e para a formação do CE. $Tgf-\beta$ é a primeira molécula sinalizadora para o início transição endotélio-mesenquimal, sendo regulada por $Notch1$,

Bmp2 e Tbx2 (Lin et al., 2012). Bmp2 pode induzir a expressão de Has2 (ácido hialurônico sintase 2), que atua na síntese de hialurona, um componente da MEC do CE necessário para a transição endotélio-mesenquimal (Lin et al., 2012). Por sua vez, Bmp4 é expresso no CAV e no trato de saída, sendo essencial para a septação cardíaca (Lin et al., 2012). Tanto a sinalização de Bmp como a de Tgf- β são transduzidas pelas proteínas Smad (membro da família SMAD), regulando a expressão de genes-alvos necessários para a cardiogênese (Lin et al., 2012).

Outra via de sinalização que apresenta importante papel na formação de valvas é mediada por calcineurina/Nfatc (fator nuclear de células T ativadas) (Lin et al., 2012). A Nfatc miocárdial reprime a expressão do Vegfa (fator de crescimento vascular endotelial A), um inibidor da transição endotélio-mesenquimal (Lin et al., 2012). Além disso, a via de sinalização desencadeada por calcineurina/Nfatc no endocárdio está associada com a remodelagem e alongamento das valvas cardíacas, além de aumentar a expressão de troponina I (Lin et al., 2012).

Outro fator de transcrição, também regulado por calcineurina, é Mef2, o qual regula a expressão de genes associadas à função contrátil (Allen et al., 2005; Olson, 2006). Da mesma forma, Srf (fator de resposta do soro) também atua como fator de transcrição miogênico importante para a diferenciação e maturação cardíaca, expressando os genes que codificam para α -actina, α MHC e β MHC (cadeia pesada de myosina α e β) e Anp (peptídeo natriurético atrial) (Parlakian et al., 2004).

Adicionalmente, o coração é submetido a uma série de eventos orquestrados durante o desenvolvimento cardíaco, crescimento e maturação, que envolvem movimentos e transformações morfogênicas (Chen et al., 2005). O ambiente que circunda a célula sofre modificações e remodelagens ao longo do desenvolvimento e influencia diretamente no destino celular (Rozario and Desimone, 2010). As principais

células constituintes da estrutura cardíaca são cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais vasculares (Porter and Turner, 2009). Os cardiomiócitos dão volume ao miocárdio, representando em torno de 30% das células totais presentes no coração humano adulto (Porter and Turner, 2009). Os 70% restantes são compostos principalmente por fibroblastos cardíacos que atuam como reguladores da MEC (Porter and Turner, 2009).

Os fibroblastos cardíacos podem diferenciar para miofibroblastos e expressar genes que codificam para proteínas que atuam na contratilidade células, como α -SMA (actina de músculo liso α) (Porter and Turner, 2009). Adicionalmente, os miofibroblastos contribuem para a excitabilidade dos cardiomiócitos, além de responderem às contrações e ao estiramento mecânico (Porter and Turner, 2009). Os miofibroblastos, por sua vez, respondem a esses estímulos diminuindo a sua proliferação e estimulando a migração através da alteração de componentes da MEC, MMPs (metaloproteinases de matriz), secreção de citocinas, como TNF- α (fator de necrose tumoral α), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e Tgf- β , além de fatores de crescimento (Vegfa, por exemplo) e peptídeos vasoativos (angiotensina 2, endotelina 1, Anp e peptídeo natriurético cerebral) (Porter and Turner, 2009).

A MEC do coração embrionário é composta de glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas colagenosas e não-colagenosas que cercam e dão suporte às células precursoras em diferenciação (Bowers et al., 2010; Little and Rongish, 1995; Rozario and Desimone, 2010). No coração, a MEC atua na resposta a injúria e estresse fisiológico, além de facilitar sinais mecânicos, elétricos e químicos durante o desenvolvimento e homeostase celular (Bowers et al., 2010). No tubo cardíaco, a MEC encontrada entre as camadas miocárdias e endocárdias (chamada de geleia cardíaca) atua na manutenção estrutural do tubo, além de ser um fator crucial para a transição

endotélio-mesenquimal (Bowers et al., 2010). Adicionalmente, a função e o desenvolvimento das valvas cardíacas também estão associadas à organização e composição da MEC (Bowers et al., 2010).

Além disso, MEC pode limitar os movimentos celulares, além de controlar a distribuição dos gradientes de morfógenos no ambiente extracelular, regulando a liberação e a interação entre os fatores de crescimento e seus receptores (Rozario and Desimone, 2010). Essa regulação ocorre principalmente pela formação da matriz pericelular pela ligação covalente de glicosaminoglicanos (exceto hialurona) com proteínas, formando os proteoglicanos (Rozario and Desimone, 2010). O colágeno é uma glicoproteína extremamente abundante, cuja organização é variável nos tecidos, mas tem a principal função de permitir e limitar a extensibilidade de um tecido (Rozario and Desimone, 2010). No entanto, as glicoproteínas não-colagenosas como Fn1 (fibronectina), Lama (laminina) e Tnc (tenacina) atuam como receptores de integrina (Bowers et al., 2010). As integrinas são receptores transmembrana que mediam a comunicação entre a MEC, cardiomiócitos e fibroblastos (Bowers et al., 2010). Essa comunicação célula-célula e célula-MEC pode ocorrer de maneira bidirecional, onde o meio extracelular influencia a atividade celular e expressão gênica, da mesma forma que a célula afeta a expressão gênica e funcionalidade das proteínas receptoras e da MEC (Bowers et al., 2010).

A interação da MEC com integrinas está associada com a adesão e desprendimento da célula ao substrato. Nesse sentido, a célula pode migrar de regiões com menor concentração de MEC para regiões com maior concentração, uma vez que a força de adesão é maior nessas regiões (Rozario and Desimone, 2010). A migração é caracterizada em: extensão do lamelipódio, formação de novas adesões, contração celular e desprendimento da porção posterior da célula (Ridley, 2001). A extensão do

lamelipódio ocorre como uma ramificação da rede de filamentos celulares e envolve a polimerização da actina (Ridley, 2001). No lamelipódio se formam as novas adesões com o substrato, que incluem proteínas que interagem com a actina (talina, vinculina, α -actinina, zixina) e proteínas adaptadoras, como Src (proteína tirosina cinase SRC-1) e Fak (proteína tirosina cinase 2) (Huttenlocher and Horwitz, 2011). As integrinas realizam conexões com a actina ou filamentos intermediários do citoesqueleto nas regiões de adesão focal, requerendo para isso diferentes componentes, como por exemplo, talina, α -actinina e vinculina, e esta conexão gera a força de tração que é requerida para a migração celular (Huttenlocher and Horwitz, 2011). A adesão é regulada por Rho GTPases que induzem a polimerização de actina e contração de actomiosina (Huttenlocher and Horwitz, 2011). Por sua vez, a redução da atividade de Rho GTPases diminui a contractilidade da actomiosina e a capacidade adesiva da célula, favorecendo o desprendimento da célula com o substrato juntamente com a atividade de Src, Fak e Pak (proteína ativadora de p21) (Ridley, 2001).

Além de influenciar na migração celular, o citoesqueleto é essencial para a regulação da forma, função e homeostase (Sheehy et al., 2012). Adicionalmente, forças mecânicas são transmitidas ao citoesqueleto através da interface MEC-integrinas, que as converte em uma resposta bioquímica, modulando a atividade transcricional, ciclo celular e apoptose (Sheehy et al., 2012). Essas forças mecânicas podem ser geradas pelas propriedades físicas do microambiente local onde as células estão se diferenciando, bem como pela atividade contrátil dos cardiomiócitos durante a embriogênese.

Adicionalmente, a tensão mecânica e o estímulo elétrico que ocorre nos cardiomiócitos pode aumentar o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Santos et al., 2011). Atualmente, já é conhecido que reguladores da homeostase

redox podem influenciar na diferenciação e proliferação de cardiomiócitos (Santos et al., 2011). Um exemplo é a Nox (NADPH oxidases), amplamente expressa durante a cardiogênese (Santos et al., 2011). Já foi observado que Nox4 é crucial para a diferenciação de precursores cardíacos e que ERO pode mediar a ativação de Jak2 (janus cinase 2), Stat3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), Erk1/2 (proteína cinase ativada por mitógeno) e Mef2c (Santos et al., 2011). A influência da regulação redox no desenvolvimento cardíaco será melhor discutida no Capítulo 2.

1.3 Lipídeos bioativos

Os lipídeos são frequentemente considerados como moléculas presentes nas membranas celulares, cuja função envolve a manutenção da estabilidade da membrana e de proteínas que ficam embebidas de forma parcial ou integral na membrana celular (Bieberich, 2012). Contudo, desde a década de 1950 tem sido explorado o potencial de muitos lipídeos como moléculas sinalizadoras nas células, recebendo o nome de lipídeos bioativos (Hannun and Obeid, 2008).

O mecanismo de ação desses lipídeos bioativos é variado, influenciado de várias formas a sinalização celular. Dentre os principais mecanismos de atuação dos lipídeos bioativos está a sua interação direta com diferentes classes de proteínas (fosfatases, cinases, receptores, proteínas trocadoras de íons, entre outras); pela formação de *rafts* de membrana ou ainda pela interação com outros lipídeos, o que pode afetar a organização da membrana e de proteínas de membrana (Bieberich, 2012; Hannun and Obeid, 2008). Diversos lipídeos já foram descritos por influenciarem na sinalização celular, como esteroides, eicosanoides, esfingolipídeos e glicerolipídeos (Bieberich, 2012). Contudo,

para esta dissertação, serão abordados os esfingolipídeos e os glicerofosfolipídeos, cujas estruturas são apresentadas na Figura 4.

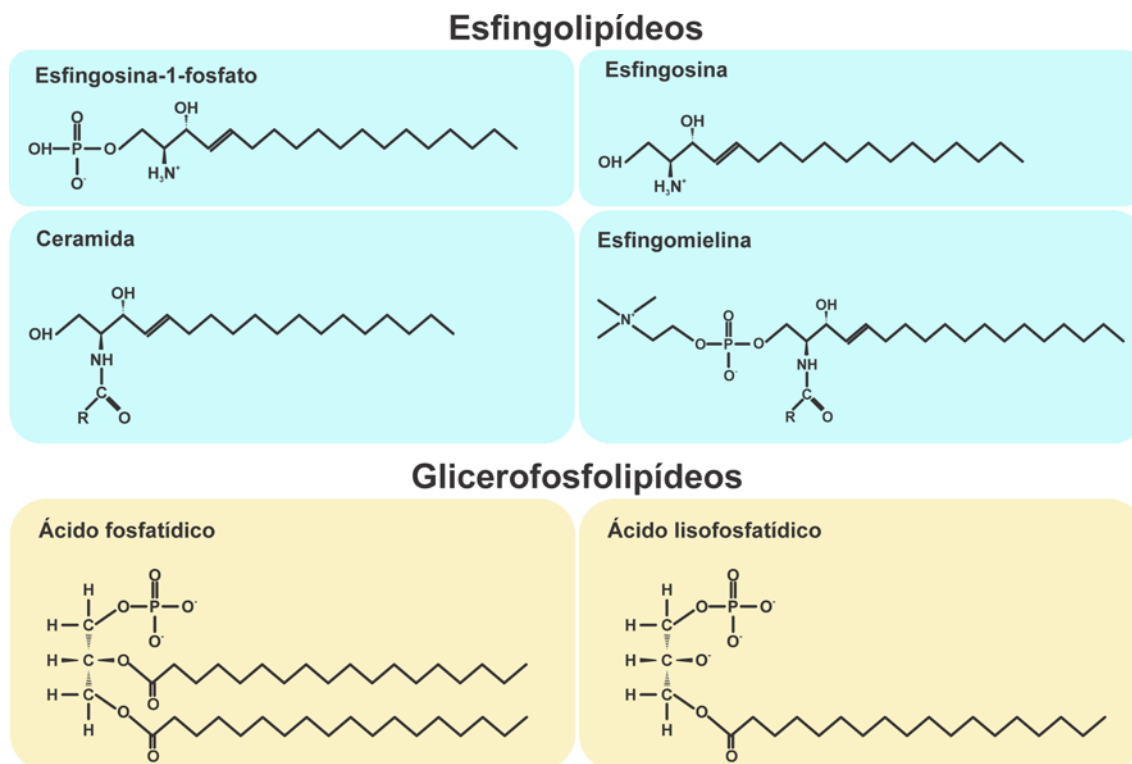


Figura 4. Estrutura dos principais esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos bioativos.

1.3.1 Esfingolipídeos

Os esfingolipídeos são moléculas lipídicas que apresentam uma base esfingóide, geralmente esfingosina (Sph) ou esfinganina (DhSph), onde diferentes combinações podem ser formadas, dando grande variabilidade à estrutura e função dos esfingolipídeos (Capítulo 2, Figura 1) (Futerman and Hannun, 2004). Adicionalmente, a biossíntese *de novo* dos esfingolipídeos inicia na face citosólica da membrana do retículo endoplasmático, gerando ceramida (Cer) que atua como molécula precursora para outros esfingolipídeos (Capítulo 2, Figura 2) (Fyrst and Saba, 2010).

Os principais esfingolípídeos são: (i) Sph e Cer, e seus derivados fosforilados, como esfingosina-1-fosfato (S1P) e ceramida-1-fosfato (C1P); (ii) a esfingomielina (SM), que possui uma cabeça polar de fosfocolina (PC) e (iii) esfingolípídeos complexos, como os glicosfingolípídeos (Capítulo 2, Figura 2) (Bieberich, 2012; Fyrst and Saba, 2010).

Os esfingolípídeos são moléculas bioativas que atuam na regulação de diferentes alvos à *jusante*, de forma dependente de sua concentração, onde múltiplas vias de regulação podem ser desencadeadas de acordo com o balanço dos níveis dos esfingolípídeos na célula (Bartke and Hannun, 2009). Adicionalmente, os esfingolípídeos estão presentes nos *rafts* lipídicos (Parton and del Pozo, 2013).

Cer já foi descrita por estar relacionada com a regulação do crescimento celular, diferenciação, proliferação e apoptose, regulando diferentes fosfatases e cinases, como Src, Erk, Pkc ζ (proteína cinase C ζ), PP1A e PP2A (proteína fosfatase α 1 e 2) (Bartke and Hannun, 2009; Czarny and Schnitzer, 2004). Adicionalmente, diferentes agentes podem promover o aumento da concentração de Cer pelo estímulo de SMases (esfingomielinases), como Tnf- α , agentes quimioterápicos (platina, paclitaxel e inibidores de histona desacetilases), estímulos mecânicos, radiação ionizante e ultravioleta (Czarny et al., 2003; Hanna et al., 2001; Hannun and Obeid, 2008). Por sua vez, Sph esta associada à parada do crescimento celular e apoptose (Spiegel and Milstien, 2003).

A síntese dos derivados fosforilados de Sph, como S1P, pode ser ativada por diferentes estímulos, como citocinas, hormônios esteroides, Egf (fator de crescimento epidermal), Vegfa e Pdgf (fator de crescimento derivado de plaqueta) (Takabe et al., 2008). A conversão de Sph para S1P ocorre pela ativação de Sphk1 (esfingosina cinase), cujo estímulo da atividade é dependente de fosforilação, promovendo sua

translocação para a membrana plasmática (Capítulo 2, Figura 2) (Takabe et al., 2008). Além disso, Sphk1 também pode ser ativada pela interação com proteínas e fosfolípídios acídicos (Takabe et al., 2008). S1P pode ser exportado para o ambiente extracelular e age como ligante de receptores na superfície celular ou através de diferentes alvos intracelulares (Capítulo 2, Figura 2) (Takabe et al., 2008). Atualmente, são descritos cinco receptores de S1P, pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G que, quando ativadas por S1P, desencadeiam distintas cascatas de sinalização intracelular (Means and Brown, 2009; Schwalm et al., 2013). A sinalização intracelular desencadeada por S1P também pode ocorrer de forma independente dos receptores de membrana e está envolvida com a sobrevivência e crescimento celular, além de regular a mobilização de cálcio (Hannun and Obeid, 2008; Spiegel and Milstien, 2003).

1.3.2 Glicerofosfolípeidos

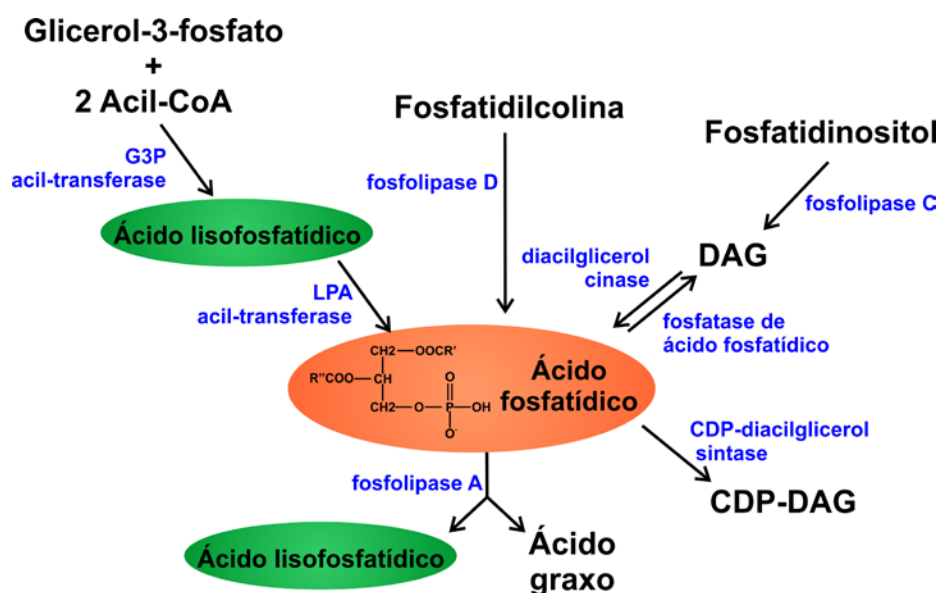


Figura 5. Visão geral do metabolismo de ácido fosfatídico (PA). Diferentes vias metabólicas podem culminar na formação de PA. Dentre elas, a acilação de glicerol-3-fosfato e LPA, além da hidrólise de fosfatidilcolina por fosfolipase D (PLD).

Adicionalmente, DAG originada da atuação de fosfolipase C (PLC) pode ser convertida à PA pela atuação de diacilglicerol cinase (Dgk). Ainda, DAG e CDP-DAG podem ser gerados pela atuação das enzimas fosfatase de ácido fosfatídico (Ppap) e CDP-diacilglicerol sintase (Cds1), respectivamente.

Os glicerofosfolipídeos apresentam o glicerol como base, contendo duas moléculas de ácidos graxos ligadas ao carbono 1 e 2 do glicerol por ligações ester, enquanto o carbono 3 interage com o ácido fosfórico por ligação fosfodiéster (Figura 4). Os glicerofosfolipídeos são derivados do ácido fosfatídico (PA), que já foi associado a vários processos celulares, como secreção, tráfico de membrana, rearranjo do citoesqueleto e transdução de sinal (Wang et al., 2006). A sinalização desencadeada pelo PA apresenta diferentes proteínas efetoras, incluindo cinases, fosfatases, fosfolipases, reguladores de proteínas G, Nox e fatores transcricionais (Wang et al., 2006). Desta forma, PA pode promover a sobrevivência e a proliferação celular pela regulação de mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), além de estimular a translocação de Raf-1 (proteína cinase serina/treonina) para a membrana, ativando a cascata de sinalização de Mapk (proteína cinase ativada por mitógeno) (Wang et al., 2006). Adicionalmente, PA está envolvido com a diferenciação, rearranjo do citoesqueleto e formação de fibras de estresse (Wang et al., 2006).

PA pode ser gerado pela hidrólise de fosfolipídeos de membrana pela atividade da PLD (fosfolipase D) ou ainda pela fosforilação de diacilglicerol realizada pela enzima Dgk (diacilglicerol cinase) (Figura 5) (Wang et al., 2006). Além disso, PA pode ser convertido novamente a diacilglicerol e também para ácido graxo livre e ácido lisofosfatídico (LPA) (Figura 5). Este último também apresentando importante papel na sinalização celular, incluindo proliferação, migração, secreção de citocinas e atividade anti-apoptótica (Aoki et al., 2008; Bieberich, 2012). Interessantemente, LPA também

apresenta receptores de membrana (Lpar) acoplados à proteínas G que atuam na transdução de sinais intracelulares (Aoki et al., 2008). LPA pode ativar Rho GTPases através de receptor acoplado à proteína Gq e também pelo estímulo de PLC (fosfolipase C) (Spiegel et al., 1996). Além dos receptores de membrana, LPA também apresenta um receptor nuclear, Pparg (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama), que influencia na expressão gênica e pode colaborar com a regulação da diferenciação celular (Clarke et al., 1999).

1.3 Biologia de sistemas

A partir de 1990, quando foi iniciado o Projeto Genoma Humano, houve um aumento exponencial do número de sequências de ácidos nucleicos e, conseqüentemente, de estruturas primárias de proteínas depositados no banco de dados GenBank (Benson et al., 2011; Lander et al., 2001). Posteriormente, ocorreu um avanço considerável na quantidade de dados de larga-escala provenientes, não apenas do sequenciamento do genoma, mas também de dados da proteômica, transcritômica e metabolômica. Desta maneira, tornou-se necessário a geração de bancos de dados que permitiam armazenar a crescente quantidade de informações originárias das ciências “ômicas”. Além disso, inúmeras ferramentas computacionais foram geradas com o objetivo de analisar as informações contidas nesses bancos, permitindo a integração e contextualização dos dados biológicos gerados (Chuang et al., 2012).

Assim, a biologia de sistemas surgiu da necessidade de integrar informações complexas, permitindo investigar processos biológicos e como as diferentes partes de um sistema podem interagir entre si (Chuang et al., 2012; O'Malley and Dupré, 2005).

A biologia de sistemas utiliza redes ou grafos como forma de representar a interação entre os componentes biológicos (gene, transcrito, proteína e compostos), assim denominadas de redes interatômicas. Os elementos presentes em redes interatômicas, bem como suas classificações e topologias serão discutidos no Capítulo 1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elucidar a relação entre lipídeos bioativos e genes/proteínas associados ao metabolismo destas moléculas com os mecanismos de diferenciação cardíaca de *Mus musculus* por meio de análises de dados transcritômicos, interatômicos e ferramentas de biologia de sistemas.

2.1.1 Objetivos específicos

-Prospectar e analisar dados de microarranjos de DNA e de RNA-seq de células tronco embrionárias de *Mus musculus* submetidas à cardiogênese *in vitro*;

-Realizar a prospecção de dados relativos a interação proteína-proteína, lipídeos-lipídeos e proteína-lipídeos;

-Gerar redes interatômicas a partir dos dados prospectados, sobrepondo as informações transcritômicas obtidas conforme descrito em objetivo específico anterior;

-Utilizar programas de análise de modularização e ontologia gênica para avaliar as subredes que compõem a rede interatômica principal, bem como os principais processos biológicos relacionados a cada módulo;

-Realizar análise de centralidades utilizando os parâmetros de *betweenness* e *node degree* visando identificar os nós mais relevantes da rede;

-Aplicar a análise de interferência, que realiza um *knockout* virtual de nós isolados ou múltiplos, para determinar o efeito da remoção de determinados nós na topologia da rede.

Capítulo I

Capítulo 6: Biologia de sistemas

Capítulo publicado no *ebook* Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade

Moleculares, disponível em <http://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>

6. Biologia de Sistemas

"Pensar a complexidade – esse é o maior desafio do pensamento contemporâneo, que necessita de uma reforma no nosso modo de pensar."

*Joice de Faria Poloni
Bruno César Feltes
Fernanda Rabaioli da Silva
Diego Bonatto*

Edgar Morin & Jean-Louis Le Moigne

6.1. Introdução

6.2. Biologia de Sistemas

6.3. Estrutura de redes

6.4. Propriedades de rede

6.5. Tipos de redes

6.6. Perturbação de conectores

6.7. Conceitos-chave

6.1. Introdução

Uma das posturas metodológicas mais significativas do pensamento científico contemporâneo consiste em reduzir o todo a suas partes componentes. Por exemplo, entendemos o funcionamento de um organismo como fruto da ação de órgãos. Estes por sua vez, são compostos por tecidos, que são compostos por células. As células têm como componentes moléculas que, por fim, são compostas por átomos.

Esta abordagem, especialmente importante e difundida na área biológica, é fruto das idéias introduzidas pelo filósofo René Descartes em meados do século XVII, indicando que cada problema encontrado deve ser dividido em tantas pequenas partes quanto

for necessário para resolvê-lo de maneira mais parcimoniosa.

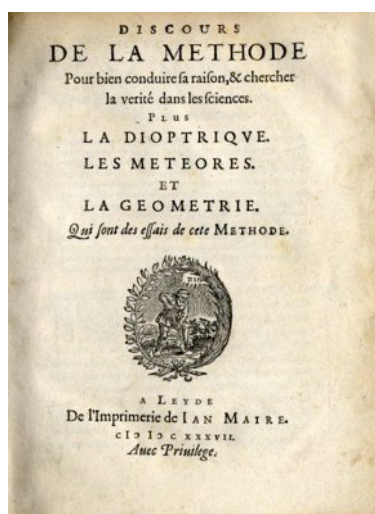
É neste contexto que emerge a divisão disciplinar no estudo da natureza. Desde os tempos da escola até a universidade, o conhecimento a ser ensinado manifesta-se na separação das disciplinas. Por exemplo, no meio acadêmico observamos a biologia compartimentada em botânica, zoologia, ecologia, genética, biologia celular e essas, por sua vez, subdivididas em outras áreas. Como aspecto positivo, o estudo das partes forma especialistas e divide o trabalho, facilitando o entendimento de suas partes componentes. Contudo, neste processo tem-se uma redução da complexidade característica dos fenômenos naturais, o que pode comprometer nossa capacidade de entendê-los.

De fato, a complexidade é inerente à biologia, ao funcionamento do nosso organismo e à natureza. Há a necessidade, assim, da construção de uma abordagem que inclua esta complexidade, de forma sistêmica;

que interligue as diversas interações presentes e que, ao confrontá-las, consiga encontrar relações mais informativas e completas.

A partir desta premissa, emergem na década de 1950 as primeiras concepções sobre a Biologia de Sistemas (BS). Essa área, pautada nos conceitos de sistema e de complexidade, envolve um estudo sistemático de interações em um sistema biológico.

O conceito de sistema é entendido como um conjunto de partes ou elementos que possuem relações entre si, relações estas





que diferem-se daquelas realizadas com outros elementos, fora do sistema. Já a idéia de complexidade é definida como a condição de elementos de um sistema e a relação entre esses elementos em um determinado momento.

Um sistema complexo, por conseguinte, é um sistema composto de partes interconectadas que, como um todo, exibe uma ou mais propriedades que não seriam observadas a partir das propriedades dos componentes individuais, possibilitando assim a observação de novos fenômenos. Portanto, a BS é um campo que investiga as interações entre os componentes de um sistema biológico, buscando contribuir no entendimento de como estas interações influenciam a função e o comportamento do sistema.

A busca da compreensão da biologia em nível de sistema é um tema recorrente na comunidade científica. Norbert Wiener, em 1948, foi um dos proponentes da abordagem sistemática que levou ao nascimento da cibernética, ou biocibernética, consolidada com os estudos do médico neurologista, William Ross Ashby (1903-1972). A partir de 1959, Robert Rosen, sob orientação do professor Nicolas Rashevsky, propôs uma metodologia baseada na “biologia relacional”, onde o mais importante na biologia era o estudo da vida em si. Após 20 anos, Ludwig von Bertalanffy (1901-1972) criou a teoria geral dos sistemas, tornando-se o precursor da BS. Em 1966 foi formalizado o estudo da BS, com o lançamento da disciplina “Teoria e Biologia de Sistemas” pelo teórico de sistemas Mihajlo Mesarovic (1928).

A partir do trabalho destes pesquisadores, a teoria geral dos sistemas pode ser definida como a área que estuda a organização abstrata de fenômenos, investigando todos os princípios comuns a todas as entidades complexas (não somente biológicas) e os modelos que podem ser utilizados para a sua descrição.

Com o avanço da biologia molecular nas décadas que se seguiram, juntamente com o nascimento da genômica funcional, grandes quantidades de dados tornaram-se disponí-

veis e os bancos de dados e ferramentas de análise adaptaram-se ao volume crescente de informações, permitindo construir modelos mais amplos, capazes de lidar com aspectos e fenômenos inacessíveis até então. Assim em 2000, quando o Instituto de Biologia de Sistemas foi fundado, a biologia de sistemas emergiu como um campo próprio, estimulado pelo aumento de dados “ômicos” e pelos avanços da parte experimental e da bioinformática visando o entendimento sistemático da biologia. Desde então, grupos de pesquisas dedicados à BS têm sido formados em todo o mundo.

Para tal, a BS depende de ferramentas interdisciplinares para obter, integrar e analisar diversos tipos de dados, exemplificados na Tabela 1-6. Essa abordagem requer novas técnicas de análise, ferramentas de informática, métodos experimentais e uma nova postura metodológica, articulando partes normalmente estudadas separadamente.

6.2. Biologia de Sistemas

Em suas análises, a BS relaciona partes individuais de um sistema como representações gráficas de conjuntos de nós ou vértices (V), conectados entre si por conectores ou arestas (E , do inglês *edge*). Os nós podem representar indivíduos, proteínas ou mesmo lugares, enquanto que os conectores representam a conexão que está presente entre cada par de nós. Esta representação gráfica é denominada de rede.

Muitos exemplos de rede podem ser citados, como redes de cadeia alimentar, amplamente aplicadas na ecologia, redes neurais e de interação proteica usadas na biologia e ciências médicas, além da própria *World Wide Web*, que representa uma das maiores redes funcionais no mundo da comunicação e informática.

A análise matemática de redes é denominada de teoria de grafos, e consiste em um dos principais objetos de estudo da matemática discreta. Desta forma, o termo “rede” representa as interações funcionais de um sistema, enquanto que o termo “grafo” enfa-



Tabela 1-6: Ferramentas utilizadas no estudo da BS.

Área	Tipo de análise
Bioinformática	Funções biológicas por meio de ferramentas da informática
Genômica	Sequências de DNA
Transcriptômica	Transcritos
Proteômica	Proteínas
Interatômica	Interações proteicas
Interferômica/ microRNômica	RNAi/miRNA
Epigenômica	Modificações na cromatina e no DNA
Metabolômica	Metabólitos
Fluxômica	Alterações dinâmicas de moléculas dentro de uma célula ao longo do tempo
Biômica	Bioma
Glicômica	Totalidade de carboidratos
Farmacogenômica	Genes que definem o comportamento da droga
Nutrigenômica	Relação entre a dieta e os genes individuais
Toxicogenômica	Estrutura e atividade do genoma e os efeitos biológicos adversos na exposição a xenobióticos
Imunômica	Função molecular associada aos transcritos de RNAm relacionados à resposta imune

tiza as análises matemáticas deste sistema. Neste capítulo, contudo, usaremos ambos os termos como sinônimos.

Historicamente, a teoria de grafos foi desenvolvida em 1736 pelo matemático suíço Leonard Euler na resolução do problema das sete pontes de Königsberg, atualmente conhecida como Kaliningrado, na Rússia. A cidade de Königsberg é atravessada pelo Rio Pregel e consiste de duas grandes ilhas que eram conectadas entre si e com as margens opostas por sete pontes (Figura 1A-6). O problema apresentado a Euler consistia em descobrir como caminhar pela cidade atravessando cada ponte apenas uma vez. A técnica desenvolvida pelo matemático suíço foi adaptar o mapa de Königsberg, transformando as margens e ilhas em nós e as pontes em conectores (Figura 1B-6). Euler submeteu a rede que desenvolveu a análises matemáti-

cas, porém não encontrou solução para o problema. Contudo, a metodologia de análise de Euler foi um marco histórico na análise de problemas combinatórios, além de estabelecer o conceito de topologia que é usado em BS (ver adiante).

O emprego da teoria de grafos e suas aplicações têm apresentado um crescimento explosivo devido a sua multidisciplinaridade e ao seu conceito de modelo que permite estudar um objeto específico sem negligenciar o meio em que este objeto se encontra. Por exemplo, é possível estudar determinado fármaco considerando a atividade que diversos compostos e enzimas poderiam exercer sobre ele. Nesses estudos pode-se construir uma rede onde os nós representam compostos e enzimas e os conectores representam se há ou não relação entre eles, permitindo analisar:

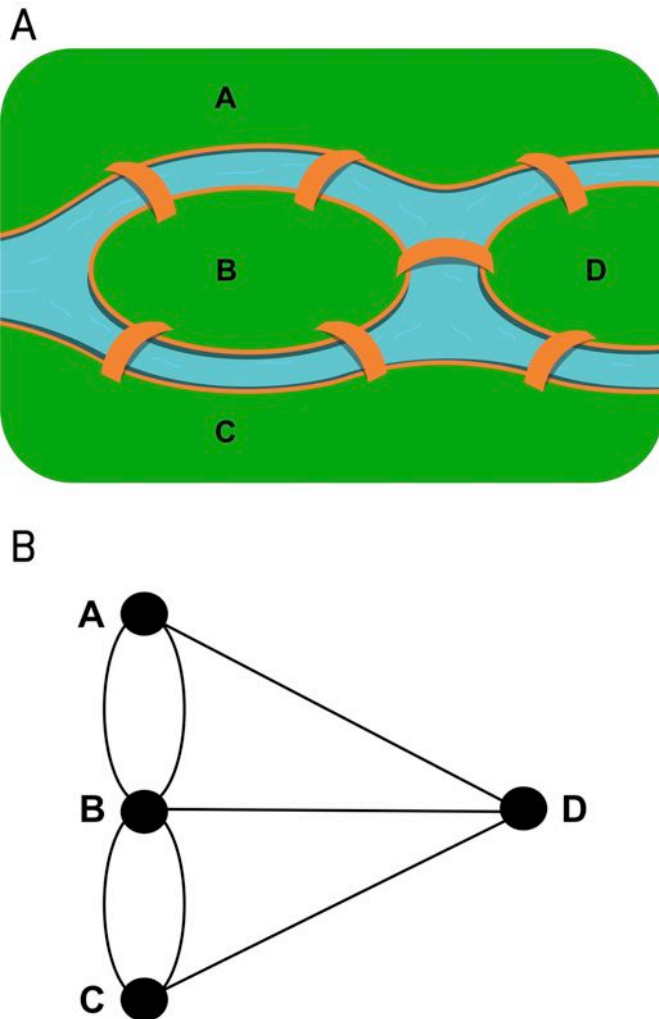


Figura 1-6: (A) Representação parcial do mapa de Königsberg e suas setes pontes. (B) Ilustração da rede desenvolvida por Euler.

- i) a conectividade dos compostos ou enzimas, ou seja, que tipo de relação duas moléculas aleatórias podem apresentar na rede;
- ii) a centralidade, que caracteriza as moléculas que apresentam maior influência sob a ação do fármaco em questão.

Conceitos básicos de grafos

Considerando-se a estreita relação entre a BS e a teoria de grafos, alguns conceitos matemáticos podem nos ajudar a entender e empregar esta área do conhecimento com maior domínio e propriedade. Assim, prosseguiremos com uma breve introdução sobre teoria de grafos e estrutura de rede, apresentando alguns descritores matemáticos fre-

quentemente empregados em BS.

Uma rede (ou grafo) $G = (V, E)$ representa uma combinação de nós (V) e conectores (E) que ligam os nós. Em uma rede, o conjunto de seus nós é denotado por $V(G)$, enquanto o conjunto de seus conectores por $E(G)$. Dessa forma, o número total de nós em G é representado por n , e o número total de conectores é representado por m :

$$n(G) = |V(G)| \text{ e } m(G) = |E(G)|$$

Adicionalmente, conforme apresentado na Figura 2A-6, um conector E deve apresentar suas extremidades ligadas aos nós a e b ($a \in V$ e $b \in V$), sendo chamado eab , $E(a, b)$ ou apenas ab . Este conector pode ser representado da seguinte forma:

$$E = \{(a, b) \mid a, b \in V\}$$

As redes podem apresentar conectores diretos, ou seja, um conector orientado em determinada direção (exemplo $a \rightarrow b$, $b \rightarrow c$), sendo assim chamadas de redes direcionadas

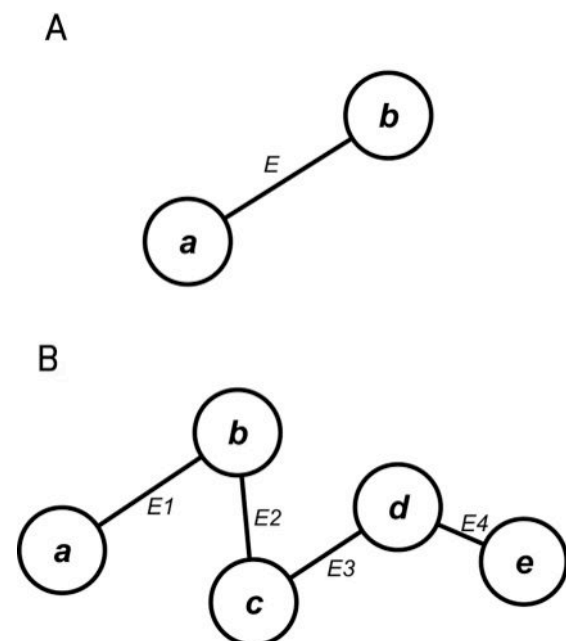


Figura 2-6: Em (A) a representação da interação de dois nós vizinhos ($V = a, b$) conectados pelo conector $E(a, b)$. Em (B) a rede pode ser descrita como $V = \{a, b, c, d, e\}$ e $E = \{ab, bc, cd, de\}$, com $n = 5$ (5 nós de a a e) e $m = 4$ (4 conectores de 1 a 4).

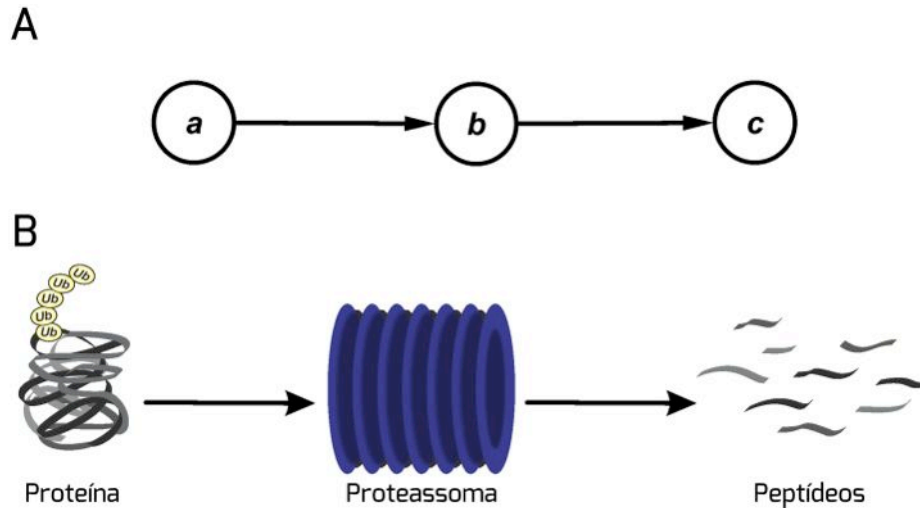


Figura 3-6: (A) Rede direta; (B) Representação da via de degradação ubiquitina-proteassoma, um dos inúmeros tipos de redes direcionadas encontradas em sistemas biológicos.

ou dígrafos (Figura 3A-6). Nos conectores $E = (a, b)$ e $E = (b, c)$, podemos dizer que a é antecessor a b , e b é antecessor a c . Da mesma forma, b é sucessor de a e c é sucessor de b . Um dígrafo é definido por $G = (V, E, f)$, sendo f uma função que associa cada elemento E a um par ordenado de nós em V . Uma rede representando os mecanismos de degradação ubiquitina-proteassoma de uma determinada proteína pode ser um exemplo de rede direta após o reconhecimento da proteína ubiquitina-

da por proteassomas, uma vez que não é possível reverter a degradação da proteína (Figura 3B-6).

Podem também existir redes não direcionadas (Figura 4A-6), que apresentam conectores orientados em ambas as direções ($a \leftrightarrow b$, $b \leftrightarrow c$), não sendo possível assim estabelecer antecessor ou sucessor. Um exemplo típico seria a reação reversível de um substrato A para um substrato B em uma via metabólica como, por exemplo, a formação de

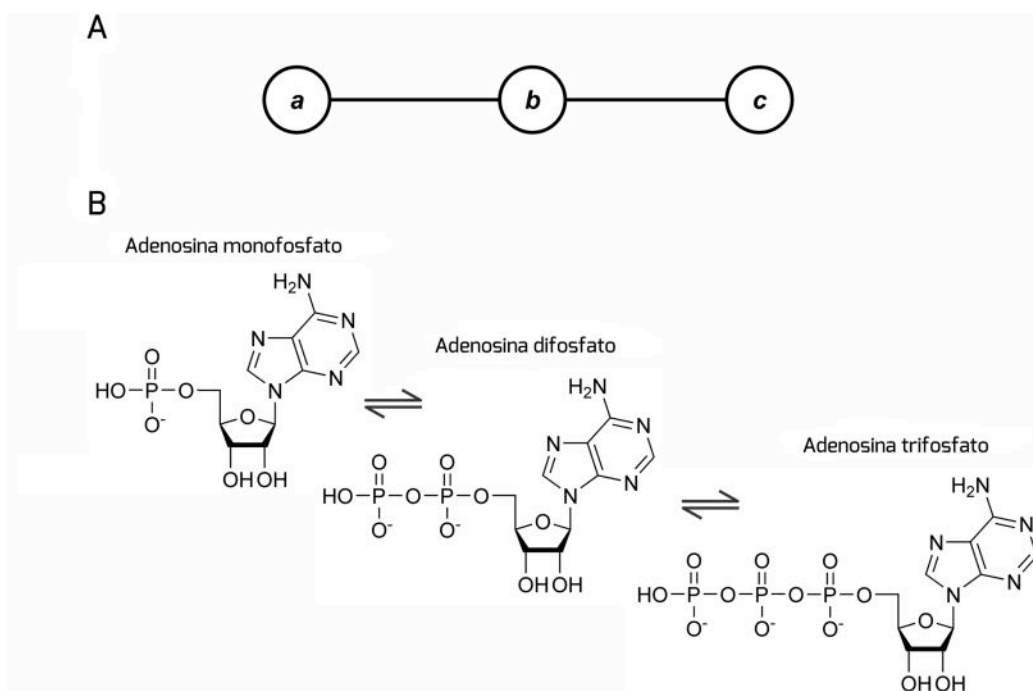


Figura 4-6: (A) Rede não direcionada; (B) Reação reversa de fosforilação e desfosforilação de adenosina difosfato, representando um exemplo de redes não direcionadas em sistemas biológicos.



diferentes moléculas fosforiladas de adenosina conforme a reação $AMP \leftrightarrow ADP \leftrightarrow ATP$ (Figura 4B-6).

Em alguns casos, podem existir dois ou mais conectores que ligam os mesmos nós na rede. Esse tipo de interação é chamado multiconector, onde diferentes informações são representadas por cada conector, caracterizando assim um multidígrafo (Figura 5-6).

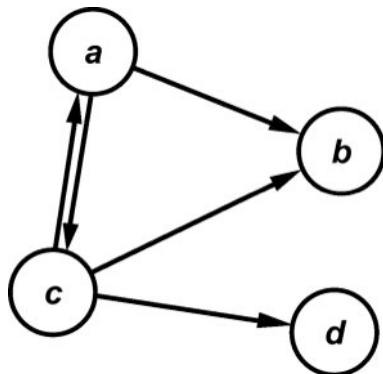


Figura 5-6: Multidígrafo $G = (V, E)$, onde $V = \{a, b, c, d\}$ e $E = \{ab, ac, ca, cb, cd\}$.

Observa-se, assim, que as redes apresentam interações entre os nós e que essas interações são delimitadas pelos conectores. Portanto, se $E = (a, b)$, logo os nós a e b são vizinhos ou adjacentes, e $E(a, b)$ é incidente aos nós a e b , lembrando que $E(a, b)$ se refere ao conector.

Uma das formas de representar e descrever tais interações entre os nós de uma determinada rede envolve o uso de matrizes. Assim, se considerarmos uma rede G contendo os nós v_1, \dots, v_n a matriz que descreve os elementos adjacentes em G é dada por:

$$a_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{se } v_i v_j \in E(G) \\ 0 & \text{se } v_i v_j \notin E(G) \end{cases}$$

As tabelas representadas na Figura 6-6 são um mecanismo visual para compreender como a matriz de uma rede é elaborada, tanto para redes não direcionadas (Figura 6A-6) quanto direcionadas (Figura 6B-6).

Para as redes não direcionada (Figura 6A-6) e direcionada (Figura 6B-6), as matrizes são representadas abaixo:

0	0	0	0
0	0	0	0
1	1	0	0
0	0	1	0

Rede direcionada

0	1	0	0
1	0	1	0
0	1	0	1
0	0	1	0

Rede não direcionada

Ao analisarmos uma matriz devemos considerar cada nó como uma coluna e uma linha distinta. Na análise da primeira matriz iremos interpor o nó representado na linha 1 (nó a) com o nó representado na coluna 1 (nó a) da mesma forma que as tabelas representadas na Figura 6-6, e como não há interação de a com a , nos referimos como 0. Da mesma forma, se consideramos a linha 1 (nó a) e a coluna 2 (nó b), há conexão, sendo representado por 1. Perceba que as matrizes são diferentes na rede direcionada e não direcionada devido à atribuição de uma conexão direcionada. Na matriz direcionada, tanto b está conectado a c quanto c está conectado a b . Contudo, na matriz não direcionada, somente c está conectado a b .

Também podemos definir uma rede como completa se $E(G) = V(G)^{(2)}$, isto é, se dois nós selecionados aleatoriamente na rede G são adjacentes. Assim, uma rede completa tem n nós e é representada por K_n , sendo o número de conectores em K_n representado por $\binom{n}{2}$.

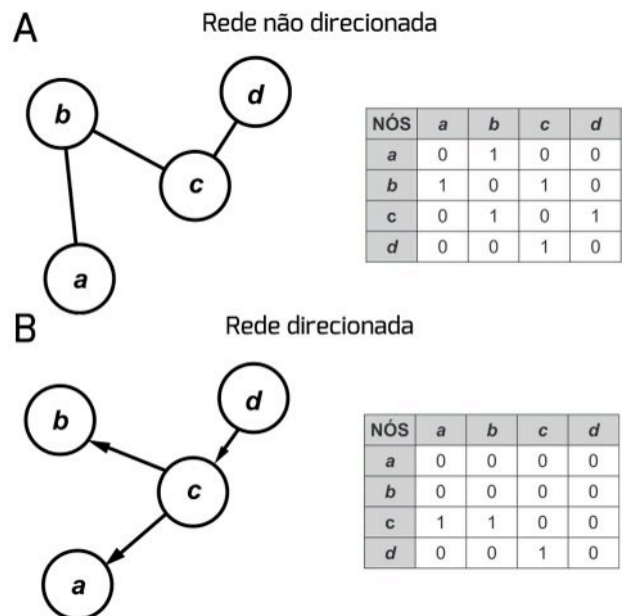


Figura 6-6: (A) Rede não direcionada $G = (V, E)$, onde $V = \{a, b, c, d\}$ e $E = \{ab, bc, cd\}$ ou $E = \{ba, cb, dc\}$, representados também na tabela pelo número 1, que indica a presença de um conector entre dois nós, exemplo $E = \{ab, ba\} = 1$. A ausência do conector entre dois nós é representada por 0. (B) Rede direcionada $G = (V, E)$, onde $V = \{a, b, c, d\}$ e $E = \{ca, cb, dc\}$. Neste caso, a tabela de interações muda devido ao direcionamento das conexões, por exemplo $E = \{ca\} = 1$, mas $E = \{ac\} = 0$.



O conjunto de nós e conectores de uma rede pode ser apresentado em uma representação mais complexa e informativa, agregando pesos (atributos) associados aos nós e conectores (Figura 7-6). Redes que apresentam nós e conectores com atributos são chamadas de redes ponderadas (G, w), onde $G = (V, E)$ e $w = V, E \in R$, sendo R o conjunto dos números reais e w correspondente à função atributo. Por exemplo, pode-se representar uma rede neural onde o atributo indica a distância que um sinal neural deve percorrer em relação ao local de origem. Assim, se P é uma trajetória na rede, $w(P)$ é considerada a extensão de P . Redes ponderadas são amplamente usadas na bioinformática, onde $G, w(a, b)$ pode representar a quantidade e a fidelidade de informações armazenadas em bancos de dados a respeito da interação entre a e b (Figura 7-6).

Também podemos nos referir a uma rede como bipartida (Figura 8-6) onde, em $G = (V, E)$, V pode ser dividido em V_x e V_y . Assim, cada nó de V_x é adjacente aos vértices de V_y . Desta forma, se consideramos $E(a, b)$ signifi-

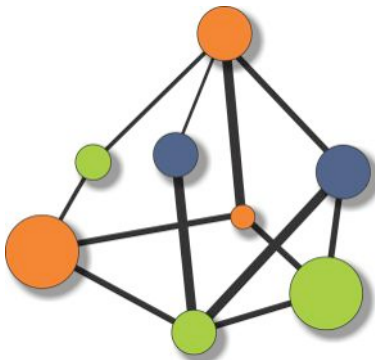
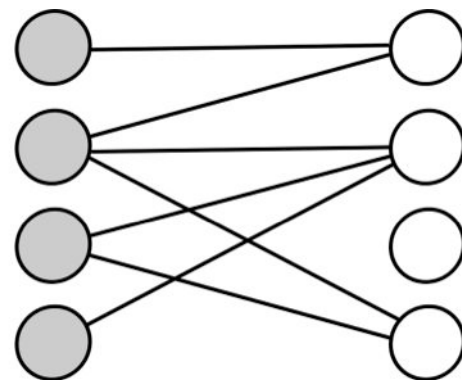


Figura 7-6: Representação de uma rede ponderada descrevendo: *i*) diferentes tipos de nós, onde cada cor representa diferentes famílias de proteínas (por exemplo, os nós verdes representam serina/treonina cinases, nós azuis representam cinases dependentes de ciclinas e nós laranjas representam as tirosina cinases); *ii*) diferentes tamanhos de nós, com atributo $w(a)$, representando o número de artigos w que citam a proteína a ; e *iii*) a espessura do conector y , representando a fidelidade w da interação entre duas proteínas distintas.

ca que $a \in V_x$, enquanto que $b \in V_y$ ou $a \in V_y$ e $b \in V_x$. A aplicação de redes bipartidas na modelagem de redes biológicas pode ser vista em vários contextos, desde a análise de genótipos e SNPs (*single-nucleotide polymorphism*) em diferentes populações até a representação de conexões ecológicas e reações enzimáticas em vias metabólicas.

O modelo de redes visto até agora, na qual um conector se liga a dois nós, apesar de amplamente utilizado na avaliação da conectividade de redes biológicas, pode ser uma representação simplista quando se trata de redes metabólicas. A organização biológica que caracteriza as redes metabólicas em um contexto bioquímico consiste de complexas interações, frequentemente envolvendo diversos substratos e produtos. Para melhor representar a complexidade de reações bioquímicas, usam-se redes conhecidas como hipergrafos (Figura 9-6).

Os hipergrafos são caracterizados pela presença de hipervértices, que conectam mais de dois nós com propriedades distintas (Figura



***E. coli* 7181**

***E. coli* C3888**

Figura 8-6: Representação de uma rede bipartida, onde os nós cinzas e brancos representam diferentes grupos de uma análise. Por exemplo, cada grupo pode representar duas linhagens diferentes de *E. coli*. Para avaliar a eficiência de transformação das linhagens, estas foram divididas em quatro amostras (representadas pelos nós) e cada amostra foi incubada com diferentes plasmídeos. Os conectores apresentam os plasmídeos que obtiveram sucesso na transformação e são comuns entre as duas linhagens.

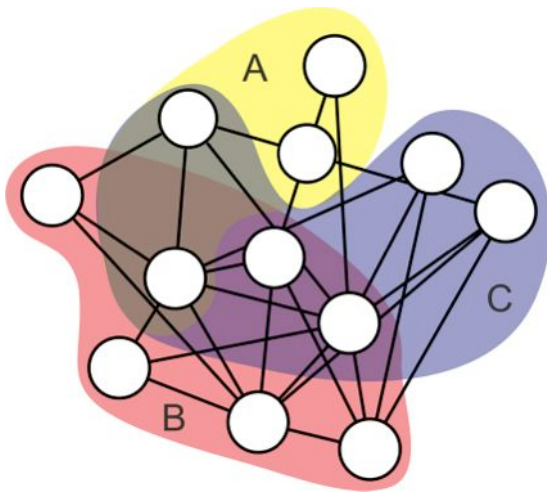


Figura 9-6: Representação de um hipergrafo. As regiões destacadas em várias cores caracterizam as diferentes propriedades ou atividades bioquímicas representadas na rede. Assim, cada cor estaria representando diferentes vias metabólicas (A, B e C). Os nós da rede indicam componentes presentes em cada uma das vias metabólicas e/ou participando de vias distintas nas regiões intersectadas.

ra 9-6). Assim, os hipergrafos são frequentemente usados em organizações bioquímicas, devido à intersecção de componentes com atividades em diferentes rotas metabólicas.

Geralmente, as redes biológicas são extensas, apresentando um grande número de nós. Contudo, análises estatísticas indicam que, dentro de uma rede maior (Figura 10A-6), podem existir redes menores que participam da composição geral e possuem maior conectividade entre si quando comparados à rede maior (Figura 10B-6). Essas subredes de $G = (V,$

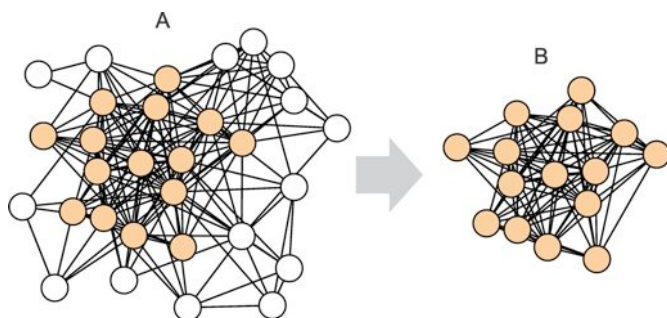


Figura 10-6: (A) Rede de interações proteína-proteína representando em laranja a subrede, ou qual foi destacada em (B).

$E)$ nada mais são que uma rede $G_I = (V_I, E_I)$, onde $V_I \subseteq V$ e $E_I \subseteq E$.

6.3. Estrutura de redes

Uma das características de uma rede é sua conectividade (também referida como grau de nó), sendo a conectividade total de uma rede definida por $C = E / N(N - 1)$, onde E representa o número de conectores e N o número total de nós.

Considere os nós V_a e V_e de uma rede. Representamos como um dos possíveis caminhos de V_a a V_e os vértices V_b, V_c e V_d , formando um conector a cada dois vértices sucessivos, caracterizados por $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6, E_7, E_8$ (Figura 11-6). O nó que originou o caminho é chamado de nó inicial, enquanto que o último nó do caminho é chamado de nó final. Um caminho onde o nó inicial coincide com o nó final, sem repetições de conexões intermediárias, é chamado de circuito. Usando a mesma rede da Figura 11-6, $\langle d, b, c, e, d \rangle$ formam um circuito. O comprimento de um caminho ou circuito consiste do número de conectores que pertencem ao caminho (ou circuito) ou, no caso de uma rede ponderada, pela soma dos atributos (ou pesos) dos conectores.

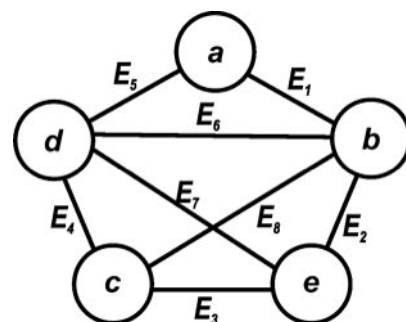


Figura 11-6: Esquema representando uma rede, onde $V = \{a, b, c, d, e\}$ e $E = \{E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6, E_7, E_8\}$.

Um caminho de comprimento k tem exatamente $k + 1$ nós, enquanto que um circuito de comprimento k tem $k = v$ nós. Se calcularmos o comprimento de V_a a V_e , com caminho E_1, E_2, E_3, E_4, E_5 temos $k = 4$ conectores com $4 + 1$ nós. Para o circuito $\langle d, b, c, e, d \rangle$ que tem como caminho E_6, E_8, E_3, E_7 temos $k = 4$ conectores, com quatro nós diferentes.



Uma importante análise em uma rede consiste em caracterizá-la conforme sua distribuição de caminhos geodésicos. Um caminho geodésico é definido como a via mais curta dentro de uma rede entre dois nós quaisquer (i e j), sendo representado por $\delta(i, j)$ em G . Um bom exemplo disso é o experimento realizado por Stanley Milgram em 1960, onde cartas foram enviadas a indivíduos aleatoriamente. A missão de cada indivíduo era enviar a sua carta a alguém que considerasse capaz de fazer com que as cartas chegassem ao seu destino final.

Essa experiência relativamente simples conclui que existem aproximadamente seis graus de separação entre dois indivíduos quaisquer no mundo. Da mesma forma, esse experimento foi a primeira demonstração significativa do efeito "mundo pequeno" (ou do inglês, *small world*), que estabelece que as redes apresentam nós conectados entre si formando um caminho mais curto entre todos os nós.

O comprimento médio de caminhos entre os nós (i, j) é definido pelo valor médio de conectores entre os nós e pode ser calculado por:

$$\delta = \frac{2}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \delta_{\min(i, j)}$$

assumindo-se que $\delta_{\min}(i, j)$ é o caminho mais curto entre os nós i e j , sendo N o número total de nós. Adicionalmente, o diâmetro da rede é definido como:

$$D = \max_{i, j} \delta_{\min}(i, j)$$

e representa o maior comprimento entre dois nós. Estudos recentes têm revelado que redes biomoleculares, sociais e tecnológicas apresentam valores de comprimento médio de caminhos e diâmetro relativamente pequenos se comparados ao tamanho da rede, apresentando ordem de grandeza $\log(n)$ ou menor quando o tamanho da rede é n . Da mesma forma, a densidade de uma rede é calculada com base no número de conexões que cada nó possui, sendo definida como:

$$\rho = \frac{2m}{n(n-1)}$$

Avaliar a densidade de uma rede representa avaliar o nível de conectividade, tornando-se muito importante na definição de

suas propriedades, como veremos adiante. Por exemplo, ao analisarmos a rede de interação de uma doença contagiosa, a possibilidade desta doença até então controlada tornar-se uma epidemia depende principalmente de duas variáveis: o tipo de agente infeccioso e a alta densidade de conexões (rotas de transmissão). O procedimento de quarentena (isolamento) quando um determinado indivíduo apresenta os sintomas da doença é justamente reduzir a conectividade da rede de transmissão.

Alguns modelos de rede (como as redes de livre escala e hierárquica, discutidas adiante no item 6.5.) podem apresentar clusterização, isto é, os nós tendem a se agrupar. Isso significa que se um nó A se liga ao nó B, e o nó B se liga ao nó C, então há grandes chances de A se ligar a C também. Assim, a rede é composta de centenas de triângulos, ou seja, grupos de três nós conectados entre si, onde cada lateral de um triângulo pode pertencer a outro triângulo.

Podemos quantificar a fração de triplos nós que apresentam um terceiro conector preenchendo um triângulo pelo coeficiente de clusterização:

$$C = \frac{3 \times \text{número de triângulos na rede}}{\text{número de nós triplamente conectados}}$$

Na equação, o número três presente no numerador é devido ao fato que cada lateral de um triângulo contribui com outros três triplos nós, além de garantir que C seja $0 \leq C \leq 1$. Dessa forma, o coeficiente de clusterização avalia a probabilidade dos nós i e j serem vizinhos, já que ambos são vizinhos do nó h . Assim, o coeficiente de clusterização local de um nó i pode ser determinado por:

$$C_i = \frac{2e}{k(k-1)}$$

onde um nó i tem k vizinhos com e conexões entre eles. Contudo, pode-se também atribuir o coeficiente de clusterização média para a rede total, sendo definido por:

$$C = \frac{1}{N} \sum_i C_i$$

Ao analisarmos uma rede de processos biológicos, notamos que esta apresenta um maior coeficiente de clusterização média quando comparado a uma rede aleatória. Isso possivelmente se deve ao fato de pro-



cessos celulares ocorrerem de forma dependente da organização de diversos subconjuntos (*clusters*) de biomoléculas.

Em uma rede consideramos como sendo o grau de um nó o número de conectores k que incidem a este nó. Assim, a distribuição do grau $P(k)$ é definida por ser uma fração de nós com grau k dentro de uma rede. Então sendo $k = 0, 1, 2, \dots$ $P(k)$ indica a probabilidade de determinado nó ter grau k . A distribuição de grau é definida por:

$$P(k) = \frac{n_k}{n}$$

onde temos n nós na totalidade da rede e n_k representa a quantidade de nós com grau k .

Uma rede aleatória que apresenta n nós conectados ou não com probabilidade p , tem uma distribuição binomial de grau com parâmetros $N - 1$ e p :

$$P(k_i = k) = C_{N-1}^k p^k (1-p)^{N-1-k}$$

Outras redes, no entanto, tem distribuição de grau bem diferente. Redes de livre escala (como a maioria das redes biológicas) apresentam distribuição do grau que segue uma Lei de Potência $P(k) \sim k^{-\gamma}$, $\gamma > 1$ (ver adiante).

Outra estimativa numérica pode ser feita, a função de distribuição cumulativa avalia a probabilidade de um nó ter um grau maior do que k :

$$P_k = \sum_{k'=k}^{\infty} p_{k'}$$

Agora, o que aconteceria se, por acaso, resolvessemos excluir alguns poucos nós da rede? Certamente iríamos alterar o comprimento de alguns caminhos e circuitos da rede de forma pouco significativa. Contudo, se formos excluindo mais nós, progressivamente, veremos que a comunicação da rede fica cada vez mais esparsa, até se tornar desconectada. A capacidade de uma rede de tolerar a deleção de nós é chamada de resiliência.

Em 2000, um estudo conduzido por Albert-László Barabási e colaboradores mostrou que a Internet pode ser altamente resiliente na remoção de nós aleatórios. Isso se deve ao fato de que a quantidade de nós com baixo grau de interação é maior em uma rede do que nós com alto grau de interação. Em compensação, se a remoção iniciar a partir dos nós com mais alto grau de interação, a

alteração será brusca. Neste caso, observa-se um aumento da distância entre os nós, de forma que apenas poucos nós precisam ser removidos para destruir a comunicação da rede. Assim, fica claro que a Internet apresenta baixa resiliência na remoção de nós com alto grau, tornando-se vulnerável a ataques de *hackers*.

Outro exemplo seriam as redes de interação proteína-proteína. Estas redes geralmente apresentam muitas proteínas com poucas interações e algumas proteínas possuindo muitas interações (chamadas de *hubs*, ver adiante). Desta forma, redes de interação proteína-proteína são resilientes à deleção de nós aleatórios, porém extremamente vulneráveis a ataques em proteínas *hubs*.

Os nós de uma determinada rede podem apresentar tendências de conexão. Em outras palavras, duas redes completamente diferentes topologicamente podem apresentar a mesma distribuição do grau. Assim, em uma rede é preciso considerar o padrão de correlação do grau dos nós, onde a conectividade de um nó reflete nas suas possibilidades de ligação.

A tendência de conexão que uma rede apresenta pode ser chamada de assortatividade e desassortatividade. A assortatividade significa que os nós de uma rede apresentam uma tendência a interagirem com outros nós semelhantes, por exemplo, nós do tipo A interagem preferencialmente com nós também do tipo A (Figura 12A-6). Vértices com alto grau tendem a interagir com vértices que também apresentam alto grau. No entanto, chamamos de desassortatividade se os nós de uma rede interagem preferencialmente com nós diferentes dele mesmo, por exemplo, nós do tipo A tendem a interagir com nós do tipo B. Neste caso, um nó com alto grau tem tendência a interagir com nós que apresentem baixo grau (Figura 12B-6).

A correlação de grau dos nós i e j é feita por distribuição de probabilidade conjunta $P(k_i, k_j) = P(k_i) P(k_j)$. Podemos ainda calcular a assortatividade ou desassortatividade da rede como um todo, considerando:



$$r = \frac{\sum_i e_{ii} - \sum_i a_i b_i}{1 - \sum_i a_i b_i}$$

Se $r = 1$ a rede é considerada assortativa, enquanto que se $r = -1$, a rede é completamente desassortativa.

Caracteristicamente, redes assortativas são mais resilientes e apresentam *hubs* bem conectados, enquanto que redes desassortativas são redes mais vulneráveis com nós conexos a *hubs* esparsos (Figura 12-6).

A conectividade de uma rede também pode ser avaliada pela teoria da percolação. Essa teoria tem por objetivo estudar a conectividade da rede pela avaliação de sua arquitetura, caracterizando a distribuição do tamanho dos *clusters* e descrevendo como ocorre a transferência de informações, por exemplo, de A para B.

Redes aleatórias caracteristicamente apresentam baixa tendência em possuir pequenos *clusters* isolados e uma grande probabilidade em formar um componente conectado gigante. Como visto anteriormente, determinadas redes são altamente resilientes à deleção aleatória de nós. A variação na fração dos nós no maior componente da rede (componente gigante) é a forma mais fácil de

calcular a resiliência. Imagine dois nós conectados na rede. Se estes nós pertencem a um componente gigante, há grande probabilidade de se comunicarem com uma extensa proporção de nós da rede. No entanto, nós que participam de pequenos componentes comunicam-se apenas com uma parte reduzida da rede. Essa capacidade de comunicação é responsável pela forma como a informação é transferida de um ponto a outro. Assim, associamos a resiliência com a percolação local (refere-se aos nós), enquanto que a percolação de ligação (refere-se aos conectores) está relacionada ao processo de dispersão (Figura 13A-6).

Também podemos considerar os nós de uma rede como ocupados (funcionais) ou desocupados (falhos), dependendo da sua funcionalidade. A probabilidade de um nó estar ou não ocupado pode ser uniforme ou pode depender do grau do nó, sendo que os nós funcionais da rede formam o componente gigante em um modelo de percolação. Assim, os nós ou conectores falhos não participam da transferência de informação, e igualmente, não participam do componente gigante (Figura 13B-6). Dessa forma, ao observar a propri-

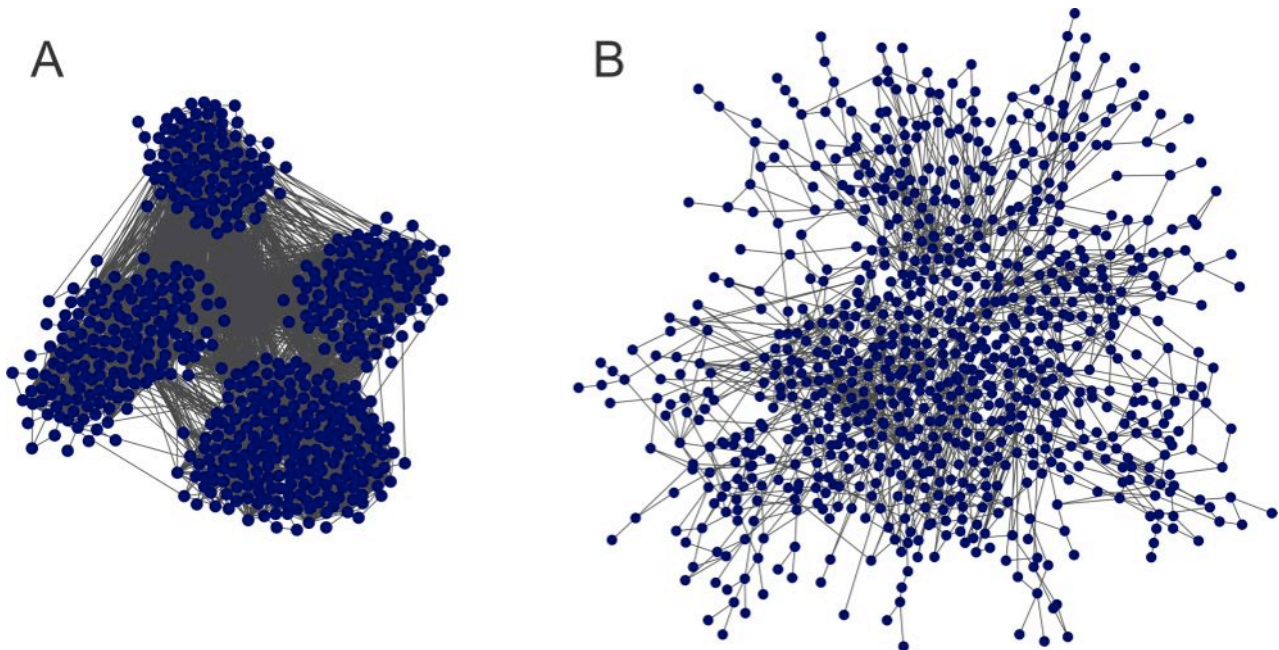


Figura 12-6: Ilustração representando em (A) uma rede assortativa com nós bem conectados que apresentam conexões com outros nós também fortemente conectados. Em (B), uma rede desassortativa, onde os poucos nós que apresentam mais conexões interagem com nós menos conectados, resultando em uma rede menos densa.

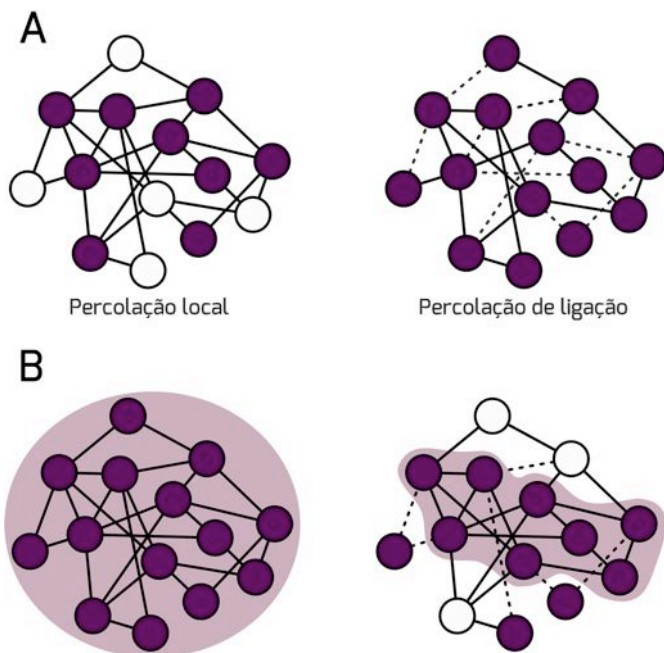


Figura 13-6: (A) Redes de percolação local e de ligação, onde os nós sólidos estão ocupados ou funcionais, enquanto que os nós brancos são desocupados ou falhos. (B) Representação do componente gigante. Após o surgimento de nós e conectores falhos, sua proporção é alterada e, por conseguinte, as possibilidades de transferência de informações.

idade de percolação de um *cluster*, considerando uma probabilidade de ocupação variável, podemos determinar que isso afeta diretamente a conectividade de uma rede, tornando-a altamente resiliente ou não. Porém, ao combinarmos a percolação local e de ligação, teremos um modelo robusto contra falhas de nós ou conectores.

Os modelos de percolação são utilizados em muitas redes, porém um dos modelos mais interessante é o da dispersão de uma doença. Nesse modelo, cada nó representa o hospedeiro e os conectores representam a capacidade de transmissão da doença entre um hospedeiro e outro. O nó (indivíduo hospedeiro) está ocupado se for suscetível à doença, enquanto que um nó que representa um indivíduo que tomou a vacina seria considerado como desocupado. Da mesma forma, os conectores são considerados ocupados se há possibilidade de transmissão (Figura 14-6).

Levando em conta este modelo, o início de uma epidemia representa a transição de percolação.

Apesar de ter sido originalmente desenvolvida com o objetivo de responder às perguntas em química orgânica, os modelos de percolação têm sido usados com sucesso para estudar diversos fenômenos, como transferência de sinal em neurônios e condutividade elétrica. Em 1987, Robert H. Gardner foi um dos primeiros pesquisadores a usar a teoria de percolação na Ecologia da Paisagem, sendo útil também na avaliação de corredores ecológicos e redes de incêndios florestais.

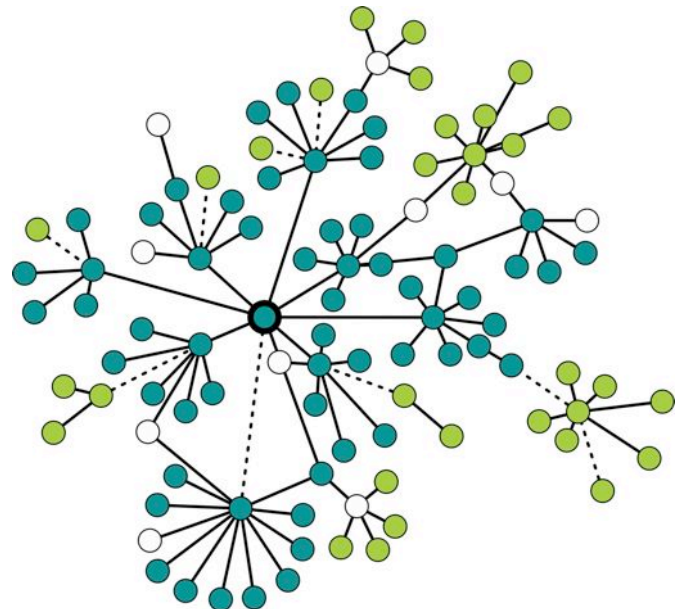


Figura 14-6: Modelo simplificado de dispersão de uma doença considerando um grupo de trabalho em uma empresa. Suponhamos que o indivíduo central contraiu uma doença viral de fácil transmissão, como a gripe simples. Assim, todos os indivíduos com os quais ele entrou em contato neste período também contraíram a doença (nós azuis), com exceção daqueles que foram vacinados (nós brancos). Neste caso, além de não contraírem a doença, também não a dispersaram. Os conectores pontilhados indicam que não houve interação física durante o período passível de contrair a doença entre o indivíduo saudável com o contaminado. Desta maneira, os indivíduos representados pelo nó verde claro, apesar de não terem sido vacinados, não contraíram a doença por não entrarem em contato com indivíduos contaminados.



6.4. Propriedades de rede

Diversas propriedades são regularmente empregadas na análise de redes biológicas, cada uma fornecendo informação sobre as interações e/ou componentes de um determinado sistema. Estas propriedades podem ser referentes a nós individuais, isto é, grau de nó ou *node degree*, ou podem contemplar a rede como um todo como é, por exemplo, o caso da modularização e do diâmetro da rede.

Em uma análise de biologia de sistemas, a análise estatística destas propriedades possui papel crítico na geração de dados conclusivos e confiáveis, constituindo-se assim em redes capazes de descrever com alto grau de fidelidade um determinado modelo biológico, de identificar alvos proteicos críticos na rede ou no desenvolvimento de caminhos moleculares.

Modularidade

Uma das principais características quando nos referimos a propriedades da topologia de redes é a chamada modularidade ou clusterização. O conceito de modularidade é antigo e já amplamente usado em outras áreas do conhecimento, como nas ciências sociais. Dentro das ciências biológicas, é um conceito comum nas áreas da biologia evolutiva, biologia molecular, biologia de sistemas e biologia do desenvolvimento.

Todas as ideias de modularidade giram em torno do conceito de padrões de conectividade, onde seus elementos constituintes estão agrupados em subconjuntos altamente conectados. De forma geral, a modularidade é um princípio de união entre diferentes tipos de elementos e conexões naturalmente formadas no meio biológico, como na interação entre indivíduos de mesma espécie. Um exemplo é a *Pollenia rudis*, uma espécie de mosca conhecida como *cluster fly* em decorrência de seu hábito de se agrupar com indivíduos da mesma espécie.

Este princípio é visto em todos os lugares, seja na nossa tendência de formar sociedades e grupos preferenciais de interação

interpessoais ou na nossa tendência de organizar objetos por seu tipo, função e cores, dentre outros. Em nível molecular é visto, por exemplo, em elementos que atuam num mesmo processo biológico, como conjuntos de moléculas de RNA responsáveis pela degradação e síntese de ácidos nucleicos ou grupos de proteínas que atuam num mesmo processo biológico como a replicação de DNA e a transcrição gênica.

Existem dois tipos distintos de módulos:

- i) Módulo Variacional: apresenta características que variam entre seus componentes e são relativamente independentes de outros módulos, porém possuem um número considerável de ligações com outros módulos;
- ii) Módulo Funcional: possui elementos que normalmente atuam juntos em alguma função fisiológica distinta e são semiautônomos (*quasi-autonomous*) de outros módulos. Esses módulos compreendem a maioria dos módulos vistos em redes biológicas.

Módulos variacionais podem ser exemplificados na Figura 15B-6 e C, representando a formação de uma mandíbula de rato. Apesar de se tratar da diferenciação de um tecido, podemos usá-la como modelo variacional devido ao fato de diferentes proteínas e genes serem responsáveis pela formação de uma unidade estrutural única (o ramo ascendente e da região alveolar). Desta maneira, é uma unidade estrutural (um único osso) que se origina de diferentes módulos. Assim, o módulo variacional consiste numa integração de vários de genes que dividem efeitos pleiotrópicos entre si e que possuem poucos efeitos pleiotrópicos com outros *clusters*, sendo praticamente independente.

Módulos de genes de desenvolvimento embrionário, relacionados à diferenciação ou formação de padrões corporais, tendem a ser quase independentes de outros módulos, uma vez que erros na sua expressão ou atuação podem ser letais para o embrião. Por isso, esses módulos de desenvolvimento tendem a depender de elementos dentro do próprio



grupo para sua expressão. Podemos visualizar um exemplo de um módulo funcional na Figura 15A-6.

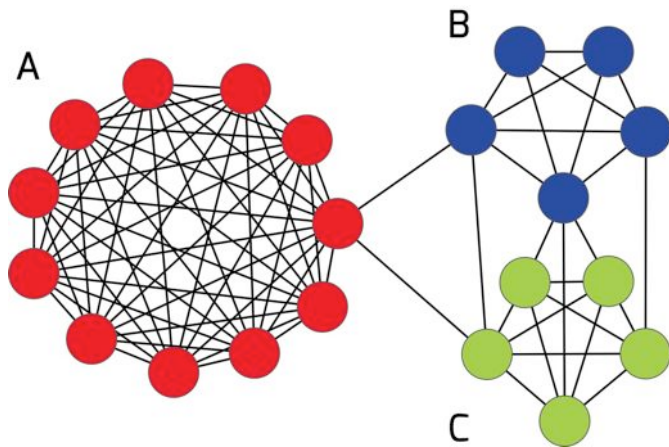


Figura 15-6: Exemplos de uma rede com diferentes módulos representados. Os módulos variacionais B (azul) e C (verde) se encontram praticamente independentes do módulo A (vermelho), porém possuem proteínas em comuns entre si. Contudo, o módulo A pode ser considerado funcional, uma vez que possui apenas uma conexão com cada outro módulo, sendo praticamente independente.

Ao determinarmos a quantidade e o tipo de módulos presentes em uma rede devemos levar em consideração o coeficiente de agrupamento (C_i) ou clusterização. O coeficiente analisa a tendência de um nó de se associar com seus vizinhos (“*cliquishness*”), onde “*clique*” é definido como um grafo maximamente conectado.

Como mencionado anteriormente, a clusterização é dada pela fórmula $C_i = 2n/k_i(k_i - 1)$, onde k_i é o tamanho da vizinhança de vértices (nós) do vértice i , e n é o número de conectores na vizinhança. Assim, quanto maior o coeficiente de clusterização, mais conectado é o *cluster*. Evolutivamente, as proteínas que compõem módulos altamente agrupados tendem a ser conservadas ou perdidas juntamente, caso haja uma variação dentro do grupo.

Outro conceito essencial para entender a formação de um *cluster* em um sistema biológico é a presença de *hubs*. Os *hubs* podem ser classificados em dois grupos:

i) party hubs, proteínas altamente ligadas dentro do seu próprio módulo (in-

tra-módulo), ou seja, ligadas no mesmo tempo e/ou espaço,

ii) date hubs, que são *hubs* que se ligam a diferentes proteínas em diferentes módulos (inter-módulo), ou seja, diferentes tempo e/ou espaços, consequentemente apresentando um papel global na rede (Figura 16-6). Estes termos podem ainda receber denominações específicas no contexto do conceito de centralidades (ver adiante).

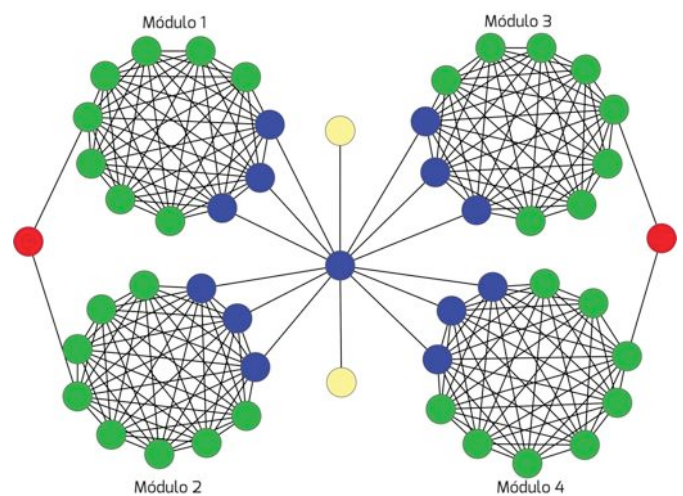


Figura 16-6: Diferentes tipos de centralidade em uma rede biológica. Em verde são apresentadas proteínas envolvidas em *party hubs* e encontradas em módulos. Em amarelo encontram-se as proteínas não-*hub*/não-gargalo, que são aquelas que não possuem alto valor de grau de nó ou *betweenness*, sendo consideradas componentes funcionais dos módulos. Em azul estão as proteínas *hub-gargalo* (*date-hub*) que possuem alto valor de grau de nó e de *betweenness*, sendo consideradas fundamentais para o funcionamento de redes. Em vermelho estão identificadas as proteínas do tipo gargalo, com alto valor de *betweenness* e essenciais na ligação entre módulos e processos biológicos.

Os *party hubs* são componentes clássicos de módulos funcionais, uma vez que estes são quase independentes de outros módulos, enquanto *date hubs* são fundamentais para módulos variacionais, pois estes se ligam a



outros módulos.

Assim, uma mutação em um *party hub* vai afetar principalmente as proteínas referentes ao seu próprio módulo, enquanto a mutação em um *date hub* (Figura 16-6) pode afetar vários módulos. Contudo, não existe diferença de importância entre *party* ou *date hub*. A deleção de um *hub* em um módulo funcional pode ser tão letal quanto a deleção em um módulo variacional.

Baseado em dados estruturais, os *hubs* podem ser ainda classificados em *singlish* (com uma ou duas interfaces) e multi-interface (com mais de duas interfaces). *Hubs* com interface *singlish* somente se ligam a outras proteínas de maneira alternada e transitória, enquanto *hubs* multi-interface se ligam a diferentes proteínas concomitantemente.

Ontologias Gênicas

Nos últimos anos, o desenvolvimento e uso de técnicas de análise como microarranjos, ChIP-chip e espectrometria de massas e suas aplicações no estudo de cada vez mais organismos gerou um grande acúmulo de dados genômicos e proteômicos. A leitura e interpretação simples e concisa destes vem requerendo o desenvolvimento de novas abordagens, contexto no qual, em 1990, foi criado o chamado *Gene Ontology Project*.

Ontologia gênica refere-se ao produto de um determinado gene e à função que ele desempenha na maquinaria celular. São classificadas em três níveis hierárquicos:

- i) Componente celular, descrevendo a localização da proteína na célula;
- ii) Processo biológico, referindo-se à série de eventos realizados por uma ou mais funções celulares;
- iii) Função molecular, descrevendo a atividade que uma dada proteína desempenha no meio celular.

Essas informações são guardadas em forma de “anotações ontológicas”, onde cada uma possui um número de identificação e se encontram disponíveis em bancos de dados como www.geneontology.org.

Da mesma forma, essas anotações não são restritas a humanos, mas abrangem diversos organismos modelo como *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Escherichia coli*, além de outros organismos não-modelo mas que já possuem alguma anotação.

De um modo geral, a ontologia gênica tem como função, em uma rede de interação proteína-proteína, agrupar proteínas que façam parte de um mesmo processo biológico. Em biologia de sistemas o emprego de ontologias gênicas pode se mostrar muito útil para direcionar a análise da rede, possibilitando a verificação dos tipos de processos biológicos existentes na rede e das proteínas presentes. Um modelo hipotético de como uma rede poderia se apresentar em termos de ontologias gênicas se encontra na Figura 17-6, onde diferentes nós poderiam estar relacionados a diversos processos.

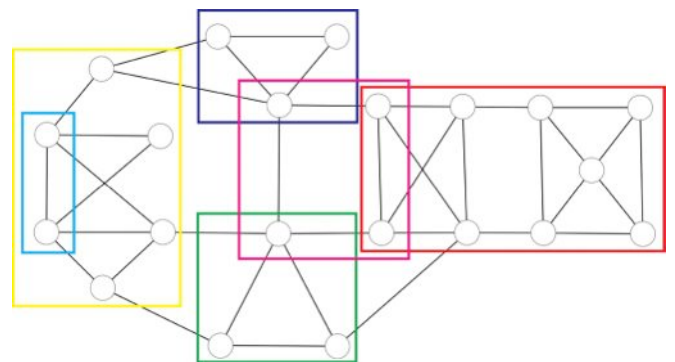


Figura 17-6: Modelo hipotético da presença de ontologias gênicas em uma rede. Na figura acima, cada cor representa um processo identificado. É importante ressaltar que uma proteína pode estar presente em mais de uma ontologia. Da mesma forma, uma ontologia pode estar dentro de outra. Como por exemplo, o quadrado amarelo poderia significar transcrição, enquanto o quadrado azul claro (inserido no amarelo) poderia significar apenas o complexo de iniciação da RNA polimerase II.

A Figura 18-6 mostra um exemplo de aplicação de ontologias gênicas em uma rede biológica. Nessa análise foi utilizado o programa *Biological Network Gene Ontology*



(BiNGO) 2.44, um *plug-in* do programa Cytoscape. É possível, assim, identificar proteínas ou genes com efeitos pleiotrópicos, a saber: a proteína Tp53, a proteína *breast cancer 1* (BRCA1) e a proteína *bloom syndrome protein* (BLM), as quais se encontram nas três ontologias da rede (reparo de DNA, regulação positiva da transcrição e ciclo celular).

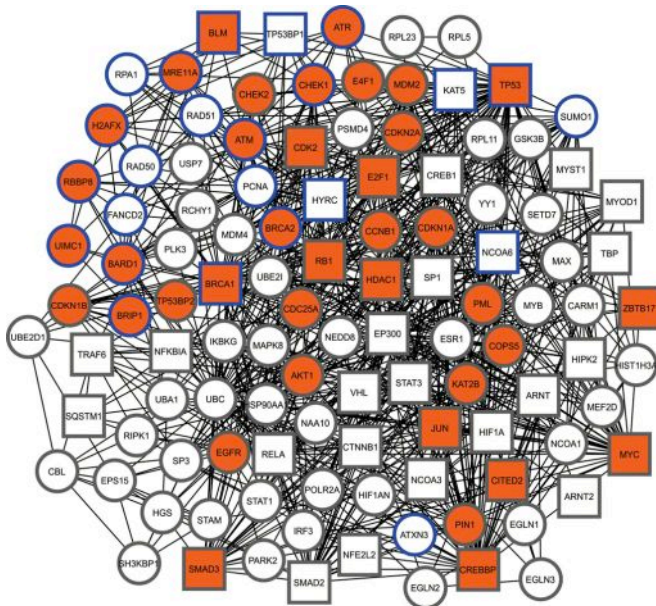


Figura 18-6: Exemplo de uma rede analisada pelo *plugin* BiNGO 2.44, o qual analisa as principais ontologias gênicas. A rede mostra três processos biológicos (GOs): *i*) Regulação do ciclo celular (nós de cor laranja); *ii*) Regulação positiva da transcrição (nós de formato quadrado); *iii*) Resposta a dano de DNA (nós com a linha azul). É possível observar que mais de um nó compõe diferentes GOs.

Centralidades para nós

Como vimos até então, a grande vantagem da biologia de sistemas é permitir a visualização dos componentes moleculares de um sistema biológico de forma dinâmica e global. Contudo, quando falamos de uma rede, temos que levar em consideração todas suas estruturas, como *hubs* e módulos. Deste modo, o objetivo da análise de centralidades é procurar o elementos mais importantes na topologia geral da rede.

Grau de nó

Um dos parâmetros básicos de análise topológica é o parâmetro de grau de nó (ou *node degree*), referente à quantidade de nós adjacentes (diretamente conectados) a outro determinado nó. Esses nós que apresentam uma grande quantidade de conexões são chamados de *hubs*, os quais são conectados a outros *hubs* ou nós com menos conexões (Figura 16-6). Como veremos posteriormente, uma rede de livre escala é definida por uma lei de potenciação, o que significa que essa rede terá poucos nós altamente conectados. O grau de nó é referente ao valor distribuição de nó, $P(k)$, que informa a probabilidade de um nó ter k conexões, conforme visto em *Estrutura de redes*.

Numa visão biológica, podemos exemplificar um *hub* como uma proteína que se liga a várias outras e acaba possuindo uma função regulatória importante na rede. Normalmente, proteínas consideradas apenas *hubs* se encontram dentro de módulos. A perda de conexões de uma proteína *hub* pode lhe tirar esta condição modular. Sua deleção em uma rede de interação proteína-proteína poderia afetar a ação de diversas proteínas vizinhas e até mesmo na formação de módulos.

Betweenness

O parâmetro denominado *betweenness* é definido como o número de caminhos mais curtos que passam por um único nó, estimando a relação entre eles. Por exemplo, para calcular o valor de *betweenness* de um nó n é calculado o número de caminhos mais curtos entre i e j , e a fração deste caminhos que passam pelo nó n . Deste modo, um nó n pode ser atravessado por diversos caminhos alternativos, que ligam i e j .

Matematicamente, o valor de *betweenness* é dado pela seguinte fórmula:

$$Bet(n) = \sum_{i \neq n \neq j \in V} \frac{\sigma_{ij}(n)}{\sigma_{ij}}$$

onde σ_{ij} representam caminhos geodésicos entre os nós i e j , e $\sigma_{ij}(n)$ é o total destes caminhos mais curtos



que passam por n .

Por exemplo, uma proteína com alto valor de *betweenness* apresentaria uma elevada capacidade de interação e/ou sinalização com outras proteínas, processos biológicos ou *clusters*. Uma proteína com tais características é chamada de *bottleneck* ou gargalo. Na Figura 16-6, temos dois exemplos de uma proteína com alto valor de *betweenness*.

Não existe uma maneira óbvia de se encontrar proteínas gargalo. Porém, é possível que rotas de sinalização possuam grande incidência de proteínas gargalo, uma vez que são necessárias para sinalização entre compartimentos e processos biológicos distintos. Contudo, proteínas gargalo não necessariamente possuem um grande número de interações com outras proteínas.

Closeness

O valor de *closeness* pode ser entendido como o caminho mais curto entre um nó n e todos os outros nós da rede, uma tendência de aproximação ou isolamento de um nó (Figura 19-6). Um alto valor de *closeness* indica que todos os outros nós estão próximos do nó n , enquanto que um baixo valor indicaria que os outros nós encontram-se distantes.

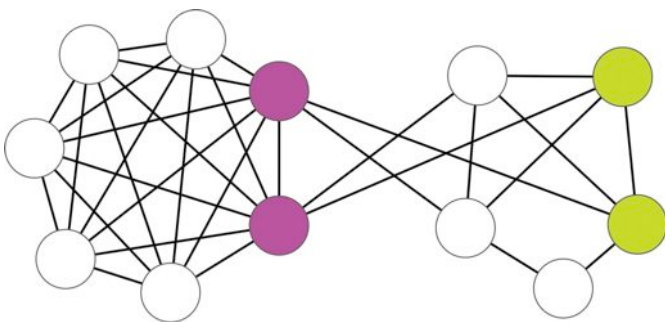


Figura 19-6: Caracterização de nós com diferentes valores hipotéticos de *closeness*. Os nós em roxo, dadas as suas maiores conectividades com a rede no geral, possuem um valor maior de *closeness*, enquanto que os nós em verde, por possuírem poucas conexões com a rede, apresentam baixo valor de *closeness*.

Este parâmetro é dado pela fórmula:

$$Clo(v) = \frac{1}{\sum_{w \in v^{dist}(v,w)}}}$$

onde o valor de *closeness* de um nó v [$Clo(v)$] é determinado através do cálculo e somatório dos caminhos mais curtos entre um nó v e todos outros nós w [$dist(v,w)$] dentro da rede.

Uma proteína com alto valor de *closeness* poderia ser considerada relevante para muitas proteínas, porém irrelevante para outras. Em termos biológicos, ela seria importante na regulação de muitas proteínas, porém sua atividade pode não influenciar outras. Ao compararmos essas informações com módulos podemos dizer que uma rede com uma média de *closeness* alta é mais provável de estar organizada como um módulo funcional, enquanto uma com baixo valor de *closeness* é mais provável de estar organizada como um módulo variacional.

Diâmetro

O diâmetro pode ser considerado um dos primeiros parâmetros referentes à “compactação”, isto é, proximidade dos nós da rede. Ele indica a distância entre os dois nós mais afastados entre si de uma rede. Sendo assim, definimos que uma rede possui um alto diâmetro quando a distância geral entre os nós é muito ampla. Quando a distância entre os nós é pequena, então o diâmetro é baixo. Deste modo, uma rede com baixo diâmetro é considerada mais completa, uma vez que suas proteínas estão mais interligadas entre si.

Um baixo diâmetro pode indicar que as proteínas de uma determinada rede possuem uma maior facilidade de se comunicar e/ou influenciar umas as outras, apontando para uma relação funcional co-evolutiva (Figura 20-6).

Os parâmetros de centralidades podem ser alterados com a adição ou deleção de nós ou conexões na rede (Figura 21-6). Como já mencionado, em um sistema molecular, a perda de uma conexão pode ser considerada a mudança de um domínio, impedindo a ligação

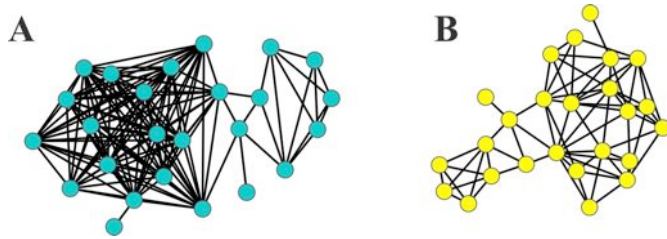


Figura 20-6: Em (A) uma rede com alto diâmetro e em (B) rede com baixo diâmetro. Pelo fato dos nós da figura A estarem mais interligados entre si, a rede é considerada mais “compacta”, pois seus nós mais facilmente podem influenciar uns aos outros. Entretanto, em B, a rede possui muito menos conexões, portanto a deleção de um nó irá afetar a rede de um modo mais sutil.

de duas proteínas ou a mudança de um produto gênico, criando proteínas anormais que não mais farão as mesmas conexões. Contudo, mudanças topológicas nas redes biológicas são processos normais durante a evolução. A deleção e a duplicação de um gene, assim como a perda de interações, sejam pela mudança estrutural ou de função, são processos muitas vezes selecionados e necessários para sobrevivência celular.

Centralidade para conectores

Os elementos mais informativos de uma rede de interação podem ser avaliados através da análise da centralidade. Dentre as possíveis centralidades avaliadas, o *betweenness* de um conector pode medir a influência de certos conectores no fluxo de informações entre os componentes da rede.

O *betweenness* de um conector e é simplesmente o número de caminhos mais curtos entre pares de nós que percorrem e . Se uma rede contém módulos que são conectados por poucos conectores intermodulares, então os caminhos mais curtos entre os diferentes módulos devem passar por estes poucos conectores. Assim, os conectores unindo módulos terão altos valores de *edgebetweenness* (Figura 22-6).

Neste caso, os pares de nós unidos pelos conectores serão de diferentes módulos. Se o valor de *edgebetweenness* de um co-

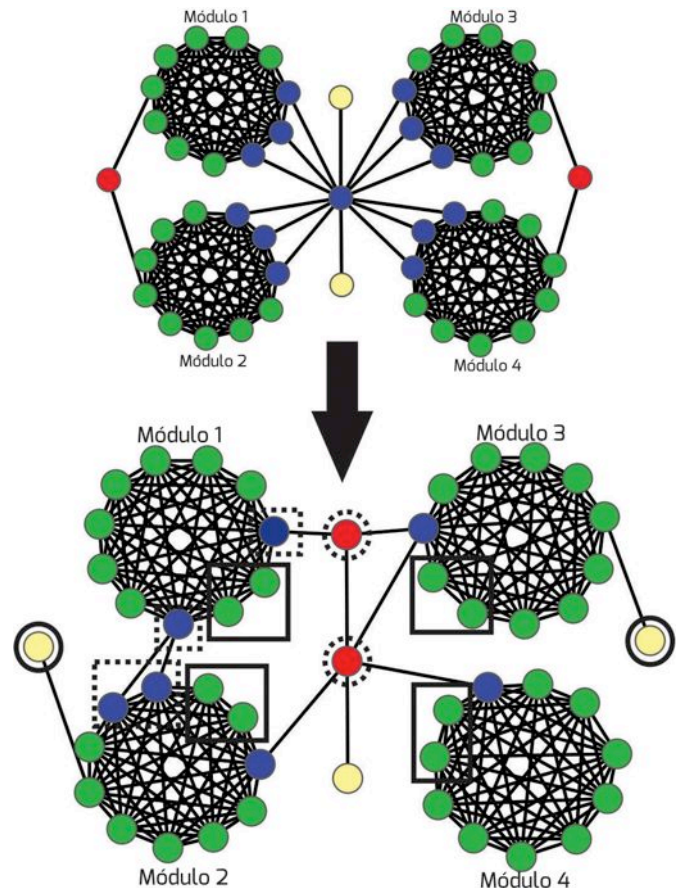


Figura 21-6: Modificações na topologia de rede podem alterar as centralidades. Devido à perda de conexões com nós fora do módulo, os nós marcados pelos quadrados foram transformados em *party-hubs* (nós verdes), deixando de ser *hubs-gargalos* (nós azuis). Porém, marcados pelos quadrados pontilhados, há nós que além de ganharem conexões, passaram a se ligar a outros módulos, saindo do estado de *não-hub/não-gargalo* para *hub-gargalo* (nós amarelos). Marcados por círculos, os nós antes gargalos (nós vermelhos), agora pela perda de uma conexão, se tornam *não-hubs/não-gargalos*. Por fim, os nós marcados pelos círculos pontilhados, devido à perda de muitas conexões (nó central) e ao ganho de uma conexão (nó acima), se tornam gargalos, perdendo os status de *hub-gargalo* e de *não-hub/não-gargalo* respectivamente.

necto é baixo, esse conector provavelmente fará parte do módulo, uma vez que dentro do módulo os nós são mais interligados entre si. Portanto, *edgebetweenness* é a frequência de um conector que se coloca sobre os caminhos mais curtos entre todos os pares de nós. Em

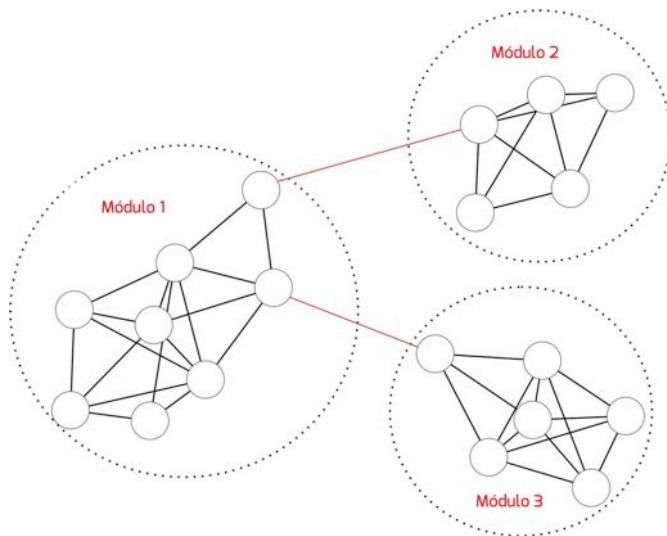


Figura 22-6: Representação de *edgebetweenness*. Conectores em vermelho apresentam valores altos de *betweenness*, pois representam o caminho mais curto do fluxo de informação entre os três módulos representados.

uma rede proteica, um conector com alto valor de *betweenness* provavelmente representa o caminho mais curto de comunicação entre dois processos biológicos.

Como conectores com altos valores de *betweenness* são mais prováveis por posicionarem-se entre módulos, a remoção sucessiva destes conectores pode eventualmente isolar estes mesmos módulos. Essa desordem na rede, conforme será visto adiante, é conhecida como perturbação de conector.

6.5. Tipos de redes

Rede Aleatória

Os matemáticos Paul Erdős e Alfréd Rényi iniciaram seus estudos sobre redes aleatórias em 1960. Este modelo de rede tem impulsionado o interesse de diversos cientistas ao longo dos anos por ser um dos primeiros modelos de rede descoberto. Porém, apesar de amplamente estudadas, redes aleatórias não capturam a realidade de um sistema biológico (Figura 23-6).

Essas redes consistem de N nós, com cada par de nós conectados (ou não) com

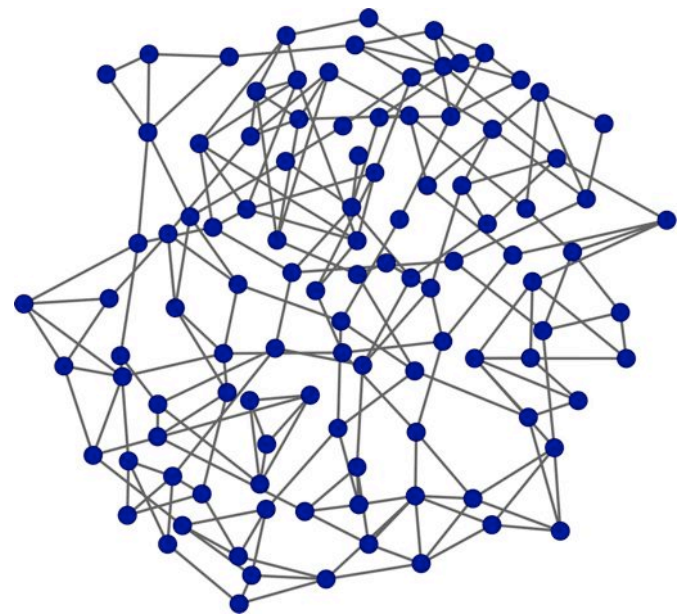


Figura 23-6: Ilustração de uma rede aleatória consistindo em 109 proteínas. A rede apresenta $P(k)$ 3,8. Observe que as conexões de cada nó são valores próximos a 4, o que está de acordo com $k \approx \langle k \rangle$.

probabilidade p , gerando uma rede de conexões aleatórias com aproximadamente $pN \cdot (N - 1) / 2$. Dessa forma, o grau dos nós segue uma distribuição de Poisson com máxima em $\langle k \rangle$ e a maioria dos nós apresentando aproximadamente o mesmo número de conexões $k \approx \langle k \rangle$, com grau próximo ao da média da rede. Raramente surgem nós que apresentam mais ou menos conexões que $\langle k \rangle$. Adicionalmente, redes aleatórias apresentam a propriedade “mundo pequeno” e distribuição de grau exponencial, sendo estatisticamente homogêneas.

Rede de livre escala

O modelo de rede de livre escala foi introduzido por Barabási e Albert em 1999 onde se observa que redes complexas, como as redes de citações de artigos científicos, redes metabólicas, redes sociais e a World Wide Web apresentam distribuição de grau que segue uma lei de potência $P(k) \sim k^{-\gamma}$, $\gamma > 1$. Essas redes são consideradas como livres de escala (Figura 24-6) pois a lei de potência não permite uma escala característica.

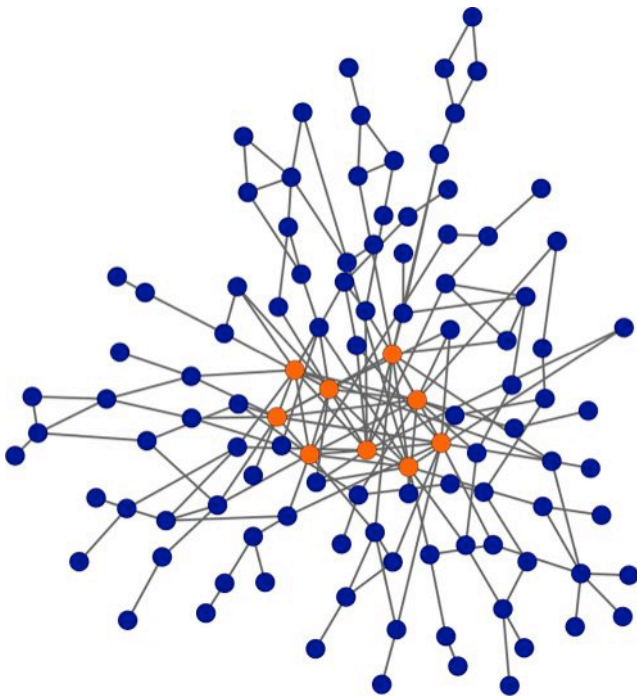


Figura 24-6: Ilustração de uma rede de livre escala consistindo de 109 proteínas, na qual o grau de distribuição segue uma lei de potência. Neste tipo de rede, as proteínas *hubs* (nós laranjas) tem papel essencial na manutenção da integridade da rede.

Diferentemente da rede aleatória que apresenta um número fixo de N nós, as redes de livre escala apresentam uma ordem dinâmica de estruturação que permite o crescimento da rede pela adição de novos nós. Assim, a rede aleatória consiste de um sistema aberto que inicia com um pequeno grupo de nós e aumenta de tamanho exponencialmente no tempo devido à inserção de novos nós. A probabilidade deste novo nó se conectar a nós com grande número de conexões é maior, sendo chamada de conexão preferencial. Por exemplo, imagine que você está buscando um artigo sobre determinado assunto na Internet. Certamente os artigos que você encontrará mais facilmente serão publicações com alto grau de conexão por serem mais conhecidos e bem citados quando comparadas a publicações pouco citadas e, conseqüentemente, menos conhecidas.

Estes dois mecanismos, crescimento da rede e conexão preferencial originaram o algoritmo do modelo Barabási-Albert, que estabelece que o crescimento ini-

cia-se como uma pequena rede, sendo que a cada instante de tempo um novo nó com m conexões é adicionado, onde a probabilidade do novo nó se conectar ao nó i que está previamente presente depende de k_i (grau de i):

$$P(k_i) = \frac{k_i}{\sum_j k_j}$$

Esse crescimento gera uma rede de livre escala com expoente de grau $\gamma = 3$. Após t instantes de tempo, temos uma rede com $N = t + m_0$ e m_t conectores.

As características da rede de livre escala a tornam uma rede que apresenta um pequeno número de nós altamente conectados (*hubs*), o que frequentemente determina suas propriedades. Como já mencionado, falhas na rede (ou remoção de nós aleatórios) apresentam poucas conseqüências, enquanto que o ataque aos nós altamente conectados tornará a rede fragmentada. Em sistemas biológicos, uma rede bioquímica apresenta alta resiliência contra mutações aleatórias, enquanto que os *hubs* podem ser usados como candidatos importantes para alvo de fármacos. Um exemplo disso seria a proteína EF-Tu. Esta proteína tem papel essencial durante a elongação da síntese proteica, sendo inibida pelo antibiótico quirromicina, que impede que o complexo EF-Tu-GDP seja liberado do ribossomo.

Rede Hierárquica

Como já vimos anteriormente, uma rede pode ser avaliada pelo grau de agrupamento (clusterização) de seus nós. Na maioria das redes baseadas em um sistema real (chamadas de redes reais), como por exemplo, parte de uma via metabólica, o coeficiente de clusterização é significativamente maior se comparado a redes aleatórias. Da mesma forma, ocorre a coexistência da propriedade de livre escala e clusterização nas redes reais, como redes metabólicas e de interação proteica. Contudo, grande parte dos modelos propostos para representar estas redes não consegue descrever a livre escala e a clusterização simultaneamente.

Adicionalmente, muitas redes reais



apresentam módulos, ou seja, a rede é composta de subredes funcionalmente separáveis. Esses componentes separáveis apresentam densa conectividade entre os seus próprios nós, com conectividade mais dispersa em relação a componentes de outros módulos. Isso ocorre porque cada módulo apresenta a capacidade de executar uma tarefa identificável, diferente de outro módulo. Contudo, essa “separação” de tarefas não significa que um módulo é independente de outro, mas sim que tem funções distintas.

Dessa forma, é necessário combinar a propriedade de livre escala, o alto grau de agrupamento e a modularidade de uma forma interativa, gerando a rede hierárquica. A estrutura hierárquica é convencionalmente representada por um dendrograma ou uma árvore e atua relacionando os nós mais próximos na rede, conforme Figura 25-6. Essas redes podem ser formadas basicamente pela duplicação de *clusters* e repetidas indefinidamente, integrando uma topologia livre de escala com alta modularidade, resultando em um coeficiente de clusterização independentes do tamanho do sistema. Muitas vezes, em redes reais, a modularidade não apresenta um limite claro, sendo reconhecida principalmente por nós altamente conectados entre si e conectados a outros módulos.

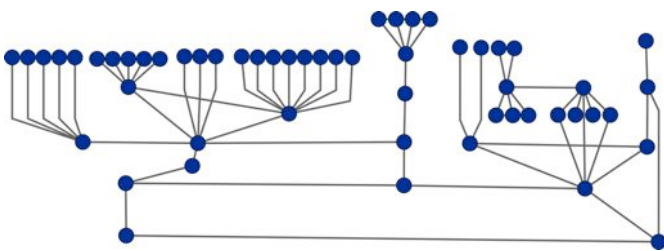


Figura 25-6: Ilustração de uma rede hierárquica consistindo de 55 proteínas em modelo de dendrograma onde é possível observar sua modularidade intrínseca.

A principal característica dessas redes que não é compartilhada por redes aleatórias ou de livre escala é a hierarquia intrínseca, sendo representada também na sua arquitetura. Essa característica hierárquica pode ser, ainda, analisada quantitativamente, como observado por Dorogovtsev e colaboradores em

2002, que construíram um gráfico de livre escala determinístico, na qual o coeficiente de clusterização de um nó que possui k conexões segue a lei de escala $C(k) \sim k^{-1}$. Portanto, o modelo de rede hierárquico integra uma topologia livre de escala com alta modularidade, resultando em um coeficiente de clusterização independente do tamanho do sistema.

6.6. Perturbação e conectores

Como visto anteriormente, um grafo consiste de um conjunto de nós e um conjunto de conectores que conectam esses nós. Portanto, os nós são as entidades de interesse e os conectores representam as relações entre as entidades.

Quando tratamos de sistemas biológicos, podemos levar em consideração diferentes entidades como, por exemplo, DNA, RNA, metabólitos, pequenas moléculas e/ou proteínas. Estes componentes biológicos não atuam isoladamente, mas sim dependem da interação com outros componentes. Para que ocorra essa interação (comunicação) é necessária a presença de conectores.

Conectores podem ser interações físicas, bioquímicas ou funcionais. Por exemplo, em redes metabólicas, conectores podem ser reações que convertem um metabólito em outro ou enzimas que catalisam essas reações; em redes de regulação gênica, conectores podem representar a ligação física de um fator de transcrição nos elementos regulatórios; em redes de doenças, conectores podem representar as mutações genéticas associadas à doença; e em redes proteicas, os conectores podem ser ligações físicas entre as proteínas.

Como apresentado anteriormente, as redes podem ser direcionadas e não direcionadas. Esse comportamento da rede depende da natureza da interação e, obviamente, da direcionalidade dos conectores (Figura 26-6). Em redes direcionadas, a interação entre dois nós tem uma direção bem definida que representa, por exemplo, a direção do fluxo do substrato ao produto em uma rede metabóli-



ca. Em redes não direcionadas, a ligação não tem uma direção definida, tal como a interação física entre proteínas.

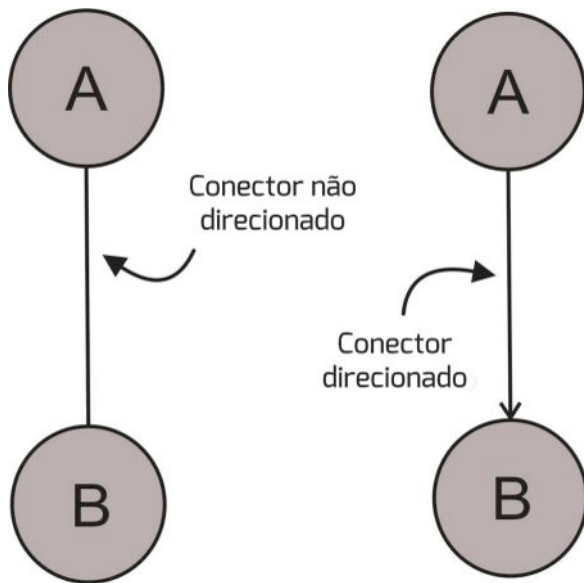


Figura 26-6: Representação de um conector não direcionado e um direcionado.

Na abordagem da biologia de sistemas tão importante quanto conhecer os nós que interagem entre si em uma rede é compreender, por exemplo, que tipo de interação pode ocorrer na rede em questão, quais conectores são mais relevantes à rede e qual o impacto da perturbação de um conector. Nesta seção iremos discutir os tipos de conectores entre diferentes componentes de uma rede envolvendo proteínas e as consequências da ruptura nestas conexões.

Interação proteína-proteína

A interação proteína-proteína é comum e crucial a vários processos celulares, tais como na ligação enzima-inibidor e na interação antígeno-anticorpo. Os diferentes tipos de complexos proteicos têm sido definidos na literatura como obrigatórios e não obrigatórios. No complexo obrigatório, as proteínas não podem funcionar separadamente, diferindo do complexo não obrigatório onde as proteínas associam-se e dissociam-se dependendo de fatores externos, podendo também exercer funções fora do complexo.

De acordo com a estabilidade e o meca-

nismo de formação do complexo, incluindo o tipo de conexão entre as proteínas, as interações podem ser conceitualmente separadas em dois grupos: aquelas que são permanentes e aquelas que são temporárias. E, embora não exista um limite bem definido para essa separação, tendências têm sido observadas em relação a suas propriedades biológicas (Figura 27-6).

Em relação à estrutura, por exemplo, interações temporárias são caracterizadas por interfaces proteicas pequenas, enquanto que as interfaces de proteínas interagindo permanentemente são maiores. Consequentemente, complexos proteicos com interfaces maiores tendem a apresentar um maior grau de mudança conformacional após a ligação. Além disso, componentes de complexos permanentes tendem a ser co-expressos e mais estáveis. Esta estabilidade gera uma pressão seletiva maior e em função disso, uma taxa evolutiva mais lenta.

Como será discutido adiante, interação transitória tende a ser *date*, isto é, as proteínas podem se conectar em diferentes tempos e a interação permanente tende a ser *party*, isto é, conexão proteica forte e constante.

As proteínas com conectores permanentes existem somente em sua forma complexada e são muito estáveis, enquanto aquelas com conectores transitórios possuem a capacidade de associação e dissociação *in vivo*. Dentre as proteínas com conectores transitórios, há aquelas em que a associação/dissociação é resultante de uma conexão com baixa afinidade, porém constante (interações temporárias fracas) e aquelas em que a associação/dissociação é desencadeada por um processo ativo (interações temporárias fortes) como, por exemplo, uma mudança conformacional ocorrida em consequência de um fator ligante.

A diferença entre as interações acima citadas é distinguida puramente pelas propriedades da estrutura da interface proteica, isto é, da superfície de contato das proteínas. Essas propriedades conferem afinidade e especificidade, e são determinadas principalmente por forças intermoleculares como comple-

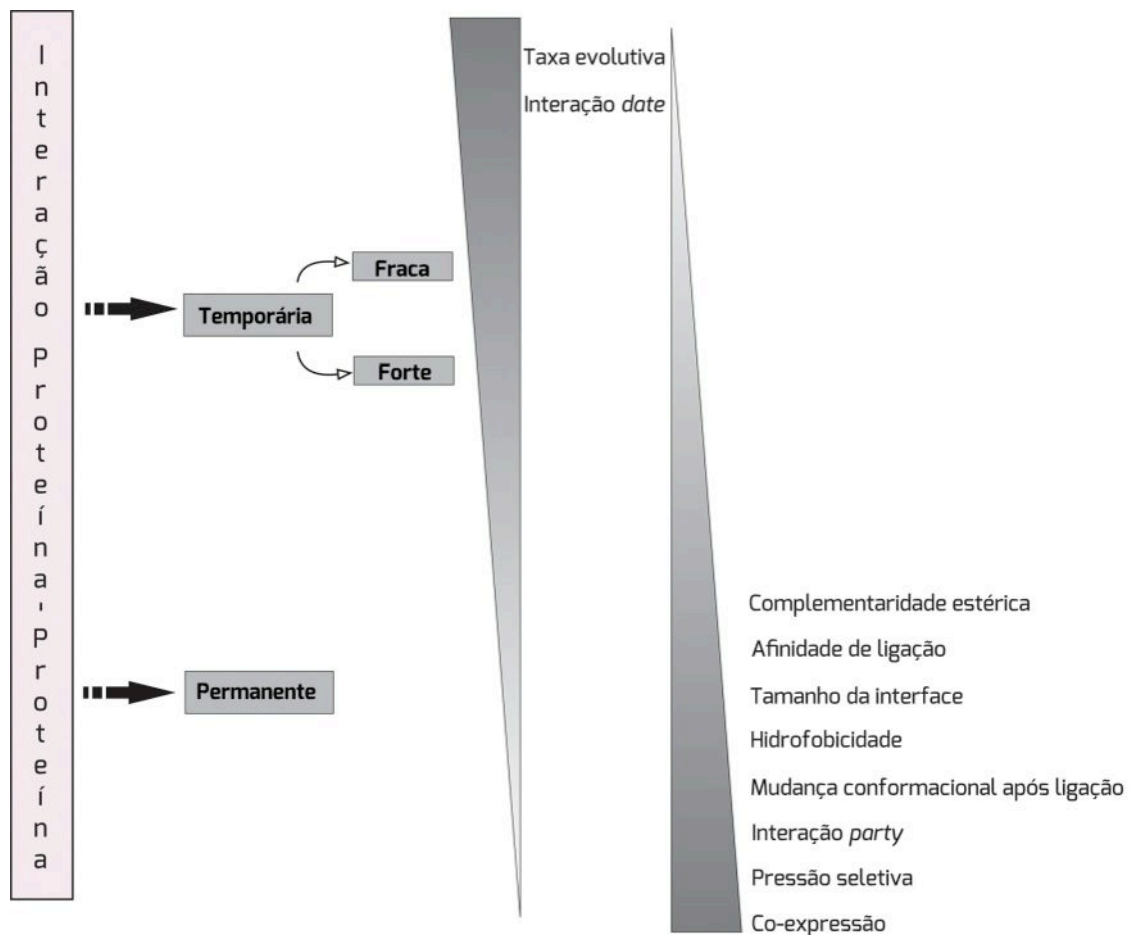


Figura 27-6: Modelo esquemático representando os diferentes tipos de interações proteína-proteína e as propriedades biológicas relacionadas. Quanto maior o tamanho da base e a intensidade da cor do triângulo, maior é a relação entre o modo de interação proteica e a propriedade biológica.

mentaridade estérica, força eletrostática, interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio.

A complementaridade estérica otimiza as interações de van der Waals entre o complexo. Normalmente, estas interações de fraca energia ocorrem em função da polarização transiente de ligações carbono-hidrogênio ou carbono-carbono e, apesar de fracas, são extremamente importantes para o processo de reconhecimento intermolecular pois crescem em intensidade com a área de interação. Complexos com conexões permanentes exibem alta complementaridade estérica nas proteínas em contato, enquanto complexos com conexões temporárias demonstram baixa complementaridade.

Como as interações de van der Waals, as interações hidrofóbicas são pontualmente

fracas e ocorrem em função da interação entre cadeias ou subunidades apolares. Os complexos com conexões permanentes normalmente persistem no estado ligado, sendo a força hidrofóbica mais significativa. Já em conectores transitórios, a alta hidrofobicidade se torna desfavorável, pois esses complexos permanecem ligados por menos tempo.

As forças de atração eletrostáticas são aquelas resultantes da interação entre dipolos e/ou íons de cargas opostas e representam força significativa na interação proteína-proteína, podendo definir o tempo de vida do complexo.

Dentre as forças intermoleculares discutidas acima, o fator dominante da interação permanente entre proteínas consiste nas interações hidrofóbicas, enquanto várias forças



participam de interações temporárias entre proteínas. Além disso, proteínas interagindo de forma temporária possuem interfaces que são menores em tamanho do que as interfaces de proteínas permanentes, os aminoácidos que compõem a interface e a proporção de resíduos hidrofóbicos não diferem drasticamente do resto da superfície proteica e as interfaces são levemente ricas em grupos polares neutros e em água.

O tipo de interação também confere graus diferentes de restrição (pressão seletiva) na evolução da proteína. Proteínas com interação permanente tendem a evoluir em uma velocidade menor comparada a proteínas que formam complexos temporários, bem como possuir pressão seletiva maior e menor plasticidade em sua sequência.

Evidências sugerem que o modelo duplicação-divergência aplica-se à evolução das redes proteicas. Uma das predições é que na duplicação das proteínas algumas ou todas as conexões podem ser herdadas da proteína ancestral. Consistente com esta hipótese, proteínas parálogas tendem a compartilhar padrões de interação em uma frequência maior do que a esperada ao acaso. No entanto, tem sido proposto que depois que a duplicação gênica ocorre, as interações entre as proteínas são rapidamente perdidas. Portanto, duplicações recentes são mais prováveis de compartilhar interações, comparadas a duplicações mais ancestrais.

Outra distinção acerca da interação proteica refere-se à interação funcional e interação física. A interação funcional pode ou não corresponder a uma interação física direta em algum processo biológico. Assim, na interação física, a proteína A conecta-se a proteína B e, na interação funcional, a proteína A atua com a proteína B. Como exemplo de interação funcional podemos imaginar dois produtos gênicos que interagem em uma mesma via em um processo biológico, mas não se conectam fisicamente.

O tipo de interação tem um papel importante na determinação do comportamento das proteínas. Como já vimos, *hubs* são proteínas envolvidas em um grande número de

interações (altamente conectadas) dentro de uma rede proteica. Algumas proteínas *hub* são altamente co-expressas com outras proteínas do módulo, o que implica na existência de complexos estáveis (permanentes). Outras proteínas possuem expressão independente, sugerindo a ligação com proteínas em diferentes tempos, de modo transitório. Esses *hubs* são classificados como *party* e *date hubs*, respectivamente.

Na construção de redes proteicas, a diferenciação entre complexos permanentes e transitórios tem importantes implicações. Por exemplo, na prospecção de novos fármacos, a alteração do padrão de interação entre proteínas temporárias por modulação farmacológica ocorre mais facilmente em comparação a proteínas que formam complexos permanentes. Portanto, uma rede de interação proteica não é um processo estático, mas sim corresponde a um constante fluxo de informações. Por conseguinte, na análise de dados de interação proteína-proteína a discriminação das características da interação e/ou o uso de centralidades de conectores é fundamental para obter modelos mais realísticos.

Interação proteína-ácidos nucleicos

Proteínas que se ligam a ácidos nucleicos têm um papel central em todos os processos regulatórios que controlam o fluxo de informação genética. Por exemplo, proteínas podem inibir, ativar e coordenar a transcrição do DNA, auxiliar e manter o empacotamento e o rearranjo do DNA e o processamento do RNA, coordenar a replicação do DNA, promover a síntese de proteínas e sinalizar o reparo do DNA, entre outros.

Esses possíveis papéis fisiológicos são determinados pela afinidade e especificidade da interação DNA-proteína, que é a habilidade da proteína em distinguir seu sítio de ligação do restante do DNA. Estas propriedades dependem de interações precisas entre a sequência de aminoácidos da proteína e os nucleotídeos do sítio específico de ligação do DNA.



As proteínas que se ligam a ácidos nucleicos podem ser, de forma simplificada separadas em três grupos de acordo com a função:

- i) enzimas, onde a principal função da proteína é modificar a organização do ácido nucleico, como no caso das endonucleases, glicosiltransferases, glicosilases, helicases, ligases, metiltransferases, nucleases, polimerases, recombinases, topoisomerases, translocases e transposases, entre outras;
- ii) fatores de transcrição, onde a principal função da proteína é regular a transcrição e a expressão gênica como por exemplo, TFIIA, TFIIIB, TFB, entre outros;
- iii) proteínas estruturais que ligam-se ao DNA, que têm como principal função suportar a estrutura e a flexibilidade do DNA ou agregar outras proteínas, por exemplo, proteínas centroméricas, proteínas envolvidas no empacotamento e na manutenção/proteção do DNA, proteínas de reparo, proteína envolvidas na replicação e proteínas teloméricas, entre outras.

A interação proteína-proteína também é necessária para uma eficiente interação entre proteínas e ácidos nucleicos. A interação proteína-proteína com o DNA pode ocorrer de três modos de acordo com a direção e o eixo da dupla hélice do DNA (Figura 28-6):

- i) a direção da interação entre as proteínas e o eixo da dupla hélice é perpendicular;
- ii) a direção da interação da proteína é paralela ao eixo da dupla hélice;
- iii) ambos os modos de interação são observados ao mesmo tempo.

Assim como na formação de complexos proteicos, discutido anteriormente, a formação de complexos DNA-proteína ou RNA-proteína também envolve forças intermoleculares, tais como van der Waals, força eletrostática, interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio.

A região da proteína que reconhece a sequência do ácido nucleico é denominada motivo. Os motivos hélice-volta-hélice, dedo de zinco e zíper de leucina são os mais comuns encontrados nas proteínas que interagem com ácidos nucleicos.

O motivo hélice-volta-hélice é um dos elementos normalmente encontrados nos fatores de transcrição e nas enzimas de procariotos e eucariotos, sendo formado por duas hélices α conectadas por uma volta. O motivo liga-se a cavidade maior do DNA e, em muitos complexos, o contato direto é feito entre a cadeia de aminoácido e a sequência de bases do ácido nucleico.

Já o motivo dedo de zinco é encontrado principalmente em fatores de transcrição de eucariotos. Um dedo de zinco é composto por duas folhas β antiparalelas e uma hélice α , sendo o íon zinco fundamental para garantir a estabilidade deste tipo de domínio. Subunidades proteicas contêm múltiplos dedos de zinco.

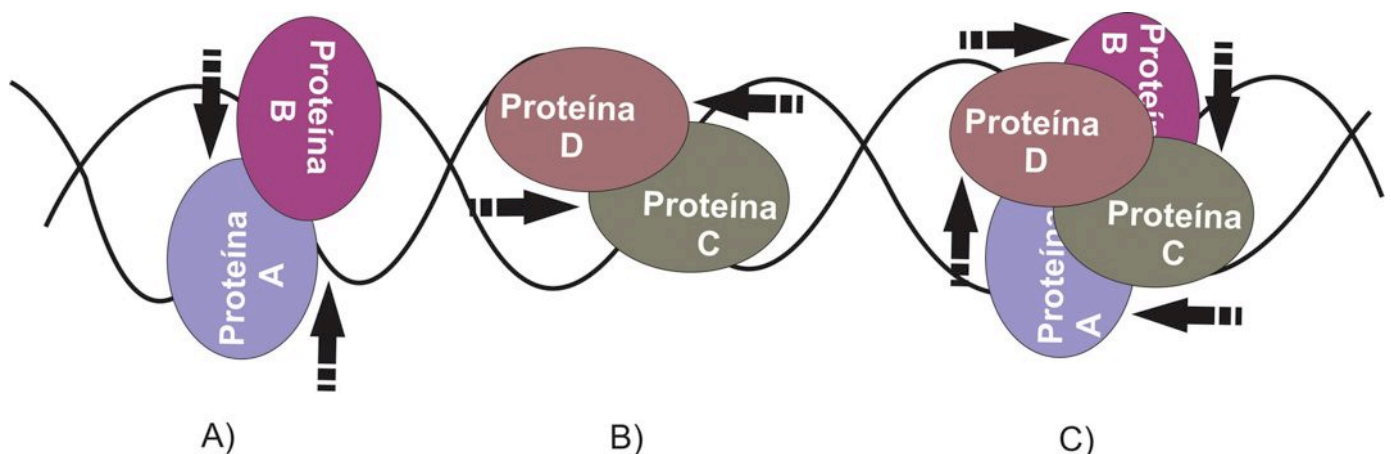


Figura 28-6: Modos de interação proteína-proteína com a dupla hélice do DNA. A) perpendicular; B) paralela e C) ambas as direções são observadas.



co que se enrolam no DNA formando uma espiral, inserindo a hélice α na cavidade maior do DNA.

Fatores de transcrição de eucariotos e procariotos também podem conter o motivo zíper de leucina, encontrado em proteínas regulatórias. Esse motivo é formado por duas hélices α paralelas, unidas por resíduos de leucina.

A estrutura do zíper de leucina pode ser dividida em duas partes: a região de dimerização e a região de ligação ao DNA. A dimerização é mediada pela formação de uma estrutura enrolada na região carboxi-terminal de cada hélice com sete resíduos de leucina. A região que se liga ao DNA, também conhecida como região básica, é encontrada na região amino-terminal da hélice que se projeta na cavidade maior do DNA. Embora motivos de diferentes famílias de DNA sejam similares estruturalmente, pouca homologia é observada fora do motivo. Há baixa identidade entre motivos de diferentes famílias de proteínas e esta variação permite, portanto, o reconhecimento de diferentes conjuntos de sequências de DNA. Além disso, a posição do domínio dentro da cavidade maior do DNA também varia, refletindo a necessidade funcional e estrutural de cada proteína.

A afinidade e a especificidade na ligação de proteínas ao DNA não podem ser endereçados somente a alguns resíduos de aminoácidos, mas o envolvimento de toda a proteína deve ser considerado. Por exemplo, a maioria das proteínas que se ligam ao DNA possuem domínios desordenados que contribuem para o reconhecimento do DNA em vários níveis.

Proteínas com domínios desordenados são proteínas que não apresentam estrutura $2^{\text{ária}}$ e $3^{\text{ária}}$ sob condições fisiológicas e na ausência de ligantes naturais. Essas proteínas possuem alta especificidade e baixa afinidade na interação, são capazes de interagir com mais de uma proteína e alvos de modificações pós-traducionais, possuindo a capacidade de manter sua função mesmo em ambientes extremos. Na interação com o DNA, o domínio desordenado da proteína não é crucial à formação do complexo, mas pode influenciar o reconhecimento da sequência do DNA, conferindo seletividade e afinidade de ligação.

Além da característica das cavidades na molécula de DNA, da presença de motivos específicos nas proteínas ou ainda da ocorrência de domínios desordenados, outros fatores podem influenciar a interação do DNA-proteína, tais como a flexibilidade e a

afinidade da proteína pelo DNA e presença de água no meio.

Muitas proteínas são flexíveis ao ponto de alterar sua conformação quando se ligam ao DNA, enquanto outras são conhecidas por alterar a conformação do DNA após a ligação. A afinidade da interação entre o DNA e uma proteína tende a estar relacionada à relevância funcional da proteína. Por exemplo, a afinidade de um fator de transcrição por seu sítio de ligação é proporcional à ativação que ele exerce. Ainda, alguns contatos mediados por água foram observados entre proteínas e o DNA, participando de redes de ligações de hidrogênio que conferem estabilidade ao complexo.

Interação entre proteínas e pequenos compostos

Considerando-se que a interação proteína-proteína normalmente envolve superfícies relativamente grandes, pode-se imaginar que moléculas menores não seriam efetivas na modulação da ligação dos complexos por apresentarem áreas menores e, por conseguinte, interações menos intensas. Contudo, ao empregarmos estruturas químicas diferentes de aminoácidos, podemos não só compensar esta redução na área de contato mas produzir moléculas com afinidade maior do que os próprios ligantes fisiológicos envolvidos do processo de interesse.

Adicionalmente, estas moléculas de baixa massa molecular tendem a apresentar muitas vantagens terapêuticas em relação a proteínas, dentre as quais se destaca sua maior estabilidade metabólica e consequente maior biodisponibilidade. Podem atuar diretamente – via inibição da interface proteína-proteína – ou indiretamente – via ligação a um sítio alostérico que induz uma mudança conformacional do alvo da proteína ou da molécula associada.

A busca de novos fármacos deve levar em conta o tipo de complexo proteico alvo. A formação de complexos permanentes pode ser considerada uma continuação do enovelamento da proteína, sendo o dobramento fi-



nal das subunidades parte deste processo. Assim, esse tipo de complexo é menos propenso à modulação farmacológica, sendo mais interessante explorar o processo de dobramento em si como alvo de pequenos compostos. Já as interfaces das proteínas de complexos temporários são alvos efetivos ao planejamento de novos moduladores terapêuticos.

Para que pequenas moléculas modulem a interação proteica, estratégias têm sido estabelecidas e dois principais mecanismos de controle regulatório têm sido utilizados: a inibição e a estabilização (Figura 29-6). Das estratégias mais exploradas, destaca-se a inibição da interação proteína-proteína.

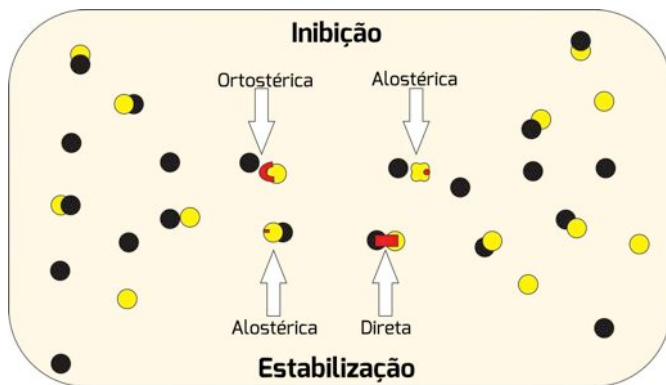


Figura 29-6: Dois principais mecanismos de modulação da interação proteína-proteína utilizando pequenos compostos. Diferentes proteínas são apresentadas em preto e amarelo. Pequenos compostos são apresentados em vermelho.

O modo de ação da maioria dos inibidores de interação proteica é baseado na ligação direta de uma pequena molécula à superfície de interação da proteína ligante, interferindo diretamente nos *hot spots* críticos da interface e competindo com a proteína original. Esse tipo de inibição é conhecido como ortostérica. Na inibição alostérica, pequenos compostos ligam-se a sítios diferentes, causando mudança conformacional suficiente para interferir na ligação da proteína ligante (Figura 29-6).

Pequenas moléculas estabilizadoras da interação proteína-proteína também demonstram dois modos gerais de ação. Pri-

meiro, um estabilizador pode ligar-se a uma única proteína, na qual aumenta a afinidade de ligação mútua das proteínas do complexo de um modo alostérico. Segundo, a molécula estabilizadora liga-se à superfície do complexo proteico, fazendo contato com ambas as proteínas ligantes e aumentando a afinidade de ligação mútua entre elas. Assim, a inibição estabilizadora pode ser denominada alostérica (ligada a uma proteína) ou direta (ligada ao menos a duas proteínas).

A ativação por pequenos compostos é, normalmente, um processo mais intrincado pois, além da ligação, é necessário o correto desencadeamento da cascata de ativação. Compostos que induzem a interação proteica são chamados de dimerizadores. Inúmeras vias de sinalização celular iniciam a partir da dimerização proteína-proteína. A principal ideia do uso de dimerizadores é a indução de interação entre duas proteínas por pequenas moléculas que levam à ativação da via de sinalização celular. Na literatura científica foi observado que dimerizadores podem induzir proliferação celular, transcrição e apoptose.

Perturbação dos conectores

Perturbações podem ocorrer em todos os sistemas, e em sistemas biológicos não é diferente. Nos interatomos, essas perturbações podem variar desde a remoção de um ou mais nós até a remoção de conectores. Desta forma, as consequências na estrutura e na função do sistema irão diferir drasticamente dependendo do tipo de perturbação ao qual a rede foi exposta. Como exemplo, podemos imaginar uma rede de proteínas que confere um fenótipo específico (Figura 30-6).

A remoção do nó não somente incapacita a função deste, mas também a de outros nós, causando a ruptura nas vias de todos os nós vizinhos. Uma perturbação no conector, que remove uma ou poucas interações mas deixa o restante da rede intacta e funcionando, pode ter efeitos mais sutis no sistema, não necessariamente alterando o fenótipo. Contudo, a consequência do desarranjo da rede após a remoção de nós ou de conectores depende da importância do nó e do conector à rede. Essas informações de conectores e nós

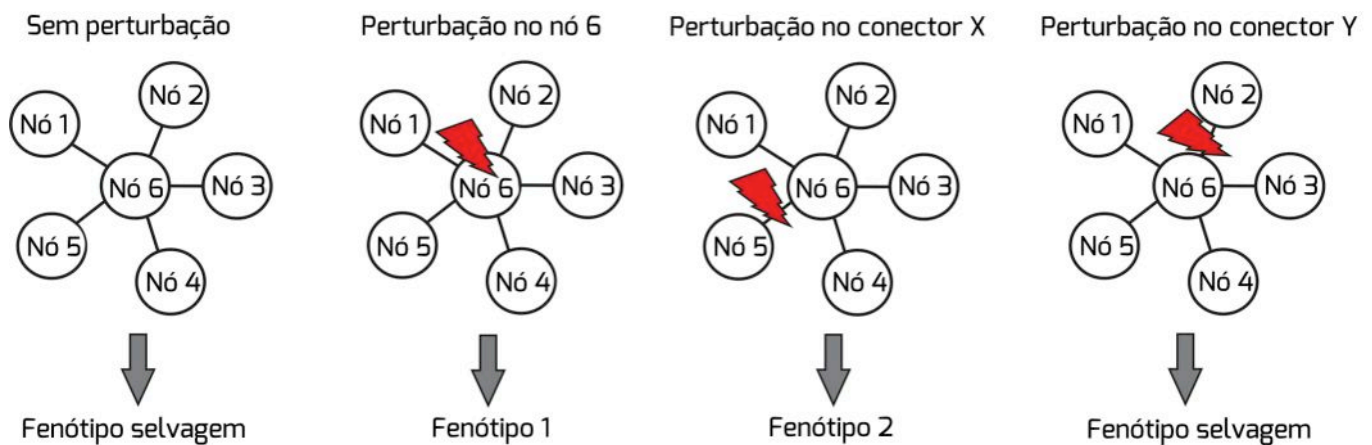


Figura 30-6: Rede hipotética de proteínas relacionada a um fenótipo específico representando diferentes tipos de perturbação e suas consequências. Neste exemplo o nó 5 e o conector entre os nós 5 e 1 são essenciais à manutenção do fenótipo selvagem.

mais informativos de uma rede podem ser obtidas, por exemplo, pela análise da resiliência e percolação da rede, vista anteriormente.

A distinção entre modelos de remoção de nó e perturbação de conectores - alteração interação-específica e conector-específica (*edge-specific* ou "*edgetic*"), respectivamente - pode providenciar novas pistas nos mecanismos básicos de doenças humanas, tais como diferentes classes de mutações que levariam a modos dominantes ou recessivos de herança genética.

Em uma rede proteica, a remoção de um nó pode representar a remoção de uma proteína, causado por uma mutação crítica no gene que desestabiliza a estrutura da proteína. Já a remoção de um conector pode representar uma mudança específica em distintas interações bioquímicas e biofísicas, preservando certos domínios da proteína.

Em relação a genes envolvidos em múltiplas doenças, foi demonstrado que alelos *edgetic* responsáveis por diferentes doenças consistem em distintas perturbações *edgetic* que, por sua vez, tendem a estar localizados em diferentes domínios de interação proteica, conferindo fenótipos diferenciados.

Pesquisadores analisaram cerca de 50.000 alelos mendelianos associados a doenças genéticas hereditárias e observaram que aproximadamente a metade foi potencialmente *edgetic*. Nesta análise foram consideradas deleções e mutações truncadas dentro dos do-

mínios da proteína que grosseiramente desestabilizaram a estrutura da proteína, como remoção de nó, mutações com alteração em quadro de leitura que afetaram sítios de ligação específicos e mutações truncadas que preservaram certos domínios da proteína como perturbação *edgetic*. Alelos truncados foram menos propensos a expressar proteínas estáveis em comparação a alelos que alteraram o quadro de leitura, podendo diferir doenças hereditárias mendelianas envolvendo remoção de nó *versus* perturbação *edgetic*.

Um alelo *edgetic* pode ser identificado pela falta de um subconjunto de interações, quando possuem defeitos nas interações provavelmente devido a mudanças específicas dentro ou próximo a sítios de ligação da proteína ou quando fenótipos *in vivo* diferem daqueles causados por perturbações nulas (genótipos nulos).

Dependendo da rede, o fenômeno de perturbação de um único conector pode ser mais provável do que da remoção de um nó. Dependendo do conector rompido, o impacto à rede pode ser maior, pois diferentes conectores (interações) têm diferentes níveis de importância (vulnerabilidade). Conectores com alto valor de *edgebetweenness* podem causar fragmentação da rede em componentes desconectados, caso sejam rompidos, como por exemplo no caso de conectores entre *clusters*. Esse tipo de conector é assim chamado de *cut-edge*. Já conectores com baixo valor de *edgebetweenness*, quando eliminados da rede, podem ser substituídos por vias alternativas, como por exemplo no caso de



conectores dentro de *clusters*. Assim, conectores *interclusters* tendem a ser mais vulneráveis quando comparados aos conectores *intraclusters* em uma determinada rede.

6.7. Conceitos-chave

Assortatividade: tendência de nós interagirem com nós similares a eles mesmos.

Betweenness: parâmetro que estima a relação entre dois nós, ou seja, leva em consideração a quantidade de caminhos mais curtos que passam entre eles.

Biologia de sistemas: área da bioinformática que estuda sistemas moleculares complexos e como as moléculas interagem entre si.

Caminho: sequência consecutiva de nós em um grafo sem repetições, estando cada nó adjacente interligado por um conector.

Caminho geodésico: definido pela via mais curta dentro de uma rede entre dois nós quaisquer.

Circuito: sequência de nós sem repetição com um conector entre cada par de nós adjacentes na sequência, onde o nó inicial coincide com o nó final.

Clique: é definido como um grafo com alta conectividade entre seus elementos integrantes. Sendo assim, clique também é considerado um sinônimo de *cluster*.

Closeness: valor que indica os caminhos mais curtos entre um nó n e todos os outros nós da rede, uma tendência de aproximação ou isolamento de um nó.

Complexo proteico: grupo de proteínas formado pela associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas.

Comprimento do caminho: definido pelo número de conectores que definem o caminho, ou então, pelo número de nós da sequência

menos um.

Conector *Cut-edge*: conector que quando rompido causa fragmentação da rede.

Date hubs: são hubs que se ligam a diferentes proteínas em diferentes módulos (intermódulo), ou seja, diferente tempo e/ou espaço, conseqüentemente, apresentado um papel global na rede.

Desassortatividade: tendência de nós interagirem com nós diferentes deles mesmos.

Diâmetro: indica a distância entre os dois nós mais afastados entre si de uma rede. Sendo assim, definimos que uma rede possui um alto diâmetro quando a distância geral entre os nós é muito ampla. Quando a distância entre os nós é pequena, então o diâmetro é baixo.

Dimerização: corresponde à união de dois monômeros, formando um dímero. Ou seja, é a formação de uma molécula a partir de duas moléculas menores.

Dimerizadores: compostos que induzem a dimerização, neste caso a interação proteica.

Distribuição de Poisson: distribuição aplicada a probabilidade de ocorrência de um evento em determinado intervalo de tempo.

Edgebetweenness: parâmetro que indica o número de caminhos mais curtos entre pares de nós que percorrem um determinado conector.

Edgetic: perturbação causada em um conector específico, portanto em uma interação específica na rede.

Forças intermoleculares: forças que mantêm as moléculas unidas durante a interação.

Gargalo (*bottleneck*): proteína que apresenta alto grau de *betweenness*.



- Grau de nó (*node degree*):** parâmetro referente à quantidade de nós adjacentes (diretamente conectados) a outro determinado nó.
- Hipergrafo:** rede caracterizada pela presença de hipervértices.
- Hipervértices:** Conectores que interligam nós que apresentam propriedades distintas nos hipergrafos.
- Hot spot proteico:** locais essenciais da interface com alta afinidade de ligação.
- Inibição alostérica de uma proteína:** na inibição alostérica, pequenos compostos ligam-se a sítios diferentes, causando mudança conformacional suficiente para interferir na ligação da proteína ligante.
- Inibição ortostérica de uma proteína:** inibição causada pela ligação direta de uma pequena molécula à superfície de interação da proteína ligante, interferindo diretamente nos *hot spots* críticos da interface e competindo com a proteína original.
- Interface proteica:** área através da qual as macromoléculas se comunicam e exercem sua funcionalidade.
- Modularidade (clusterização):** padrões de conectividade, onde seus elementos constituintes estão agrupados em subconjuntos altamente conectados.
- Multiconector, interações:** quando há dois ou mais conectores ligando os mesmos nós na rede em redes direcionadas.
- Multidígrafo:** rede direcionada com a presença de multiconectores.
- “Mundo pequeno”, efeito:** define que existe um caminho mínimo entre um nó de origem e um nó de destino.
- Ontologia gênica:** tipo de análise que tem como função, em uma rede de interação proteína-proteína, agrupar proteínas que façam parte de um mesmo processo biológico.
- Party hubs:** proteínas altamente ligadas dentro do seu próprio módulo (intra-módulo), ou seja, ligação no mesmo tempo e/ou espaço.
- Pleiotrópico, efeito:** proteínas pleiotrópicas são aquelas que apresentam múltiplos efeitos em um sistemas biológico.
- Rede:** representação gráfica da interação entre nós por meio de vértices.
- Rede bipartida:** existe uma partição da rede, por exemplo, partição A e partição B, sendo os nós presentes na partição A adjacentes apenas a nós da partição B, e vice-versa.
- Rede direcionada:** apresentam conectores que orientam o fluxo da informação em uma direção.
- Rede não direcionada:** os conectores desta rede não apresentam uma direção orientada.
- Rede ponderada:** são redes que se caracterizam pela presença de atributos associados a conectores e nós.
- Resiliência:** capacidade de uma rede a tolerar a deleção de seus nós por falha ou ataque.
- Taxa evolutiva:** medida das mudanças ocorridas numa entidade (gene, proteína, organismo, população) evolutiva ao longo do tempo.
- Teoria da Percolação:** tem por objetivo investigar o comportamento das propriedades de conectividade de uma rede.
- Topologia de redes:** estrutura e disposição de conexões entre os nós.
- Vulnerabilidade do conector:** grau de importância do conector.



6.8. Leitura recomendada

- BARABÁSI, Albert-László; OLTVAI, Zoltán N. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nat. Rev. Genetics**. 5, 101-113, 2004.
- GURSOY, Attila; KESKIN, Ozlem; NUSSINOV, Ruth. Topological Properties of Protein Interaction Networks from a Structural Perspective. **Biochem. Soc. Trans.** 36, 1398-1403, 2008.
- LEVY, Emmanuel D.; PEREIRA-LEAL, Jose B. Evolution and Dynamics of Protein Interactions and Networks. **Cur. Op. Struct. Biol.** 18, 1-9, 2008.
- MASON, Oliver; VERWOERD, Mark. Graph theory and networks in Biology. **IET Systems Biol.** 1, 89-119, 2007.
- NEWMAN, Mark E. J. The structure and function of complex networks. **SIAM Rev.** 45, 167-256, 2003.
- YU, Haiyuan; et al. The Importance of Bottlenecks in Protein Networks: Correlation with Gene Essentiality and Expression Dynamics. **PLoS Comp. Biol.** 3, e59, 2007.
- WAGNER, Günter P.; PAVLICEV, Mihaela; CHEVERUD, James M. The road to modularity. **Nat. Rev. Genetics**. 12, 921-931, 2007.

Capítulo II

The importance of sphingolipids and reactive oxygen
species in cardiovascular development

Artigo publicado no periódico *Biology of the Cell*

The importance of sphingolipids and reactive oxygen species in cardiovascular development

Joice de Faria Poloni, Henrique Chapola, Bruno César Feltes and Diego Bonatto¹

Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

The heart is the first organ in the embryo to form. Its structural and functional complexity is the result of a thorough developmental program, where sphingolipids play an important role in cardiogenesis, heart maturation, angiogenesis, the regulation of vascular tone and vessel permeability. Sphingolipids are necessary for signal transduction and membrane microdomain formation. In addition, recent evidence suggests that sphingolipid metabolism is directly interconnected to the modulation of oxidative stress. However, cardiovascular development is highly sensitive to excessive reactive species production, and disturbances in sphingolipid metabolism can lead to abnormal development and cardiac disease. Therefore, in this review, we address the molecular link between sphingolipids and oxidative stress, connecting these pathways to cardiovascular development and cardiovascular disease.

Introduction

Sphingolipids are bioactive lipids that were originally described at the end of the 1980s as signalling and regulatory molecules (Figure 1; Hannun and Bell, 1989). Sphingolipids, such as ceramide and sphingomyelin, are largely concentrated in the cytoplasmic membrane, where they mainly associate with membrane microdomains termed lipid rafts (Parton and del Pozo, 2013).

Numerous studies have linked sphingolipids to different biological processes related to embryonic stem cells, including the promotion of cell survival through proliferation, the regulation of gene expression related to pluripotency, differentiation, inflammation, apoptosis, cell cycle regulation, cell polarity and migration (Inniss and Moore, 2006; Wendler and Rivkees, 2006; Avery et al., 2008; Bieberich,

2011). It was also observed that sphingolipids exert a role in cardiovascular development by inducing the maturation of the mice embryonic vascular system and altering cardiac morphology in zebrafish and mouse embryos (Kupperman et al., 2000; Kono et al., 2004; Wendler and Rivkees, 2006). In addition, sphingolipids may be associated with reactive oxygen species (ROS) signalling (Maceyka et al., 2007). Current evidence suggests that the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate (S1P) is directly related to the oxidative stress response (Maceyka et al., 2007). The disruption of oxidative homeostasis promotes the production of excessive amounts of ROS, which oxidises biological molecules, altering their structural properties and impairing their role in multiple cellular processes (Ufer and Wang, 2011).

During embryo development, redox balance is essential for cardiac development, as it is associated with cardiac tissue remodelling, contractility and differentiation (Ufer et al., 2010; Santos et al., 2011). However, evidence suggests that excessive ROS formation is detrimental to heart function, as it is associated with cardiac malformations and cardiovascular disease (Das and Vasudevan, 2007; Ku and Dulskien, 2008; Ribas et al., 2011; Thompson and Al-Hasan, 2012; De Marchi et al., 2013).

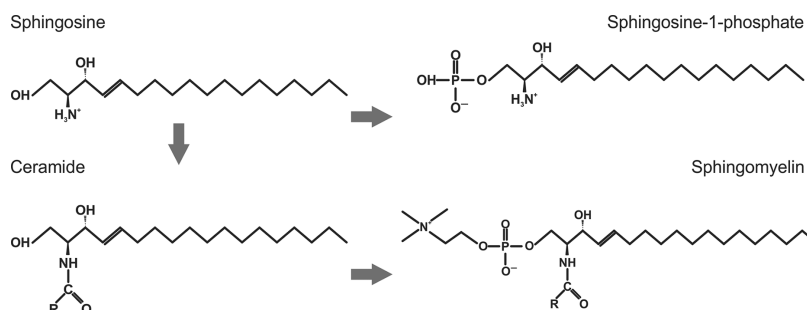
¹To whom correspondence should be addressed (email diegobonatto@gmail.com)

Key words: Cardiovascular development, Cardiogenesis, Reactive oxygen species, ROS, Sphingolipids.

Abbreviations used: AV, atrioventricular; CAT, catalase; CHD, congenital heart defect; CK, creatine kinase; CS, ceramide synthase; DMS, N,N-dimethyl-sphingosine; EC, endocardial cushion; EMT, epithelial to mesenchymal transitions; eNOS, endothelial NO synthase; ERM, ezrin radixin and moesin; FRs, folate transporters; GPX, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; GSX, glutathione; ROS, reactive oxygen species; S1P, sphingosine-1-phosphate; SOD, superoxide dismutase; SMase, sphingomyelinase; TRX, thioredoxin.

Figure 1 | Schematic representation of the structure of major sphingolipids

Sphingolipids are characterised as amphipathic molecules, composed of a sphingoid backbone, represented by the amino alcohol sphingosine, which can be converted to ceramide by the attachment of a fatty acid to carbon 2 by an amide bond. Ceramide and sphingosine can be converted to S1P or sphingomyelin by the addition of a phosphate group or phosphocholine to carbon 1, respectively.



The aim of this review is to explore the relationship between sphingolipids and oxidative stress and its importance in cardiovascular development and disease.

Oxidative stress and antioxidant mechanisms during embryonic development

The accumulation of excessive ROS can promote oxidative stress specifically during embryogenesis (Ufer and Wang, 2011). The mammalian embryo is highly susceptible to alterations in redox homeostasis; an imbalance in redox homeostasis promotes developmental retardation, organ malformation or even embryonic lethality (Guérin et al., 2001; Ufer and Wang, 2011). In this sense, antioxidant mechanisms are required to mediate redox homeostasis in the intracellular environment and to protect the embryo against oxidative damage (Guérin et al., 2001; Harvey et al., 2002; Ufer et al., 2010; Ufer and Wang, 2011).

Antioxidant mechanisms can be classified as non-enzymatic or enzymatic (Ufer and Wang, 2011); however, antioxidant enzyme activity is much lower during embryogenesis than in the adult (Ufer et al., 2010; Ufer and Wang, 2011). Briefly, these antioxidant enzymes include catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase, thioredoxin (TRX) reductase and superoxide dismutase (SOD; Guérin et al., 2001; Ufer and Wang, 2011).

During embryonic development, deletions or deficiencies in the activity of these enzymes have been

associated with cellular stress sensitisation, as occurs in GPX1 deficiency, which results in apoptosis (Ufer and Wang, 2011). In contrast, apoptosis was suggested to lead to embryonic death as observed in GPX4-deficient mice (Ufer and Wang, 2011). However, MnSOD knockout impairs mitochondrial function and a study showed that newborn mice MnSOD^{-/-} died soon after birth (Li et al., 1995). In addition, MnSOD knockout mice showed dilated cardiomyopathy, with increased left ventricle cavity diameter, reduced wall thickness and endocardial fibrosis (Li et al., 1995). Moreover, TRX acts protecting the preimplantational embryo against oxidative stress and TRX knockout is lethal during this period, associated with reduced proliferation and increased apoptosis (Kobayashi-Miura et al., 2007). Mice with TRX2-reductase deficiency in cardiac tissues showed dilated cardiomyopathy and congestive heart failure, dying soon after birth (Kobayashi-Miura et al., 2007). Finally, CAT-deficient mouse showed normal development, although tissues deficient in CAT have delayed H₂O₂ metabolism (Ho et al., 2004).

The non-enzymatic defence includes uric acid, ascorbic acid, tocopherol and glutathione (GSH), hypotaurine and taurine (Guérin et al., 2001; Ufer and Wang, 2011). GSH biosynthesis occurs during oocyte maturation, where it is required for the maintenance of the meiotic spindle and embryonic protection against ROS damage up to the blastocyst stage, while the inhibition of GSH synthesis causes DNA damage (Guérin et al., 2001; Ufer and Wang, 2011). In contrast to the negative effect of excessive ROS

Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

production, low and intermediate levels of ROS are essential to promote neuronal differentiation, digit formation and progression to the blastocyst stage (Dennerly, 2007). In the blastocyst, ROS production regulates programmed cell death, and ROS bursts induce zona pellucida lysis, allowing the implantation of the blastocyst into the uterine wall (zona hatching; Ufer and Wang, 2011). In addition, ROS is involved in oocyte apoptosis and the stimulation of postovulatory aging (Ufer and Wang, 2011).

Studies have shown that sphingolipid metabolites regulate redox homeostasis through NADPH oxidase, NOS, antioxidant enzymes and mitochondrial integrity (Fernández-Checa, 2003; Won and Singh, 2006). Thereby, ROS can act as a second messenger molecule, whereas sphingolipid metabolites regulate the role of ROS as a signalling molecule.

The influence of sphingolipids on cardiac development

Sphingolipid turnover is regulated in a spatiotemporal manner, and is able to form hundreds of structures with many potential combinations that can be attached to the sphingoid base (Figure 2; Futerman and Hannun, 2004).

Recently, sphingolipids have been observed to be required for cell fate commitment in the adult, progenitors and embryonic stem cells (Kleger et al., 2011). In addition, sphingolipids have been described to affect cardiovascular tissue by modulating differentiation and mesoderm development (Kleger et al., 2011).

During embryonic development, the heart is the first organ formed through multiple steps involving simultaneous differentiation and morphogenesis (Yamagishi et al., 2009; Norden and Kispert, 2012). The structural and functional complexity of a mature heart is the result of developmental processes that lead to tube formation, heart looping, cardiac septal formation and cardiac valve development (Yamagishi et al., 2009; Norden and Kispert, 2012). Perturbations in these processes can contribute to congenital heart diseases (Wendler and Rivkees, 2006).

In mouse embryo, the first step of cardiogenesis occurs during embryonic day 6–7 (E6–7), when cardiac precursor cells from the primitive streak migrate to form two bilateral regions in the anterior lateral plate mesoderm and converge to form the cardiac

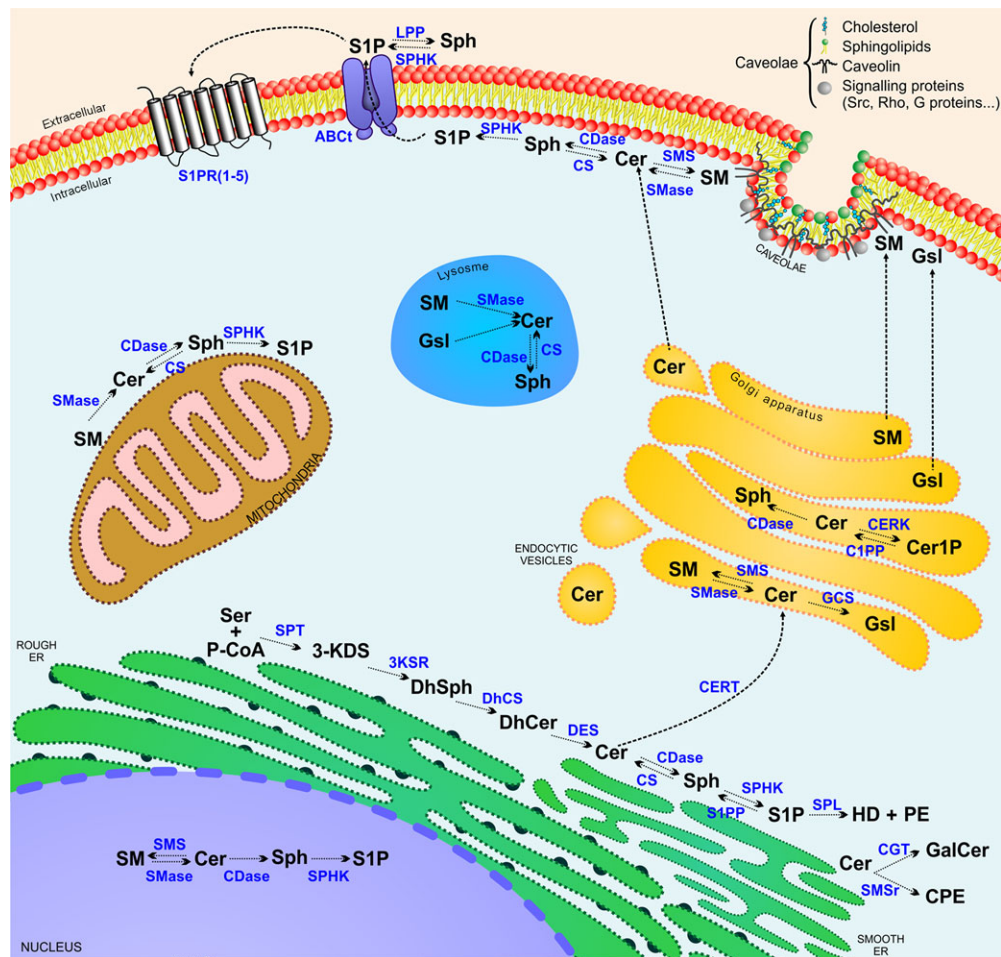
crescent at the embryonic midline (Yamagishi et al., 2009; Norden and Kispert, 2012). A study in *Danio rerio* (zebrafish) demonstrated that cells mutant for the homolog of mammalian S1P membrane receptor 2 (S1PR₂), encoded by the *mil* gene, form two laterally positioned hearts, known as cardia bifida (Matsui et al., 2007). Cardia bifida occurs because of a decreased migration capacity of the cardiac precursor cells due to inappropriate cell–fibronectin interactions; these inappropriate interactions prevent the cardiac precursor cells from migrating from their bilateral positions toward the midline, where the fusion of the heart normally occurs (Matsui et al., 2007). S1PR₂ is a member of the S1P membrane receptor family, composed of S1PR₁, S1PR₂, S1PR₃, S1PR₄ and S1PR₅. S1PR₂ also belongs to the family of G protein-coupled receptors (Takuwa et al., 2008; Schwalm et al., 2013). These receptors are activated by S1P in the extracellular milieu and act by triggering distinct intracellular signalling pathways (Takuwa et al., 2008; Schwalm et al., 2013). Additionally, knockdown of zebrafish S1PR₁ transcript resulted in pericardial oedema and vascular defects, including an improperly looped heart that beat slowly (Mendelson et al., 2013).

During the course of cardiac development, the looped heart undergoes a series of remodelling processes to create the endocardial cushion (EC) at the outflow tract and atrioventricular (AV) canal, which are the precursors of cardiac valves (*e.g.*, aortic, pulmonary, mitral and tricuspid valves; Person et al., 2005). The EC forms from the proliferation of the endocardial cells that undergo epithelial to mesenchymal transitions (EMT), and they progressively migrate into the cardiac jelly until opposite ends come into contact and begin to fuse (Person et al., 2005; Ray and Niswander, 2012).

A study previously indicated that mouse embryos treated with exogenous S1P display disrupted cardiac morphology at E7.5 and abnormal EC development at E9.5 (Wendler and Rivkees, 2006). Furthermore, AV canal explants from E9.5 mouse embryos treated with different concentrations of exogenous S1P showed an inhibition of cellular outgrowth but no changes in heart beats after 24 h (Wendler and Rivkees, 2006). However, mouse embryos treated with N,N-dimethyl-sphingosine (DMS), a non-selective inhibitor of the two major proteins that phosphorylate sphingosine to form S1P, sphingosine kinases 1

Figure 2 | Representation of the sphingolipid metabolic pathway in eukaryotic cells

Sphingolipid biosynthesis starts with Ser and P-CoA condensation catalysed by SPT, forming 3-KDS, which is reduced to DhSph by the 3KSR and N-acylated by the DhCS, generating DhCer. In the next step, DES converts DhCer to a various chain-length Cer. SMSr or CGT can convert Cer to CPE or GalCer, respectively. Cer requires CERT and endocytic vesicles to be transported to the luminal side of the Golgi apparatus. Furthermore, Cer may be converted to SM by SMS activity, which transfers phosphocholine from phosphatidylcholine to Cer. Alternatively, Cer can be phosphorylated by CERK to form Cer1P or catalysed by GCS to form glucosylceramide and the more complex Gsl. SM, Gsl and Cer are transported to the plasma membrane, where the concentration of SM and Cer is modulated by the activity of SMS and SMase, which hydrolyse SM to Cer. In addition, Sph is formed by the deacylation of Cer by CDase and is reversed by CS. SPHK phosphorylates Sph to form S1P. ABC transporters mediate the export of S1P. Once in the extracellular milieu, S1P can elicit intracellular actions through S1PR₁₋₅. S1P production is negatively regulated through a reversible conversion that is induced by SPP1 and extracellular LPP. Alternatively, it is irreversibly degraded by SPL, forming HD and PE. 3-KDS, 3-ketodihydroshpingosine; 3KSR, 3-ketosphinganine reductase; ABCt, ABC transporter; C1PP, ceramide-1-phosphate phosphatase; CDase, ceramidase; Cer, ceramide; Cer1P, ceramide-1-phosphate; CERK, ceramide kinase; CERT, ceramide transporter; CGT, ceramide galactosyltransferase; CPE, ceramide phosphoethanolamine; DES, dihydroceramide desaturase; DhCer, dihydroceramide; DhCS, dihydro(ceramide) synthases; DhSph, dihydroshpingosine; GalCer, galactosylceramide; Gsl, glycosphingolipids; GCS, glucosylceramide synthase; HD, hexadecenal; LPP, lipid phosphate phosphatase; P-CoA, palmitoyl-CoA; PE, phosphoethanolamine; S1P, sphingosine-1-phosphate; S1PR₍₁₋₅₎, S1P membrane receptors; S1PP, S1P phosphatase; Ser, serine; SM, sphingomyelin; SMS, sphingomyelin synthase; SMSr, sphingomyelin synthase related protein; Sph, sphingosine; SPHK, S1P kinase; SPL, S1P lyase; SPT, serine palmitoyl transferase.



Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

and 2 (SPHK1 and SPHK2), displayed reduced heart beating after 24 h and cell death in AV canal explants (Wendler and Rivkees, 2006). In addition, exogenous S1P or DMS treatment blocked EMT in AV canal explants by preventing the cells from adopting fibroblastic phenotypes, including the formation of filopodia or lamellipodia, protrusions required for EMT (Wendler and Rivkees, 2006; Yilmaz and Christofori, 2009). Nonetheless, co-treatment of AV canal explants with low amounts of S1P (0.5 μ M) and DMS (2.5 μ M) rescue EMT (Wendler and Rivkees, 2006). Hence, these experiments demonstrate that different mechanisms responsible for EC development are sensitive to alterations in S1P levels (Wendler and Rivkees, 2006).

Furthermore, the ERM family (ezrin, radixin and moesin) of cytoskeletal proteins have been implicated in efficient EMT (Haynes et al., 2011). ERM family proteins have also been reported to be sphingolipid targets. The sphingolipids act by activating or deactivating ERM proteins to modulate the cytoskeleton and cell behaviour (Adada et al., 2013). This protein family interacts with the actin cytoskeleton at the cell cortex and regulates cell morphology and cytoplasmic membrane protrusions (lamellipodia and filopodia), cell polarisation, adhesion, migration and invasion (Adada et al., 2013). ERM proteins are modulated by phosphorylation, which promotes their activation by a conformational change; S1P has been shown to stimulate the hyperphosphorylation of ezrin, whereas ceramide has an opposite effect, promoting the dephosphorylation of ezrin (Adada et al., 2013).

Additionally, loss of *Cert*, an ER-to-Golgi ceramide transporter protein is lethal, as *Cert* knockout mice died at E11.5 and showed cardiac abnormalities, such as swollen, thin and transparent walls of the outflow tract and throughout the entire heart (Wang et al., 2009). They also displayed blood accumulation and weaker ventricle contraction compared with a wild-type embryonic heart (Wang et al., 2009). Cardiac tissue expresses S1PR₁, S1PR₂ and S1PR₃, which act in signal transduction by mediating G_i, G_q and G_{12/13} proteins (Kawabori et al., 2013; Takuwa et al., 2013). Therefore, S1PR₁, S1PR₂ and S1PR₃ act by coordinating the maturation of the vascular network (Kono et al., 2004). Studies showed that loss of *S1pr1* results in embryonic lethality at E12.5-E14.5 due to severe haemorrhage (Kono et al., 2004). In contrast, *S1pr2*^{-/-} or *S1pr3*^{-/-} does not cause abnormal-

ities, indicating a possible cooperative or redundant role of S1PR₂ and S1PR₃ with S1PR₁ (Kono et al., 2004). Consistent with these results, S1PR₁ is essential for vasculogenesis, as it promotes the interaction of endothelial cells and smooth muscle cells required for vessel remodelling and vasculature stabilisation (Kono et al., 2004).

Thus, cardiovascular development is sensitive to alterations in sphingolipid metabolism, which mainly affects cytoskeletal remodelling by promoting the disruption of cell migration, cardiac contractility and EMT.

ROS as a signalling molecule and its interaction with sphingolipids

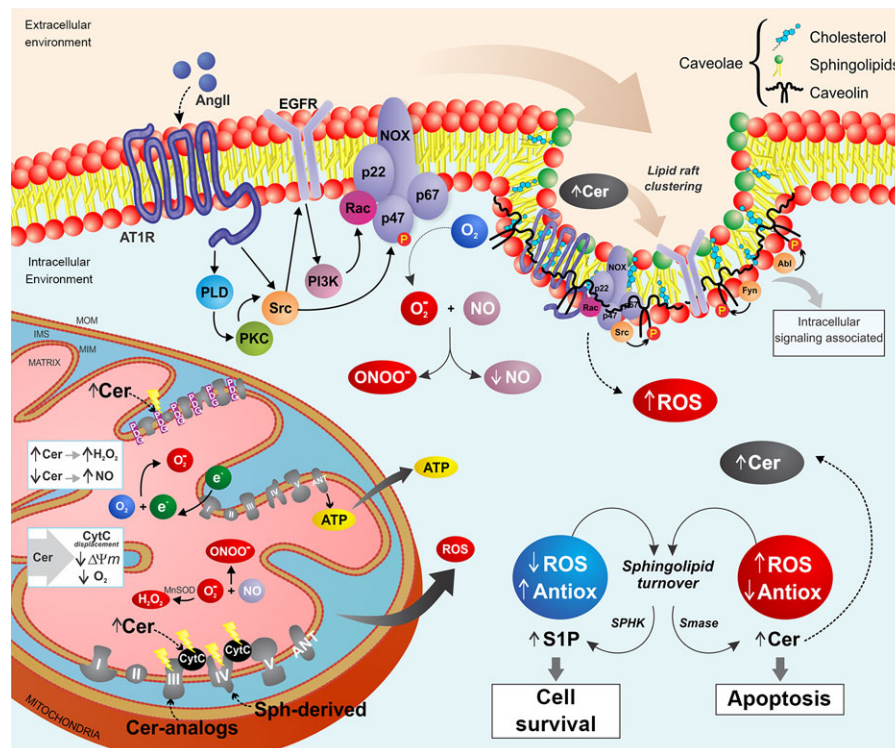
It was previously shown that an increase in ROS levels, together with a decrease in antioxidant activity, is related to the generation of sphingolipids, such as sphingosine, S1P and ceramide, and the stimulation of sphingolipid turnover (Figure 3; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011). For example, mitochondrial ceramide can interact with cytochrome *c*, promoting cytochrome *c* displacement from the mitochondrial membrane, resulting in the reduction of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and decreased oxygen consumption (Figure 3; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011).

Ceramide acts as a central molecule required for the formation of complex sphingolipids, and it is also a component of the mitochondrial inner and outer membrane (Nikolova-Karakashian and Reid, 2011; Kogot-Levin and Saada, 2013). In addition, ceramide synthase 2 (CS-2), sphingomyelinase (SMase) and ceramidase were reported in mitochondria; interestingly, ceramide formation can occur in the mitochondrial matrix and outer mitochondrial membrane (Figure 2; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011; Novgorodov et al., 2011; Kogot-Levin and Saada, 2013). It was observed that knockout of *Cert* promotes ceramide accumulation in mitochondria, indicating that CERT is associated with mitochondrial ceramide (Nikolova-Karakashian and Reid, 2011; Kogot-Levin and Saada, 2013).

Furthermore, ceramide analogues, which can act on isolated mitochondria, promote an increase in ROS production, inhibiting complex III and stimulating the production of H₂O₂ at high ceramide concentrations, while NO is stimulated at low ceramide

Figure 3 | Schematic summarising the connection between sphingolipids and ROS

Low/moderate ROS levels associated to the presence of antioxidants in the cell leads to the activation of SPHK, inducing S1P synthesis and promoting cell survival. However, an increase in ROS production and SMase activation, results in ceramide accumulation, which leads to cell apoptosis. Increased ceramide levels also are able to impair the mitochondrial functions. Mitochondrion is represented with its electron transport chain composed of the protein complexes (I–V) in the inner mitochondrial membrane. The impairment of complex III and complex IV by sphingosine-derived lipids and ceramide analogues are associated with ROS generation, while H_2O_2 is produced from O_2^- by MnSOD in the matrix. In addition, ceramide results in cytochrome c displacement, reduced mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and oxygen consumptions. Furthermore, sphingolipids can interact with phosphatidylglycerol (e.g., cardiolipin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine) to alter the hydrophobicity of the mitochondrial membrane. Additionally, ceramide generation is able to regulate NADPH oxidase activity. Ang II activates AT_1R , triggering a signalling cascade involving the induction of p47^{phox} phosphorylation through c-Src, which precedes PLD and PKC activation. The activation of c-Src leads to EGFR transactivation, stimulating PI3K and Rac. In turn, Rac is able to stimulate NOX functions. In this sense, activation of NADPH oxidase and increased levels of ceramide can stimulate a lipid raft-redox signalling platforms, which are able to generate O_2^- , H_2O_2 , ONOO^- production and reduce NO bioavailability. Likewise, ROS can stimulate caveolin phosphorylation by Src, Fyn and Abl, triggering intracellular signalling associated to caveolae. Abl, proto-oncogene tyrosine kinase; ANT, adenine nucleotide translocase; Antiox, antioxidant molecules; AT_1R , Angiotensin II type 1 receptor; Cer, ceramide; Complex I, NADH dehydrogenase; Complex II, succinate dehydrogenase; Complex III, cytochrome c reductase; Complex IV, cytochrome c oxidase; Complex V, ATP synthase; CytC, cytochrome c; Fyn, proto-oncogene tyrosine kinase; IMS, intermembrane space; Matrix, mitochondrial matrix; MIM, mitochondrial inner membrane; MOM, mitochondrial outer membrane; NOX, NADPH oxidase; p22, NADPH oxidase complex subunit; p47, NADPH oxidase complex subunit; p67, NADPH oxidase complex subunit; PDG, Phosphatidylglycerol; PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLD, phospholipase D; Rac, Rho family of GTPase; SM, sphingomyelin; Sph-derived, sphingosine-derived lipids; SPHK, S1P kinase; Src, proto-oncogene tyrosine kinase.



Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

concentrations (Figure 3; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011; Trounce et al., 2013). However, the mechanisms by which sphingolipids act on electron transporters are not fully understood. It has been suggested that these lipids are able to affect mitochondrial complex assembly and stability (Siddique et al., 2013). According to Siddique et al. (2013), the ablation of Des1 (dihydroceramide desaturase) promoted a decrease in complex IV levels. In addition, CS-2 ablation elevates C16-ceramide and dihydrosphingosine levels, resulting in chronic oxidative stress through ROS formation by the modulation of complex IV activity (Zigdon et al., 2013). Moreover, the sphingosine and sphingosine-derived lipids, galactosylsphingosine and glucosylsphingosine are able to inhibit complex IV activity associated with phosphatidylcholine (Figure 3; Igisu et al., 1988).

Lipids such as phosphatidylglycerols cardiolipins, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are essential to the proper function of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation, which are required to maintain the structural integrity and the catalytic activity of complex I, III and IV (Figure 3; Sharpley et al., 2006; Kogot-Levin and Saada, 2013). Furthermore, sphingolipids may alter the hydrophobicity of mitochondrial membranes and possibly interact with the necessary lipids to maintain the steady-state activity of mitochondrial respiratory chain complexes (Igisu et al., 1988; Kogot-Levin and Saada, 2013). In addition, ceramide can act as an allosteric effector by binding to individual complexes, modifying their normal activity and affecting the complex's assembly or stability (Figure 3; Kogot-Levin and Saada, 2013). Cardiolipin also has an essential role in the organisation of mitochondrial intermembrane and cristae space, which helps to control the formation of lipid/protein complexes and anchoring of kinases, such as creatine kinase (CK) and nucleoside diphosphate kinase (Schlattner et al., 2009). Mitochondrial dysfunction and excessive ROS production can impair the cellular energetic state and mitochondrial permeability transition by inactivation of CK (Schlattner et al., 2006). In the cardiac tissue, mitochondrial CK have an essential role in the maintenance of cardiac energy homeostasis (Schlattner et al., 2006). In this sense, reduced activity or inactivation of CK can disrupt the energy fluxes and Ca^{2+} homeostasis, both leading to a reduced energy

reserve and contractile dysfunction (Schlattner et al., 2006).

Several studies have been performed to understand the correlation of oxidant environments and ceramide production (Levy et al., 2006; Won and Singh, 2006; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011). The most well-described mechanisms relate to ceramide generation in an oxidant condition through the SMases, enzymes that display a high sensitivity to oxidative stress and whose activity is inhibited by the presence of GSH (Figure 3; Levy et al., 2006; Won and Singh, 2006; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011). When GSH levels decrease, neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is activated, promoting ceramide accumulation and cell apoptosis (Levy et al., 2006; Won and Singh, 2006; Castillo et al., 2007). Exposure to H_2O_2 activates nSMase2, whereas ONOO^- exposure activates acid sphingomyelinase (aSMase), inducing ceramide generation. However, these effects are not observed in environments with low ROS levels (Figure 3; Castillo et al., 2007).

Interestingly, moderate levels of ROS stimulate SPHK activity, which leads to increased intracellular S1P and decreased ceramide levels and the promotion of cell survival (Pchejetski et al., 2007; Van Brocklyn and Williams, 2012). However, excessive ROS production leads to a decrease in S1P by SPHK degradation, thus favouring the generation of ceramide and cell apoptosis (Pchejetski et al., 2007; Van Brocklyn and Williams, 2012). In contrast, the antioxidant N-acetyl-cysteine is able to block SPHK degradation to maintain S1P levels and promote cell survival (Maceyka et al., 2007; Pchejetski et al., 2007). In addition, mitochondrial S1P interacts with PHB2, a protein related to mitochondrial biogenesis and function (Strub et al., 2011). The interaction between S1P and PHB2 promotes the assembly of complex IV, indicating that mitochondrial S1P may be important in the maintenance of oxidative phosphorylation pathway activity (Strub et al., 2011).

In addition to sphingolipids' roles in the mitochondria, they also associate with ROS in membrane microdomains termed lipid rafts. Lipid rafts are enriched with clustered sphingolipids, glycosphingolipids, cholesterol and proteins, creating a signalling platform able to recruit or aggregate different receptors, such as $\text{TNF}\alpha$ receptors that induce ceramide generation (Won and Singh, 2006; Catalgol

and Kartal Ozer, 2010). However, ceramide is implicated in the activation of NADPH oxidase, which is aggregated to lipid microdomains, forming lipid raft-redox signalling platforms able to produce O_2^- , H_2O_2 and $ONOO^-$ in response to different stimuli (Won and Singh, 2006; Catalgol and Kartal Ozer, 2010). In the cardiovascular system, different NADPH oxidase isoforms (NOX1, NOX2, NOX4 and NOX5) are expressed (Brandes et al., 2010). More specifically, the cardiovascular homologues NOX1 and NOX2 release O_2^- , whereas NOX5 is able to form both O_2^- and H_2O_2 (Brandes et al., 2010). In the other hand, NOX4 is unable to produce O_2^- , producing only H_2O_2 (Brandes et al., 2010). Angiotensin II (Ang II) is an important activator of NADPH oxidases through the G protein-coupled receptor Ang II type 1 receptor (AT₁R) in the vascular smooth muscle cells (Figure 3; Cai et al., 2003; Ushio-Fukai and Alexander, 2006). This receptor induces the p47^{phox} phosphorylation that is preceded by induction of c-Src, phospholipase D (PLD) and protein kinase C (PKC; Cai et al., 2003; Ushio-Fukai and Alexander, 2006). The induction of c-Src stimulates the transactivation of epidermal growth factor response (EGFR) protein which leads to the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Rac (Figure 3; Cai et al., 2003). In turn, Rac translocates to the cellular membrane, stimulating and sustaining NOX functions (Figure 3; Cai et al., 2003). In this sense, AT₁R is associated with caveolin for the translocation of AT₁R portion to caveolin-enriched lipid rafts, which is essential to AT₁R signalling (Figure 3; Ushio-Fukai and Alexander, 2006).

Caveolin is a membrane protein constituent of the caveolae membrane domain; caveolae are lipid rafts implicated in different signalling pathways, such as endocytosis, lipid regulation, cytoplasmic membrane organisation, signal transduction and calcium signalling (Parton and del Pozo, 2013).

Furthermore, NO is a vasoprotective molecule produced by endothelial NO synthase (eNOS) that requires the cofactor BH₄ and L-arginine for its dimerisation (Förstermann and Münzel, 2006). However, NADPH oxidases-derived O_2^- reacts with NO, favouring the formation of $ONOO^-$ in endothelial cells and limiting NO bioavailability (Figure 3; Cai et al., 2003; Förstermann and Münzel, 2006; Brandes et al., 2010). In addition, vascular ROS formation can potentially increase the uncoupling of eNOS, which

is converted into a pro-oxidant molecule, promoting a production of large amounts of O_2^- , and further decreasing bioactive NO (Cai et al., 2003; Förstermann and Münzel, 2006; Brandes et al., 2010).

Likewise, ROS may stimulate the tyrosine kinases Src, Fyn and Abl to phosphorylate caveolin at tyrosine 14, leading to the activation of its signalling targets, and this phosphorylation is essential for intracellular signalling within caveolae (Li et al., 1996; Catalgol and Kartal Ozer, 2010). In these microdomains, sphingomyelin interacts with cholesterol to determine the transition of liquid-ordered or gel-like phase of the cytoplasmic membrane (Catalgol and Kartal Ozer, 2010). However, it was observed that exogenous ceramide promotes the displacement of cholesterol from lipid-rafts, modifying the protein composition and structure of lipid rafts (Megha and London, 2004). Therefore, it is possible that ROS-induced accumulation of ceramide alters lipid raft composition and disturbs lipid-raft signal transduction.

Interplay between ROS and sphingolipids in the heart

A study in chicken embryos demonstrated that the embryonic outflow tract is more sensitive to oxidative stress than the ventricular or the atrial myocardium, and more highly sensitive than post-natal or mature cardiomyocytes to the exposure of nanomolar concentrations of H_2O_2 in a concentration and time exposure-dependent manner (Fisher, 2007). Interestingly, H_2O_2 promotes the increased activity of caspase 3 in the outflow tract cushion mesenchyme, while the outflow tract myocardium showed oxidative-induced injury (Fisher, 2007). Moreover, high ROS levels induce aberrant apoptosis associated with DNA and mitochondrial damage, leading to pathological remodelling and cardiac anomalies (Takimoto and Kass, 2007). In contrast, apoptosis can also be associated with morphological events in outflow tract cardiomyocytes, where it mediates the rotation and the shortening of the outflow tract during the transition from single to double circulation (Watanabe et al., 2001). This stage of outflow tract remodelling is necessary for proper vasculogenesis and the formation of the mature ventriculo-arterial connections (Watanabe et al., 2001).

In addition to cardiac remodelling, ROS induces cardiac hypertrophy by stimulating different signalling pathways, including the activation of Src,

Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

Ras GTPase, PKC, Ask-1, MAPKs and JNK proteins (Takimoto and Kass, 2007). Therefore, excessive ROS production may be associated with pathological cardiac remodelling, hypertrophy, fibrosis and contractile dysfunction. The influence of ROS in contractile dysfunction is related to modifications in essential proteins of the excitation–contraction coupling process. In this sense, ROS suppresses L-type calcium channels and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump ATPase (SERCA), affecting Ca^{2+} transport across the sarcolemma (Zima and Blatter, 2006; Takimoto and Kass, 2007).

Redox regulation can also modify the activity of Na^+ - H^+ exchangers, Na^+ - K^+ ATPase and oxidate thiol (SH) groups in channel proteins, such as SERCA (Zima and Blatter, 2006). Likewise, sphingosine and sphingomyelin can reduce intracellular Ca^{2+} concentrations, while ceramide and S1P have the opposite effect by promoting an increase in free intracellular Ca^{2+} in adult and neonatal rat cardiomyocytes (Alewijns et al., 2004). Furthermore, an acute increase in ceramide or S1P can enhance cytosolic Ca^{2+} concentration, promoting enhanced contractile function in isolated rat ventricular myocytes and in cultured porcine valvular interstitial cells, respectively (Relling et al., 2003; Witt et al., 2012). Maternal hypoxia results in ROS generation and inflammatory stress in foetal hearts because of the increased levels of NOS, nitrotyrosine, proinflammatory cytokines (e.g., IL-6, $\text{TNF}\alpha$), heat shock protein 70 (HSP70) and matrix metalloproteinases (Thompson and Al-Hasan, 2012). Embryonic exposure to hypoxia during the prenatal phase results in lower cardiac efficiency, restricted heart growth, altered cardiac performance and decreased PKC ϵ expression in foetal and adult rat hearts (Thompson and Al-Hasan, 2012). In addition, PKC ϵ exerts an important role in cardioprotection and is involved in the differentiation of cardiac progenitors (Galli et al., 2013). However, neonatal rats exposed to a hyperoxic environment have increased ROS production and, consequently, increased systolic blood pressure and vascular dysfunction in adults (Thompson and Al-Hasan, 2012). Furthermore, nSMase activation acts as the earliest response to redox stress generated by hypoxia-reoxygenation, which promotes ceramide accumulation in cardiomyocytes (Nikolova-Karakashian and Reid, 2011). Interestingly, SPHK1 is upregulated in response to hypoxic conditions by the activation of

HIF1 α and HIF2 α , promoting increased S1P levels and stimulating the migration of endothelial cells, and thus contributing to angiogenesis and tissue remodelling (Schwalm et al., 2008). However, in neonatal rat cardiomyocytes, ischaemia followed by reperfusion injury promotes the progressive accumulation of ceramide, inducing apoptosis in myocardial cells through the induction of TNF and Fas ligand (Bielawska et al., 1997). This ceramide increase can be mediated by ROS production during reperfusion once the blood flow is restored in the myocardium, leading to ROS generation and the associated pathologies of ischaemia/reperfusion (Braunersreuther and Jaquet, 2012).

Another important role of ROS and sphingolipids is related to cardiac neural crest migration. Neural crest cells are derived from the neuroectoderm, and they undergo EMT, migrating to different locations of the embryo and contributing to the development of various organs, including the heart (Morgan et al., 2008). Therefore, cardiac neural crest cell migration is essential for proper septation of the cardiac outflow that results in the formation of the aorta, pulmonary and aortic arch arteries (Morgan et al., 2008).

It has been observed that cardiac neural crest cells are highly sensitive to ROS, as these cells have low levels of SOD and CAT (Roest et al., 2007). ROS induced by hyperglycemia is able to promote cardiac neural crest migration, outflow tract defects, severe aortic arch anomalies and apoptosis (Roest et al., 2007; Morgan et al., 2008). In addition, the mycotoxin fumonisin potentially affects neural crest cells (Marasas et al., 2004). Fumonisin is known to inhibit ceramide synthase (CS), to modify cellular proliferation, increase cytokine expression (e.g., $\text{TNF}\alpha$) and to promote the accumulation of free sphingoid bases, such as sphinganine and sphingosine (He et al., 2001; Marasas et al., 2004). Fumonisin can inhibit mitochondrial complex I, leading to the depolarisation of the mitochondrial membrane; fumonisin also impairs calcium signalling and promotes ROS production (Domijan and Abramov, 2011). In addition, the inhibition of ceramide synthesis results in an impairment of sphingomyelin and glycosphingolipid biosynthesis, resulting in the disruption of cytoplasmic membranes, which also affects the activity of membrane folate transporters (FRs; Marasas et al., 2004; Sabharanjak and Mayor, 2004).

Folate is essential for embryonic development, including the development of the cardiovascular system (Tang et al., 2004). Moreover, folate is a cofactor for diverse cellular reactions, including amino acid and nucleotide synthesis, and folate also participates in one-carbon reactions (Sabharanjak and Mayor, 2004; Tang et al., 2004). Folate deprivation increases homocysteine levels, lipid peroxidation, and ROS production (associated to cytochrome *c* oxidase dysfunction), impairs antioxidant enzyme activity, and promotes membrane depolarisation (Chang et al., 2007).

Notably, FRs are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins that are stabilised by their associations with caveolae, where folate and FR are internalised by lipid raft-dependent endocytosis (Sabharanjak and Mayor, 2004). The adequate distribution of cholesterol and sphingolipids is crucial for heart morphogenesis; abnormal folate transport results in reduced cardiomyocyte proliferation and increased cell apoptosis, which both contribute to cardiac defects (Tang et al., 2004). In addition, abnormal sphingolipid metabolism and ROS production results in decreased expression of the *Pax3* gene in cardiac neural crest cells (Roest et al., 2007; Morgan et al., 2008). *Pax3* encodes a protein expressed in the neural tube, neural crest and somites, and is essential for cardiac neural crest migration and proliferation of neural crest cell precursors (Tang et al., 2004). Reduced expression of *Pax3* is associated with defective cardiac development, including aortic interruption, double outlet right ventricle, abnormal myocardial function and persistent truncus arteriosus (Roest et al., 2007; Morgan et al., 2008).

Furthermore, the inhibition of Rho GTPases in murine cardiac development promotes severe defects in cardiac morphogenesis at E9.5, such as poor trabeculation, pericardial effusion, hypocellularity as well as the disruption of cardiac looping and ventricular maturation (Wei et al., 2002). Additionally, the absence of Rho GTPases inhibits the formation of the EC and the bulboventricular groove, a region that demarcates the axis of the future interventricular septum (Wei et al., 2002). However, S1P can also influence the activation of Rho GTPase signalling through S1PR₁, S1PR₂ and S1PR₃, and Rho GTPase activation is associated with cardiac remodelling (Takuwa et al., 2008). Thereby, S1P mediates the activation of Rac and Rho or the inhibition of Rho-dependent Rac inhibition in a receptor subtype-dependent man-

ner (Takuwa et al., 2008). These membrane receptors are coupled to G proteins that regulate different downstream signals by G_i, G_{12/13} and G_q (Takuwa et al., 2008). Likewise, Rho is activated in the heart by G_{12/13} proteins through both S1PR₂ and S1PR₃ (Takuwa et al., 2008). Rac is activated by S1PR₁ and S1PR₃-mediated G_i activity, while S1PR₂ inhibits Rac activity (Takuwa et al., 2008). Activation of Rac and Rho can also be related to increased ROS levels (Takuwa et al., 2010). Thereby, abnormal sphingolipid metabolism and ROS production may be associated with the disruption of downstream signalling to targets crucial for cardiac morphogenesis.

Cardiovascular diseases related to ROS action and sphingolipids

Congenital heart defects (CHDs) consist of structural heart and blood vessel abnormalities that show a prevalence of 0.8%, 0.69% and 0.93% live births in the United State, Europe and Asia, respectively (Go et al., 2014). Among the most frequently occurring CHDs are ventricular and atrial septum defect, followed by patent ductus arteriosus and valvular pulmonary stenosis (Go et al., 2014).

Several adult diseases are associated with different intrauterine stress conditions that occurred during embryonic development. Cardiac abnormalities are associated with changes in the placental–maternal interface, where environmental factors and maternal illnesses have a significant role in embryonic development. These factors are able to increase the risk of CHD, such as diabetes mellitus, phenylketonuria, obesity and lifestyle factors, such as smoke exposure and alcohol use (Das and Vasudevan, 2007; Ku and Dulskien, 2008; Ribas et al., 2011; Thompson and Al-Hasan, 2012; De Marchi et al., 2013). Remarkably, a study correlated maternal obesity to an increased risk of embryonic CHD (Mills et al., 2010). The authors demonstrated that obesity increases the chances of developing atrial septal defects, aortic and pulmonary stenosis, tetralogy of Fallot and hypoplastic left heart syndrome (Mills et al., 2010). Another comparative study investigated the oxidative stress status between 30 healthy age-matched children and 43 children with different types of CHD (Pirincioglu et al., 2012). This report concluded that the CHD group presented decreased antioxidant activity and positive biomarkers of ROS damage, such

Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

as increased levels of protein carbonyl, a marker of oxidative damage to protein and malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation (Pirinccioglu et al., 2012).

Evidence also appoints cigarette smoking as a factor for endothelial dysfunction and heart malformation, as it is related to excessive ROS generation and an inhibition of VEGF-induced cellular migration (Michaud et al., 2006). VEGF is an essential modulator of cardiac development, acting in AVC morphogenesis and EMT (Enciso et al., 2003). Additionally, VEGFA is correlated to diabetic embryopathy, affecting endothelial cell migration, transformation and invasion, and promoting defects in EC (Enciso et al., 2003).

Furthermore, sphingolipid and ROS signalling are broadly thought of as being involved in endothelial dysfunction and the progression of vascular or systemic diseases, such as atherosclerosis, diabetes and hypertension (Won and Singh, 2006; Zhang et al., 2006; Catalgol and Kartal Ozer, 2010).

Reduced NADPH oxidases are the main source of ROS in vascular tissues and controls the homeostasis of endothelial function (Griendling and Harrison, 2001; Zhang et al., 2006). However, its abnormal activity is linked to endothelial pathogenesis and atherosclerotic risk factors (Griendling and Harrison, 2001; Zhang et al., 2006). In addition, one report demonstrated that death receptors and apoptotic factors, such as TNF α , Fas ligand and endostatin, stimulate the clustering of lipid rafts and recruit NOX2, p47^{phox} and Rac into these structures (Zhang et al., 2006). Thus, this recruitment and lipid raft clustering promotes the activation and aggregation of NADPH oxidase in the membrane of coronary arterial endothelial cells, producing ROS and establishing a redox signalling platform (Zhang et al., 2006). The clustering of ceramide-enriched lipid rafts in response to several factors increases ROS production, which can result in low-density lipoprotein oxidation, activation of SMase and ceramide accumulation, culminating in vascular disease such as atherosclerosis (Catalgol and Kartal Ozer, 2010). NADPH oxidase-derived ROS are signalling modulators and are associated with hypertension, hypertrophy, remodelling processes and inflammation (Brandes et al., 2010). Nonetheless, NOX4 is the main NADPH oxidase isoform expressed in undifferentiated embryonic stem cells, differentiated embryoid bodies and neonatal

cardiomyocytes (Li et al., 2006). Unlike the other NADPH oxidases that are commonly associated with cardiovascular pathologies, the NOX4-derived ROS mediate the MEF2C activation through p38 MAPK, leading to the cardiomyocyte differentiation (Li et al., 2006).

Cardiovascular isoforms of eNOS and the neuronal NO synthase (nNOS) are constitutively expressed, and their uncoupling has been associated with different pathologies, such as dilated cardiomyopathy, atherosclerosis, endothelial dysfunction, hypertension and ischaemia reperfusion injury (Roe and Ren, 2012). Variations in cardiac tissue NO levels caused by NOS uncoupling have different effects on cardiac function and contractility as a consequence of reduced NO bioavailability (Roe and Ren, 2012). In this sense, high NO levels promote the s-nitrosylation of Ca²⁺ regulatory proteins and the activation of the soluble guanyl cyclase, which result in the accumulation of intracellular cGMP, whereas low NO levels stimulate adenylyl cyclase activity, increasing intracellular levels of cAMP and Ca²⁺ (Roe and Ren, 2012). Additionally, reduced bioavailability of NO during cardiovascular development can be associated with increased cardiomyocyte apoptosis, as well as impairment of different biological processes, such as EMT, epicardial derived cells migration and cell proliferation in AV cushions (Liu and Feng, 2012). Likewise, eNOS deficiency is related to heart failure, congenital septal defects, and has been associated with 85% of the death rates during the first 7 days of mice postnatal life (Liu and Feng, 2012). In vascular endothelial cells, S1P activates eNOS through S1P membrane receptors in an Akt-dependent manner (Igarashi et al., 2001). Nevertheless, endothelial cells incubated with exogenous ceramide show eNOS upregulation (Li et al., 2002). Ceramide also promotes an increase in ROS production and reduced NO bioavailability, favouring proatherogenic properties (Li et al., 2002).

Transgenic mice engineered to promote SPHK1 overexpression showed S1PR₃-dependent cardiac fibrosis related to cardiomyocyte degeneration (Takuwa et al., 2010). S1PR₃ promoted an increase in ROS levels and the activation of TGF β , Rac1 and RhoA small GTPases (Takuwa et al., 2010). These proteins are implicated in cardiac fibrosis and are upstream regulators of ROS production (Takuwa et al., 2010). In addition, mice overexpressing SPHK1

display increased levels of oxidative DNA damage, as evidenced by 8-hydroxydeoxyguanosine and MDA, markers to lipid peroxidation and tissue oxidative stress, respectively (Takuwa et al., 2010).

In the adult heart, an increase in ceramide levels by the activation of *de novo* pathways are associated with pathophysiological events and heart dysfunction (Lee et al., 2012; Park and Goldberg, 2012). Cardiomyocytes lacking the Sptlc2 subunit of serine palmitoyltransferase have a deficiency in the lipid composition of the heart, which results in cardiac dysfunction (Lee et al., 2012). Nonetheless, the disruption of sphingolipid biosynthesis by the dysfunction of serine palmitoyltransferase activity is related to increased cardiac contractility and a decrease in apoptotic gene expression, preventing the toxicity associated with excess ceramide (Lee et al., 2012; Park and Goldberg, 2012).

Conclusions

The role of sphingolipids as modulators of redox equilibrium and heart development is poorly understood. Although studies have shown that sphingolipids such as ceramide play an important role in modulating ROS production, the molecular mechanisms underlying this interplay are still elusive. Nevertheless, it is clear that these molecules are able to impact cell fate, as ROS is able to reduce S1P synthesis and promote ceramide accumulation.

It is also clear that sphingolipids, primarily S1P and ceramide, are deeply connected to multiple heart abnormalities and CHD. However, the understanding of this sphingolipid rheostat during differentiation, migration, contractility and remodelling of cardiac tissue is an arduous task, as it is difficult to address the pleiotropic effects of these lipids and the extent of their influence on biological processes. Nonetheless, they have arisen as crucial mediators of heart development and should be taken into consideration when trying to understand the pathologies associated with cardiogenesis.

Funding

This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant no. 301149/2012-7), the Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tec-

nologia (INCT de Processos Redox em Biomedicina-REDOXOMA; grant no. 573530/2008-4), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul FAPERGS (PRONEM grant no. 11/2072-2) and the Programa Binacional de Terapia Celular – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROBITEC-CAPES; grant no. 004/12).

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2013) Sphingolipid regulation of ezrin, radixin, and moesin protein families: Implications for cell dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **S1388–S1981**, 00140–00146
- Alewijnse, A.E., Peters, S.L.M. and Michel, M.C. (2004) Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 666–684
- Avery, K., Avery, S., Shepherd, J., Heath, P.R. and Moore, H. (2008) Sphingosine-1-phosphate mediates transcriptional regulation of key targets associated with survival, proliferation, and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **17**, 1195–1205
- Bieberich, E. (2011) Ceramide in stem cell differentiation and embryo development: Novel functions of a topological cell-signaling lipid and the concept of ceramide compartments. *J. Lipids* **2011**, 610306
- Bielawska, A.E., Shapiro, J.P., Jiang, L., Melkonyan, H.S., Piot, C., Wolfe, C.L., Tomei, L.D., Hannun, Y.A. and Umansky, S.R. (1997) Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am. J. Pathol.* **151**, 1257–1263
- Brandes, R.P., Weissmann, N. and Schröder, K. (2010) NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 687–706
- Braunersreuther, V. and Jaquet, V. (2012) Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: From pathophysiology to therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 97–114
- Cai, H., Griendling, K.K. and Harrison, D.G. (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 471–478
- Castillo, S.S., Levy, M., Thaikoottathil, J.V. and Goldkorn, T. (2007) Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 2680–2686
- Catalgol, B. and Kartal Ozer, N. (2010) Lipid rafts and redox regulation of cellular signaling in cholesterol induced atherosclerosis. *Curr. Cardiol. Rev.* **6**, 309–324
- Chang, C.M., Yu, C.C., Lu, H.T., Chou, Y.F. and Huang, R.F.S. (2007) Folate deprivation promotes mitochondrial oxidative decay: DNA large deletions, cytochrome c oxidase dysfunction, membrane depolarization and superoxide overproduction in rat liver. *Br. J. Nutr.* **97**, 855–863
- Das, S.K. and Vasudevan, D.M. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* **81**, 177–187
- De Marchi, E., Baldassari, F., Bononi, A., Wieckowski, M.R. and Pinton, P. (2013) Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: Role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 564961

Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

- Dennerly, P.A. (2007) Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **81**, 155–162
- Domijan, A.M. and Abramov, A.Y. (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis-implication to mechanism of cell toxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 897–904
- Enciso, J.M., Gratzinger, D., Camenisch, T.D., Canosa, S., Pinter, E. and Madri, J.A. (2003) Elevated glucose inhibits VEGF-A-mediated endocardial cushion formation: Modulation by PECAM-1 and MMP-2. *J. Cell Biol.* **160**, 605–615
- Fernández-Checa, J.C. (2003) Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 471–479
- Fisher, S.A. (2007) The developing embryonic cardiac outflow tract is highly sensitive to oxidant stress. *Dev. Dyn.* **236**, 3496–3502
- Förstermann, U. and Münzel, T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in cardiovascular disease: From marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708–1714
- Futerman, A.H. and Hannun, Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**, 777–782
- Galli, D., Gobbi, G., Carrubbi, C., Di Marcantonio, D., Benedetti, L., De Angelis, M.G., Meschi, T., Vaccarezza, M., Sampaolesi, M., Mirandola, P. and Vitale, M. (2013) The role of PKC ϵ -dependent signaling for cardiac differentiation. *Histochem. Cell Biol.* **139**, 35–46
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Blaha, M.J., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Judd, S.E., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Mackey, R.H., Magid, D.J., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, D.K., Mohler, E.R. 3rd, Moy, C.S., Mussolino, M.E., Neumar, R.W., Nichol, G., Pandey, D.K., Paynter, N.P., Reeves, M.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B. and American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2014) Heart disease and stroke statistics–2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* **129**, e28–e292
- Griendling, K.K. and Harrison, D.G. (2001) Out, damned dot: Studies of the NADPH oxidase in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **108**, 1423–1424
- Guérin, P., El Moutassim, S. and Ménéz, Y. (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **7**, 175–189
- Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1989) Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* **243**, 500–507
- Harvey, A.J., Kind, K.L. and Thompson, J.G. (2002) REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* **123**, 479–486
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T. and Barber, D.L. (2011) Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4750–4764
- He, Q., Riley, R.T. and Sharma, R.P. (2001) Fumonisin-induced tumor necrosis factor- α expression in a porcine kidney cell line is independent of sphingoid base accumulation induced by ceramide synthase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**, 69–77
- Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A. and Ho, D.S. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 32804–32812
- Igarashi, J., Bernier, S.G. and Michel, T. (2001) Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. Differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 12420–12426
- Igisu, H., Hamasaki, N., Ito, A. and Ou, W. (1988) Inhibition of cytochrome c oxidase and hemolysis caused by lysosphingolipids. *Lipids* **23**, 345–348
- Inniss, K. and Moore, H. (2006) Mediation of apoptosis and proliferation of human embryonic stem cells by sphingosine-1-phosphate. *Stem Cells Dev.* **15**, 789–796
- Kawabori, M., Kacimi, R., Karlner, J.S. and Yenari, M.A. (2013) Sphingolipids in cardiovascular and cerebrovascular systems: Pathological implications and potential therapeutic targets. *World J. Cardiol.* **5**, 75–86
- Kleger, A., Liebau, S., Lin, Q., von Wichert, G. and Seufferlein, T. (2011) The impact of bioactive lipids on cardiovascular development. *Stem Cells Int.* **2011**, 916180
- Kobayashi-Miura, M., Shioji, K., Hoshino, Y., Masutani, H., Nakamura, H. and Yodoi, J. (2007) Oxygen sensing and redox signaling: The role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **292**, H2040–H2050
- Kogot-Levin, A. and Saada, A. (2013) Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie* **100**, 88–94
- Kono, M., Mi, Y., Liu, Y., Sasaki, T., Allende, M.L., Wu, Y.P., Yamashita, T. and Proia, R.L. (2004) The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 29367–29373
- Ku, R. and Dulskien, V. (2008) Selected environmental risk factors and congenital heart defects. *Med.* **44**, 827–832
- Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S. and Stainier, D.Y.R. (2000) A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* **406**, 192–195
- Lee, S.Y., Kim, J.R., Hu, Y., Khan, R., Kim, S.J., Bharadwaj, K.G., Davidson, M.M., Choi, C.S., Shin, K.O., Lee, Y.M., Park, W.J., Park, I.S., Jiang, X.C., Goldberg, I.J. and Park, T.S. (2012) Cardiomyocyte specific deficiency of serine palmitoyltransferase subunit 2 reduces ceramide but leads to cardiac dysfunction. *J. Biol. Chem.* **287**, 18429–18439
- Levy, M., Castillo, S.S. and Goldkorn, T. (2006) nMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 900–905
- Li, H., Junk, P., Huwiler, A., Burkhardt, C., Wallerath, T., Pfeilschifter, J. and Förstermann, U. (2002) Dual effect of ceramide on human endothelial cells: Induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 2250–2256
- Li, J., Stouffs, M., Serrander, L., Banfi, B., Bettiol, E., Charnay, Y., Steger, K., Krause, K. and Jaconi, M.E. (2006) The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. **17**, 3978–3988
- Li, S., Seitz, R. and Lisanti, M.P. (1996) Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J. Biol. Chem.* **271**, 3863–3868
- Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C. and Epstein, C.J. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **11**, 376–381
- Liu, Y. and Feng, Q. (2012) NOing the heart: Role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation* **84**, 54–61
- Maceyka, M., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007) Shooting the messenger: Oxidative stress regulates sphingosine-1-phosphate. *Circ. Res.* **100**, 7–9
- Marasas, W.F., Riley, R.T., Hendricks, K.A., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E. and Merrill, A.H. Jr. (2004) Fumonisin disrupts sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in

- embryo culture and in vivo: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J. Nutr.* **134**, 711–716
- Matsui, T., Raya, A., Callol-Massot, C., Kawakami, Y., Oishi, I., Rodriguez-Esteban, C. and Izpisua Belmonte, J.C. (2007) miles-apart-Mediated regulation of cell-fibronectin interaction and myocardial migration in zebrafish. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**(Suppl 1), S77–S82
- Megha, and London, E. (2004) Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): Implications for lipid raft structure and function. *J. Biol. Chem.* **279**, 9997–10004
- Mendelson, K., Zygmunt, T., Torres-Vázquez, J., Evans, T. and Hla, T. (2013) Sphingosine 1-phosphate receptor signaling regulates proper embryonic vascular patterning. *J. Biol. Chem.* **288**, 2143–2156
- Michaud, S.E., Dussault, S., Groleau, J., Haddad, P. and Rivard, A. (2006) Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: Role of NO and reactive oxygen species. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 275–284
- Mills, J.L., Troendle, J., Conley, M.R., Carter, T. and Druschel, C.M. (2010) Maternal obesity and congenital heart defects: A population-based study. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1543–1549
- Morgan, S.C., Relaix, F., Sandell, L.L. and Loeken, M.R. (2008) Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Res. Part A* **82**, 453–463
- Nikolova-Karakashian, M.N. and Reid, M.B. (2011) Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2501–2517
- Norden, J. and Kispert, A. (2012) Wnt/Ctnnb1 signaling and the mesenchymal precursor pools of the heart. *Trends Cardiovasc. Med.* **22**, 118–122
- Novgorodov, S.A., Wu, B.X., Guduz, T.I., Bielawski, J., Ovchinnikova, T.V., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2011) Novel pathway of ceramide production in mitochondria: Thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J. Biol. Chem.* **286**, 25352–25362
- Park, T.S. and Goldberg, I.J. (2012) Sphingolipids, lipotoxic cardiomyopathy, and cardiac failure. *Heart Fail. Clin.* **8**, 633–641
- Parton, R.G. and del Pozo, M.A. (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 98–112
- Pchejetski, D., Kunduzova, O., Dayon, A., Calise, D., Seguelas, M.H., Leducq, N., Seif, I., Parini, A. and Cuvillier, O. (2007) Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ. Res.* **100**, 41–49
- Person, A.D., Klewer, S.E. and Runyan, R.B. (2005) Cell biology of cardiac cushion development. *Int. Rev. Cytol.* **243**, 287–335
- Pirinccioglu, A.G., Alyan, O., Kizil, G., Kangin, M. and Beyazit, N. (2012) Evaluation of oxidative stress in children with congenital heart defects. *Pediatr. Int.* **54**, 94–98
- Ray, H.J. and Niswander, L. (2012) Mechanisms of tissue fusion during development. *Development* **139**, 1701–1711
- Relling, D.P., Hintz, K.K. and Ren, J. (2003) Acute exposure of ceramide enhances cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 1163–1168
- Ribas, G.S., Sitta, A., Wajner, M. and Vargas, C.R. (2011) Oxidative stress in phenylketonuria: What is the evidence? *Cell. Mol. Neurobiol.* **31**, 653–662
- Roe, N.D. and Ren, J. (2012) Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul. Pharmacol.* **57**, 168–172
- Roest, P.A.M., van Iperen, L., Vis, S., Wisse, L.J., Poelmann, R.E., Steegers-Theunissen, R.P.M., Molin, D.G., Eriksson, U.J. and Gittenberger-De Groot, A.C. (2007) Exposure of neural crest cells to elevated glucose leads to congenital heart defects, an effect that can be prevented by N-acetylcysteine. *Birth Defects Res. Part A* **79**, 231–235
- Sabharanjak, S. and Mayor, S. (2004) Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1099–1109
- Santos, C.X.C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A.C. and Shah, A.M. (2011) Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 777–793
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Ramirez, S., Brückner, A., Kay, L., Polge, C., Epand, R.F., Lee, R.M., Lacombe, M.L. and Epand, R.M. (2009) Mitochondrial kinases and their molecular interaction with cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2032–2047.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M. and Wallimann, T. (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 164–180
- Schwalm, S., Döll, F., Römer, I., Bubnova, S., Pfeilschifter, J. and Huwiler, A. (2008) Sphingosine kinase-1 is a hypoxia-regulated gene that stimulates migration of human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 1020–1025
- Schwalm, S., Pfeilschifter, J. and Huwiler, A. (2013) Sphingosine-1-phosphate: A Janus-faced mediator of fibrotic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 239–250
- Sharpley, M.S., Shannon, R.J., Draghi, F. and Hirst, J. (2006) Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria. *Biochemistry* **45**, 241–248
- Siddique, M.M., Li, Y., Wang, L., Ching, J., Mal, M., Ilkayeva, O., Wu, Y.J., Bay, B.H. and Summers, S.A. (2013) Ablation of dihydroceramide desaturase 1, a therapeutic target for the treatment of metabolic diseases, simultaneously stimulates anabolic and catabolic signaling. *Mol. Cell Biol.* **33**, 2353–2369
- Strub, G.M., Paillard, M., Liang, J., Gomez, L., Allegood, J.C., Hait, N.C., Maceyka, M., Price, M.M., Chen, Q., Simpson, D.C., Kordula, T., Milstien, S., Lesnfsky, E.J. and Spiegel, S. (2011) Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J.* **25**, 600–612
- Takimoto, E. and Kass, D.A. (2007) Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* **49**, 241–248
- Takuwa, N., Ohkura, S., Takashima, S., Ohtani, K., Okamoto, Y., Tanaka, T., Hirano, K., Usui, S., Wang, F., Du, W., Yoshioka, K., Banno, Y., Sasaki, M., Ichi, I., Okamura, M., Sugimoto, N., Mizugishi, K., Nakanuma, Y., Ishii, I., Takamura, M., Kaneko, S., Kojo, S., Satouchi, K., Mitumori, K., Chun, J. and Takuwa, Y. (2010) S1P3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* **85**, 484–493
- Takuwa, Y., Ikeda, H., Okamoto, Y., Takuwa, N. and Yoshioka, K. (2013) Sphingosine-1-phosphate as a mediator involved in development of fibrotic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 185–192
- Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K. and Takuwa, N. (2008) Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 483–488
- Tang, L.S., Włodarczyk, B. J., Santillano, D.R., Miranda, R.C. and Finnell, R.H. (2004) Developmental consequences of abnormal folate transport during murine heart morphogenesis. *Birth Defects Res. Part A* **70**, 449–458
- Thompson, L.P. and Al-Hasan, Y. (2012) Impact of oxidative stress in fetal programming. *J. Pregnancy* **2012**, 582748
- Trounce, I.A., Crouch, P.J., Carey, K.T. and McKenzie, M. (2013) Modulation of ceramide-induced cell death and superoxide production by mitochondrial DNA-encoded respiratory chain defects in *Rattus xenocybrid* mouse cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 817–825

Sphingolipids and ROS during cardiogenesis

- Ufer, C. and Wang, C.C. (2011) The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front. Mol. Neurosci.* **4**, 12
- Ufer, C., Wang, C.C., Borchert, A., Heydeck, D. and Kuhn, H. (2010) Redox control in mammalian embryo development. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 833–875
- Ushio-Fukai, M. and Alexander, R. W. (2006) Caveolin-dependent angiotensin II type 1 receptor signaling in vascular smooth muscle. *Hypertension* **48**, 797–803
- Van Brocklyn, J.R. and Williams, J.B. (2012) The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **163**, 26–36
- Wang, X., Rao, R.P., Kosakowska-Cholody, T., Masood, M.A., Southon, E., Zhang, H., Berthet, C., Nagashim, K., Veenstra, T.K., Tessarollo, L., Acharya, U. and Acharya, J.K. (2009) Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice. *J. Cell Biol.* **184**, 143–158
- Watanabe, M., Jafri, A. and Fisher, S.A. (2001) Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. *Dev. Biol.* **240**, 274–288
- Wei, L., Imanaka-Yoshida, K., Wang, L., Zhan, S., Schneider, M.D., DeMayo, F.J. and Schwartz, R. J. (2002) Inhibition of Rho family GTPases by Rho GDP dissociation inhibitor disrupts cardiac morphogenesis and inhibits cardiomyocyte proliferation. *Development* **129**, 1705–1714
- Wendler, C.C. and Rivkees, S.A. (2006) Sphingosine-1-phosphate inhibits cell migration and endothelial to mesenchymal cell transformation during cardiac development. *Dev. Biol.* **291**, 264–277
- Witt, W., Jannasch, A., Burkhard, D., Christ, T., Ravens, U., Brunssen, C., Leuner, A., Morawietz, H., Matschke, K. and Waldow, T. (2012) Sphingosine-1-phosphate induces contraction of valvular interstitial cells from porcine aortic valves. *Cardiovasc. Res.* **93**, 490–497
- Won, J.S. and Singh, I. (2006) Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1875–1888
- Yamagishi, H., Maeda, J., Uchida, K., Tsuchihashi, T., Nakazawa, M., Aramaki, M., Kodo, K. and Yamagishi, C. (2009) Molecular embryology for an understanding of congenital heart diseases. *Anat. Sci. Int.* **84**, 88–94
- Yilmaz, M. and Christofori, G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 15–33
- Zhang, A.Y., Yi, F., Zhang, G., Gulbins, E. and Li, P.L. (2006) Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells. *Hypertension* **47**, 74–80
- Zigdon, H., Kogot-Levin, A., Park, J.W., Goldschmidt, R., Kelly, S., Merrill, A.H.J., Scherz, A., Pewzner-Jung, Y., Saada, A. and Futerman, A.H. (2013) Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **288**, 4947–4956
- Zima, A.V. and Blatter, L.A. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.* **71**, 310–321

Received: 4 February 2014; Accepted: 24 March 2014; Accepted article online: 28 March 2014

Capítulo III

Systems chemo-biology and transcriptomic meta-analysis
reveal the molecular roles of bioactive lipids in mouse
cardiogenesis

Artigo submetido no periódico *The Journal of Biological Chemistry*

Systems Chemo-Biology and Transcriptomic Meta-Analysis Reveal the Molecular Roles of Bioactive Lipids in Mouse Cardiogenesis*

Joice de Faria Poloni and Diego Bonatto

Department of Molecular Biology and Biotechnology, Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Running title: *Regulation of cardiac morphogenesis by bioactive lipids*

To whom correspondence should be addressed: Diego Bonatto, Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 219, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, BRAZIL, 91509-900. Phone: (+55 51) 3308-6080; Fax: (+55 51) 3308-7309; E-mail: diegobonatto@gmail.com.

Keywords: bioactive lipids; extracellular matrix; morphogenesis; heart development; systems chemo-biology; transcriptomics; microarray; RNA-seq

Background: Bioactive lipids are involved in morphological alterations during cardiac differentiation.

Results: Lipid metabolism is related to extracellular matrix remodeling and cytoskeletal organization.

Conclusion: The relationship between bioactive lipids and cytoskeletal and extracellular matrix components suggests a mechanism by which bioactive lipids influence cardiogenesis.

Significance: New insights into the effect of bioactive lipids on cardiac morphogenesis in response to various stimuli are revealed.

ABSTRACT

Lipids, which are essential constituents of biological membranes, play structural and functional roles in the cell. In recent years, lipids that have been identified as regulatory signaling molecules and have been termed “bioactive lipids”. Subsequently, the importance of bioactive lipids in stem cell differentiation and cardiogenesis has gained increasing recognition. Therefore, the aim of this study was to identify the biological processes underlying murine cardiac differentiation and the mechanisms by which bioactive lipids affect these processes. For this purpose, a transcriptomic meta-analysis of microarray and RNA-seq data from murine stem cells undergoing cardiogenic differentiation was performed. The differentially expressed genes identified via this meta-analysis and bioactive lipids were

analyzed using systems chemo-biology tools. These data indicated that bioactive lipids are associated with the regulation of cell motility, cell adhesion, cytoskeletal rearrangement and gene expression. Moreover, bioactive lipids integrate the signaling pathways involved in cell migration, the secretion and remodeling of extracellular matrix components, and the establishment of the cardiac phenotype. In conclusion, this study provides new insights into the contribution of bioactive lipids to the induction of cellular responses to various stimuli, which may originate from the extracellular environment and morphogens, and the manner in which this contribution directly affects murine heart morphogenesis.

Bioactive lipids are known to act as both structural components in cellular membranes and signaling and regulatory molecules under a wide range of physiological and pathological conditions (1–3). The most well-studied bioactive lipids are sphingosine (Sph), ceramide (Cer), sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingomyelin (SM), lysophosphatidic acid (LPA) and phosphatidic acid (PA). These molecules perform essential cellular functions, such as differentiation, proliferation, survival and apoptosis, migration, polarity and cytoskeletal regulation (1–5). Bioactive lipids act as cell signaling molecules via (a) direct interactions with specific protein partners, (b) lipid rafts, which influence cell-signaling cascades, and (c) interactions with others lipids, which affect the cell membrane structure or the

interaction landscape between proteins and the membrane (1, 6).

Studies have demonstrated the activity of bioactive lipids in cardiomyocyte differentiation and survival (4, 5, 7–9). Additionally, bioactive lipid-associated metabolic alterations disturb cardiac contractility and induce abnormal development in terms of heart structure morphology and vascular maturation (4, 10). Unfortunately, the molecular pathways by which bioactive lipids influence heart development are currently poorly understood.

The aim of this study was to investigate the genes related to the signaling of bioactive lipids during cardiac differentiation in *Mus musculus*. For this purpose, a transcriptomics meta-analysis and systems chemo-biology analyses were performed. Additional data gathered from network clustering and gene ontology (GO) analyses associated with the evaluation of the local network topologies (centralities) indicated that bioactive lipids influence cardiac morphogenesis by modulating signaling pathways that promote cytoskeletal reorganization, extracellular matrix (ECM) remodeling and cell communication regulation. Furthermore, interference analysis, which enables the determination of the effect of a small molecule and/or macromolecule on the network, was performed on selected transcription factors, bioactive lipids and genes related to the signaling of bioactive lipids using a virtual knockout model. For this purpose, molecules that potentially mediate the interplay between extracellular stimuli and cellular responses were obtained. This study provides new evidence for the significance of bioactive lipids in differentiation and the regulation of heart development.

MATERIALS AND METHODS

Cardiogenesis gene expression data - The transcriptomic profile of heart development was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>]. For this purpose, the gene expression of *Mus musculus* was profiled via microarray and RNA-seq analysis of the matrix files GSE6689 and GSE47948, respectively (11, 12).

The matrix file GSE6689 represents a gene expression analysis performed on murine embryonic stem cells (ESCs) that were cultured and subjected to cardiogenesis, as reported by Faustino *et al.* in 2008 (11). The microarray

series matrix file (GSE6689) and its platform (GPL1261) were downloaded from [<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE6689/matrix/>] and [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL1261>], respectively. The microarray analysis was performed by considering undifferentiated ESCs as the control group and cardiac precursor (CP) cells and cardiomyocytes (CMs) as the experimental groups; then, the differentially expressed genes (DEGs) were identified (Fig. 1). The DEGs identified based on microarray analysis were evaluated using R statistical programming language tools and the Bioconductor package Linear Models for Microarray Data (limma) (Fig. 1) (13).

Additionally, the transcriptomic data from matrix file GSE47948, in which murine ESCs were cultured and underwent cardiogenesis, as reported by Wanstad *et al.* in 2013, were used (12). The DEGs from the RNA-seq data were analyzed by considering the ESCs as the control group, which was compared to CP cells and CMs using the R statistical programming language (Fig. 1). For this purpose, FastQC was used to evaluate read quality (14). This step was followed by read alignment using the most recent reference genome and the gene annotations for *Mus musculus* [available at <http://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>] using Bowtie2 2.1 (15). The splice junctions were identified using TopHat2 2.0.11 (16). The read counts were performed using HTSeq 0.6.1, and the DEGs were identified via analysis using edgeR (17, 18). For both transcriptomes (GSE6689 and GSE47948), $\log_2FC > 2.0$ and a false discovery rate (FDR) threshold of < 0.05 (Fig. 1) were used as criteria to generate the DEG list.

Data mining and interactomic network design - To evaluate the association between lipids and cardiac differentiation, interactomic data mining was performed. For this purpose, the obtained DEGs were used as input data into the metasearch engines STRING 9.1, whereas DEGs and the most commonly reported bioactive lipids in the literature (Sph, Cer, S1P, SM, LPA and PA) were used as input data into STITCH 3.1 to design the networks (Fig. 1) (19, 20). The following parameters were used in the STITCH and STRING programs: all prediction methods enabled, excluding text mining, and a degree of confidence of 0.400. The resulting interactomic data were further analyzed using Cytoscape 2.8.3 (21, 22) (Fig. 1), resulting in the generation

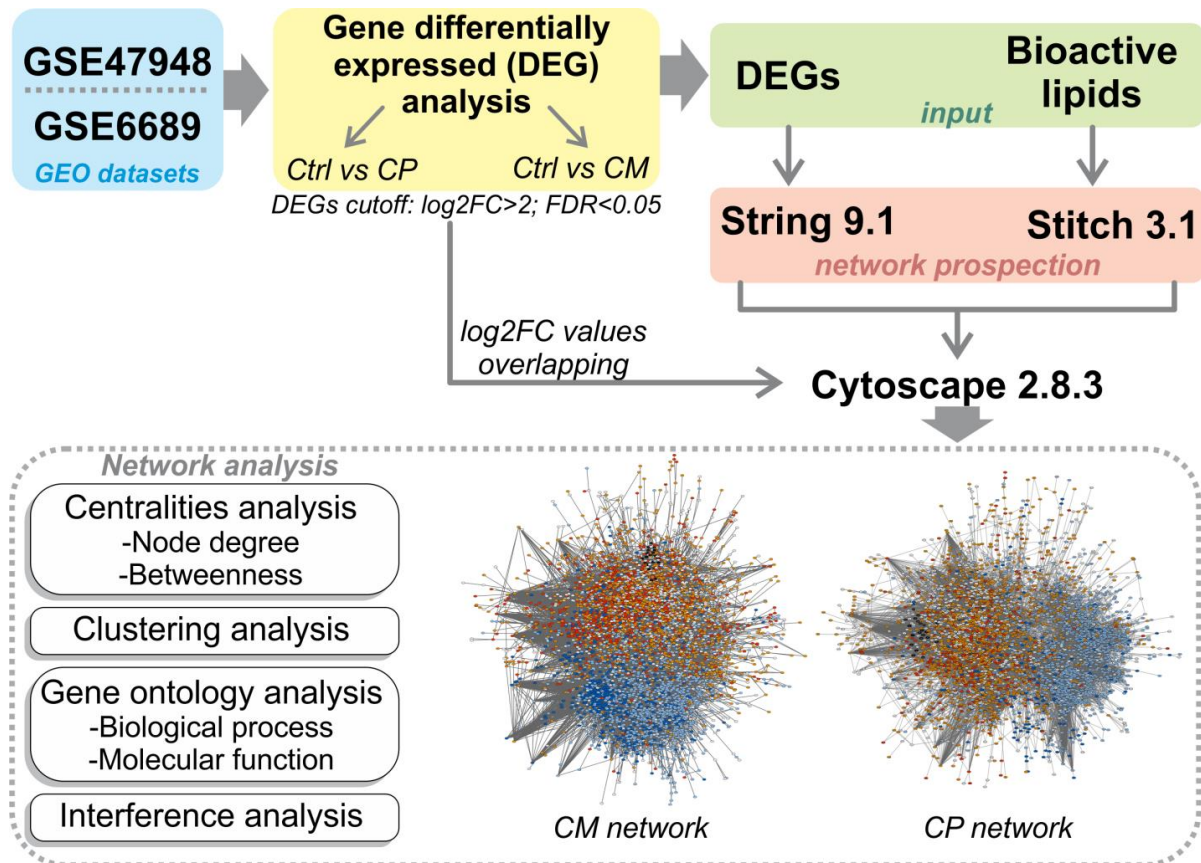


Figure 1. Systems chemo-biology analysis workflow. The transcriptomic datasets (GSE47948 and GSE6689) were obtained and evaluated for DEGs from distinct stages (CP cells and CMs) using the following thresholds: $\log_2FC > 2$ and $FDR < 0.05$. DEGs and bioactive lipids were used as the inputs into STRING 9.1 and STITCH 3.1, respectively. Two interatomic networks were designed from the CP and CM network data and were visualized using the Cytoscape 2.8.3 program. The \log_2FC values were overlaid onto the networks. Centrality analysis was performed to evaluate the node degree and betweenness parameters. The networks were also subjected to clustering and GO analyses to identify the most relevant biological processes. Finally, interference analysis was used to perform virtual knockouts of the selected transcription factors and genes involved in bioactive lipid signaling.

of two major networks: (i) the CP network, which represents the node-DEGs from comparisons between CPs cells and ESCs and (ii) the CM network, which represents the node-DEGs from comparisons between CMs and ESCs (Fig. 2A and B). Furthermore, the nodes within both networks were colored according to the \log_2FC values of the DEGs. Thus, the light blue nodes represent genes displaying decreased expression based on either the microarray or RNA-seq analysis, whereas the dark blue nodes represent genes displaying decreased expression based on both the microarray and RNA-seq analyses (Fig. 2A and B). Furthermore, the gene nodes displaying increased expression were characterized by an orange color when these

nodes were identified based on either the microarray or RNA-seq analysis, whereas red nodes denote the genes detected based on both the microarray and RNA-seq analyses (Fig. 2A and B).

Moreover, the LIPID MAPS, KEGG and AmiGO 1.8 search engines were used according to their default parameters as additional data mining tools (23–25).

Cluster analysis of the interatomic network - The composition of the major clusters in the main network was analyzed using the program Allegro Molecular Complex Detection (AllegroMCODE) according to the following pre-processing parameters: degree threshold, 2; node score threshold, 0.2; k-core, 2; and

maximum network depth, 100 (Fig. 1) (26). The following post-processing parameters were used: expansion of a cluster by one neighbor shell allowed (fluff option enabled) using a node density threshold of 0.1 and deletion of a single connected node from clusters (haircut option enabled). Thus, each cluster displayed a degree of connection for a given group of nodes, also referred to as the “cliquishness” (C_i) value. In this study, $C_i > 3.5$ was used as the threshold.

GO analysis - The major biological processes associated with each cluster and gene set for the genes displaying decreased and increased expression was determined using the plugin Biological Network Gene Ontology (BiNGO) 2.44, a Cytoscape 2.8.3 plugin (Fig. 1) (27). The degree of functional enrichment for a given GO category was quantitatively assessed (p -value) based on a hypergeometric distribution (28). A correction for multiple comparisons was performed by applying the FDR algorithm, which was fully implemented in the BiNGO software, at a significance level of adjusted $p < 0.05$ (29). In addition, the most representative biological processes in each cluster were selected and classified according to their gene expression (increased or decreased) and the experiment that provided these gene expression data (microarray, RNA-Seq or both).

Centrality analysis - To perform centrality analysis, the Centiscape 1.21 software was employed (30). This analysis evaluated the most relevant nodes in the network according to the selected centrality parameters: node degree and betweenness (Fig. 1). Betweenness analysis involved calculating the shortest paths connecting adjacent nodes that pass through each node, as reported by Scardoni *et al.* (31). Additionally, node degree analysis involved evaluating nodal connectivity, which was expressed as the number of connections of a given node (31). An average score was calculated for the node degree and the betweenness using the following definitions: hub, node with a higher node degree score than that of the network average; bottleneck, node with a higher betweenness score than that of the network average (31, 32). Therefore, nodes whose betweenness and node degree were higher than the network values were defined as hub-bottlenecks (HBs). HBs may perform key regulatory functions in the cell; they may also be more likely to be associated with different clusters or biological processes (31, 32).

Interference analysis - Interference 1.0 is a Cytoscape software plug-in that can be used to evaluate the functional influence of a single node or multiple nodes on the network topology via a virtual knockout experiment (33, 34). For this evaluation, the betweenness parameter was selected to be recomputed on the network after each node was removed. Each node that represented a transcription factor in the CP and CM networks was removed to evaluate its effect on the betweenness of each remaining node. For this purpose, we chose to evaluate the results of removing HB transcription factors. Likewise, nodes represented by genes involved in bioactive lipid signaling were also removed via the virtual knockout of multiple nodes. In this sense, interference analysis was performed for each cluster that contained bioactive lipids (clusters I-CP, II-CP, III-CP and III-CM).

Interference analysis can determine whether removing a given node or multiple nodes positively or negatively affects the betweenness score. Negative interference indicates that the removal of a given node or multiple nodes increases the centrality value of a target node, meaning that the presence of a given node is disadvantageous to the topology of the target node. In contrast, positive interference indicates that the removal of a given node or multiple nodes disrupts the topology of the target nodes. To obtain our results, we focused on nodes that induced a positive interference on their target nodes.

RESULTS

Network design and transcriptomic meta-analysis of CP cells and CMs - Our transcriptomic and interatomic analyses revealed two networks displaying distinct transcriptomic profiles: the CP and CM networks (Fig. 1 and 2). The CP network contains DEGs identified based on comparisons between CP cells and ESCs, and the CM network contains DEGs identified based on comparisons between CMs and ESCs. The CP network was composed of 3922 nodes and 18590 edges, whereas the CM network was composed of 4907 nodes and 24814 edges (Fig. 2A and B).

Network prospection in STITCH 3.1 using bioactive lipids as an input allowed us to obtain not only lipids but also Ca^{2+} . In fact, Ca^{2+} regulates ceramide kinase (Cerk) activation and is released from intracellular stores by Sph derivatives (1, 35). Thus, we chose to keep Ca^{2+} in the network for further analysis. Therefore, as

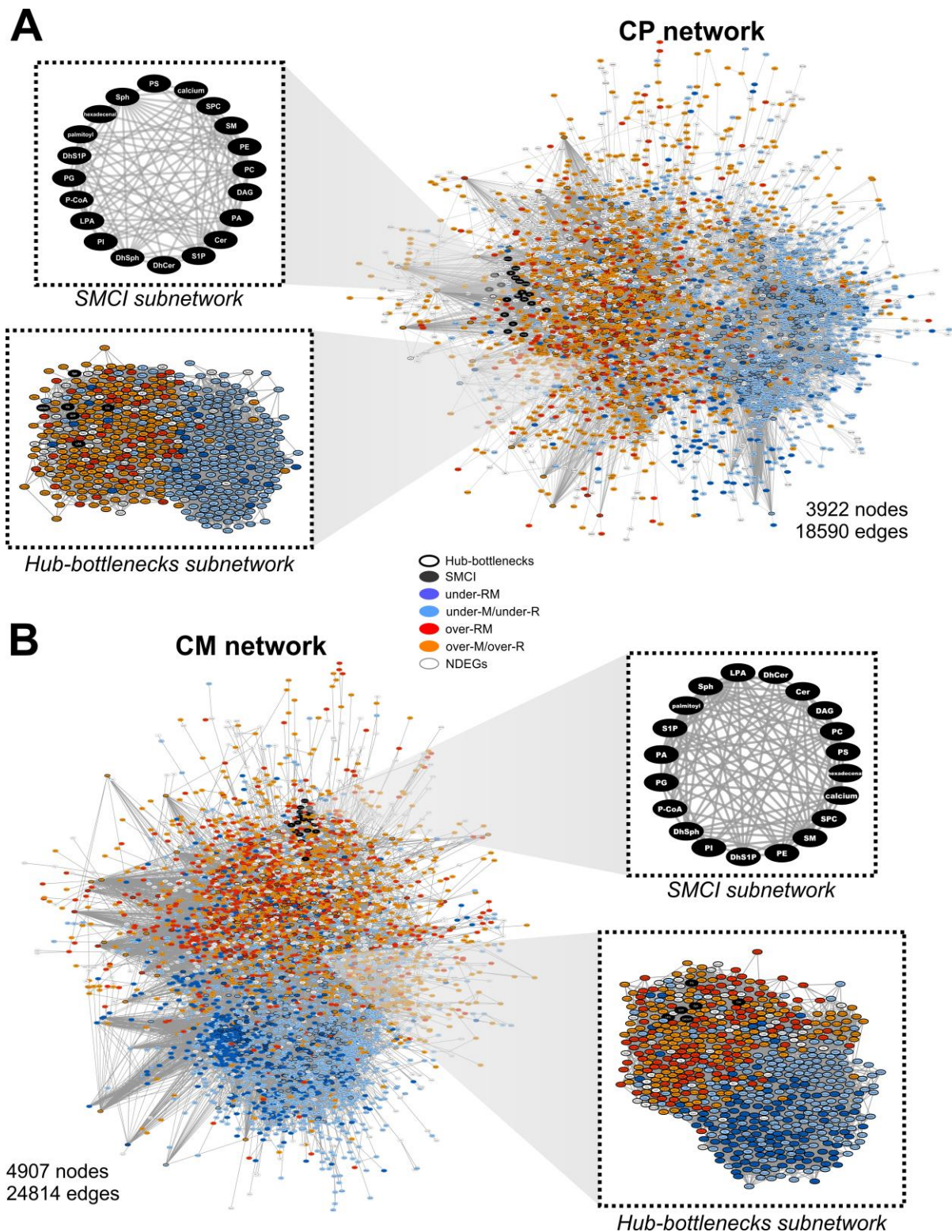


Figure 2. A) Representation of the CP network, containing 3922 nodes and 18590 edges. The subnetworks are represented as SMCI and HB node-DEGs from the CP network. B) Representation of the CM network, containing 4907 nodes and 24814 edges. The subnetworks are represented by SMCI and HB node-DEGs from the CM network. Legend: thick edge node, HB; black node, SMCI; dark blue, underexpressed node-DEG based on both the RNA-seq and microarray analyses; light blue, underexpressed node-DEG based on either the RNA-seq or microarray analysis; red, overexpressed node-DEG based on both the RNA-seq and microarray analyses; orange, overexpressed node-DEG based on either the RNA-seq or microarray analysis; and white, non-DEG.

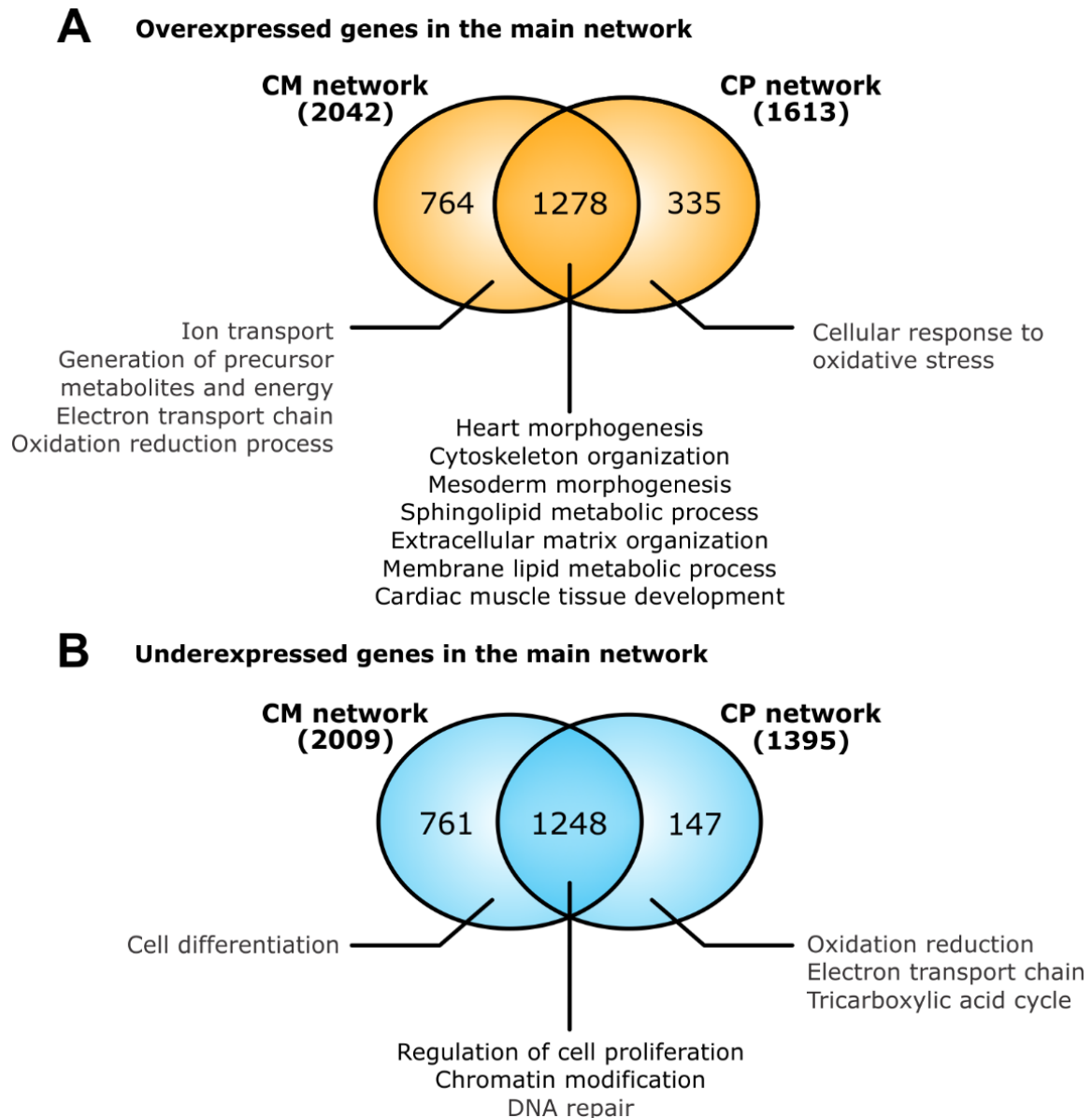


Figure 3. **A)** Comparative GO analysis of all of the overexpressed node-DEGs in the CM and CP networks. **B)** Comparative GO analysis of all of the underexpressed node-DEGs in the CM and CP networks.

shown in Fig. 2A and B, the CP and CM networks share Ca^{2+} and 19 lipids and their derivatives, such as Sph, SIP, Cer, SM, sphingosylphosphorylcholine (SPC), phosphoethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), PA and LPA. These small molecules and Ca^{2+} (SMCI) are shown in both the CP and CM networks as black nodes (Fig. 2A and B).

The DEG data obtained from the microarray or RNA-seq meta-analysis or both were overlaid onto the CP and CM networks (Fig. 2),

generating the “node-DEGs”, a multiplex representation of genes. In this representation, the CM network is composed of 2042 overexpressed genes and 2009 underexpressed genes (Fig. 2A), whereas the CP network is composed of 1613 overexpressed genes and 1395 underexpressed genes (Fig. 2B). Furthermore, we evaluated the number of shared and non-shared node-DEGs between the CP and CM networks (Figs. 3A and B), revealing that 1278 overexpressed node-DEGs and 1248 underexpressed node-DEGs were shared between the CP and CM networks (Figs. 3A and B). However, the CM network contained 764

overexpressed genes and 761 underexpressed genes that were not shared, whereas the CP network contained 335 overexpressed genes and 147 underexpressed genes that were not shared (Fig. 3 A and B).

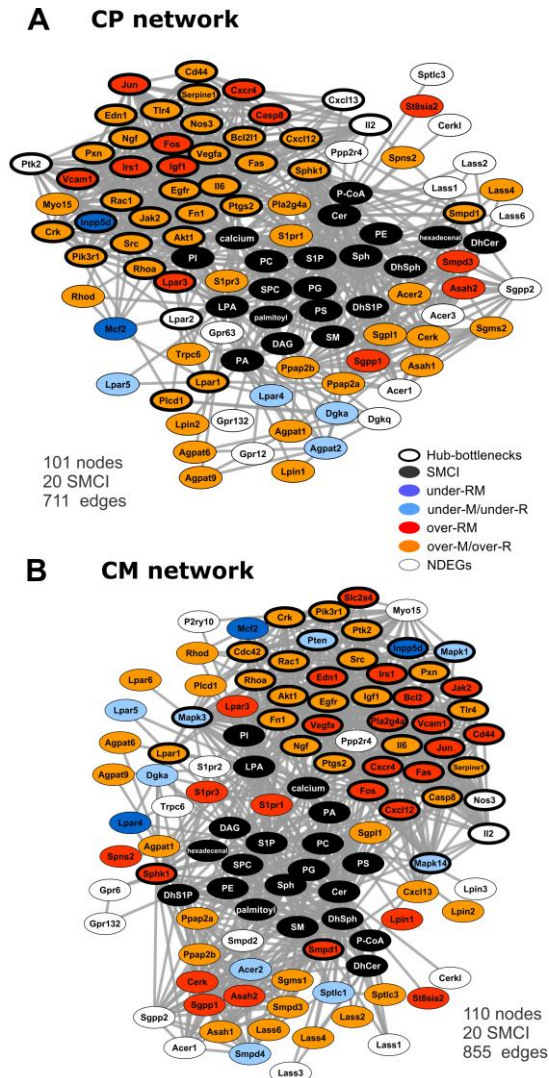


Figure 4. A) Subnetworks of the CP network represented by bioactive lipids and directly interacting nodes. B) Subnetworks of the CM network represented by bioactive lipids and directly interacting nodes.

The associated node-DEGs from the shared and non-shared groups were selected for GO analysis (Figs. 3A and B). The resulting overexpressed node-DEGs that were shared between the CP and CM networks were overrepresented by sphingolipid and membrane lipid metabolic processes, heart and mesoderm morphogenesis, cytoskeleton and ECM organization and cardiac muscle tissue development (Fig. 3A). Interestingly, the

underexpressed node-DEGs that were shared between the CP and CM networks were overrepresented by biological processes associated with the regulation of cell proliferation, chromatin modification and DNA repair (Fig. 3B).

Various node-DEGs that encode proteins associated with bioactive lipid metabolism and signaling were found to be overexpressed node-DEGs that were shared between the CP and CM networks (Table 1). Furthermore, bioactive lipids interact with several overexpressed node-DEGs whose expression is essential for cell signaling. Moreover, S1P appeared in the both CP and CM networks to be associated with Akt1, Fn1, IL6, Nos3, Rac1, Rhoa and Vegfa (Fig. 4A and B). Additionally, LPA was directly associated with Akt1, Edn1, Fn1, Ptk2, Pxn, Rac1, Rhoa, Rhod and Src (Fig. 4A and B).

Centrality and GO analyses – Centrality analysis indicated that the HB-associated subnetwork from the CM and CP networks was composed of 649 nodes and 7717 edges in the CM network and 534 nodes and 5369 edges in the CP network (Fig. 2A and B). Small molecules, such as Cer, LPA, PA, Sph and S1P and Ca^{2+} , were also found to be HB nodes (Fig. 2A and B). In addition, various HBs that are associated with bioactive lipids, such as Cav1, LPAR, Sphk1 and Smpd1, were detected (Fig. 2). Moreover, we detected several overexpressed HB node-DEGs related to the ECM, cell adhesion and integrin signaling in the CM and CP networks; these genes included Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col6a2, Lama2, Mmp2, Itga4, Itga5, Itga7 and Itgb1, Fn1, Pxn, Msn, Actb and Actn1 (Fig. 2).

Several HBs that were overexpressed node-DEGs associated with murine heart development were found, such as Tbx2, Tbx5, Hand2, Bmp2, Bmp4, Bmp7, Isl1, TGF- β 1, Gata4, Gata6, Nkx2-5 and Erbb2 (Fig. 2).

We also evaluated shared and non-shared overexpressed and underexpressed node-DEGs in HB subnetworks from the CP and CM networks, followed by GO analysis (Figs. 5A and B). This analysis revealed that the shared overexpressed HB node-DEGs were associated with cell communication, heart morphogenesis, cytoskeletal organization, cell-cell and cell-matrix adhesion, ECM organization, integrin-mediated signaling, positive regulation of lipid kinase activity and positive regulation of lipid metabolic processes (Fig. 5A). Alternatively, the underexpressed node-DEGs shared between the

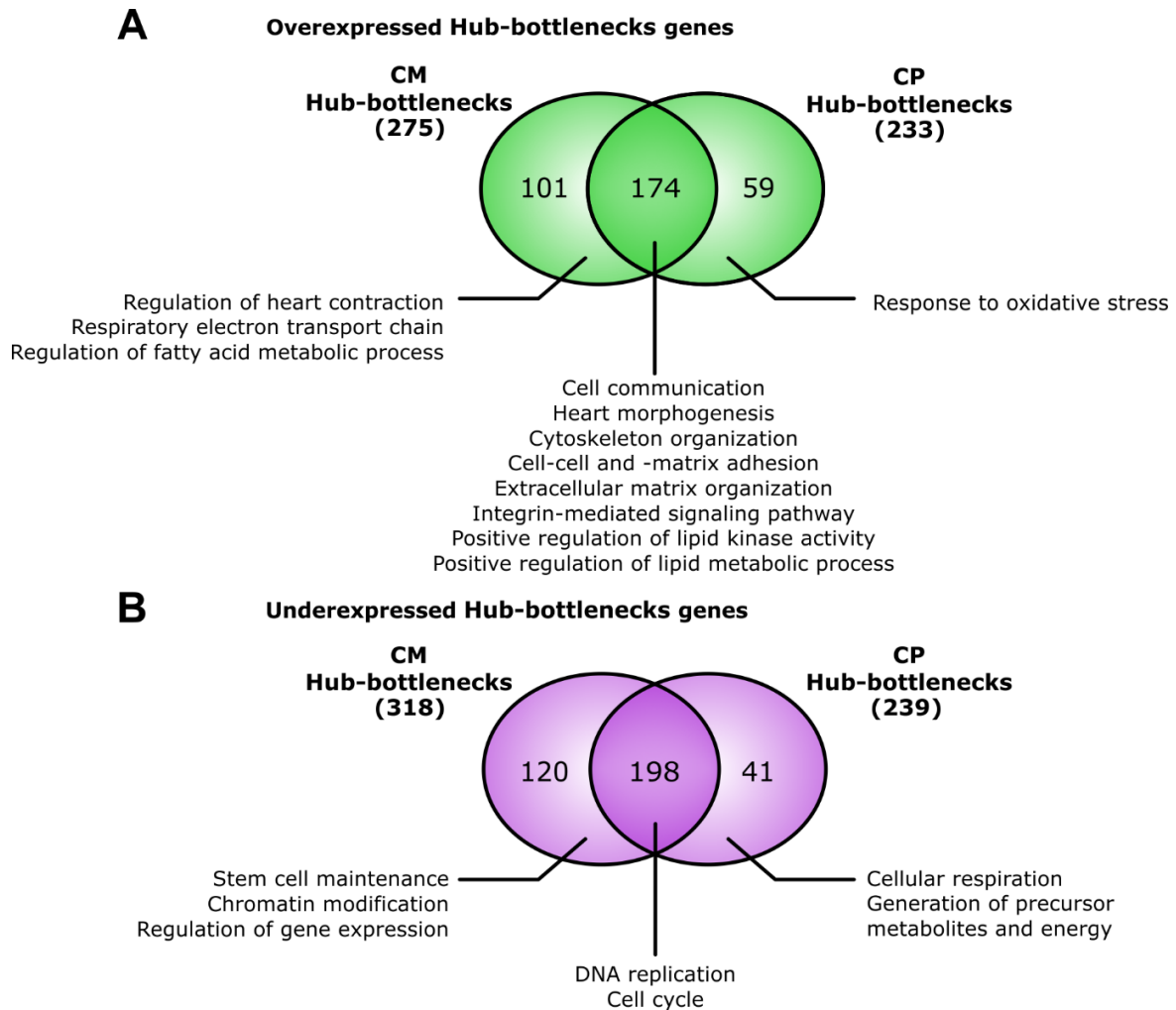


Figure 5. **A)** Comparative GO analysis of the overexpressed HB genes in the CM and CP networks. **B)** Comparative GO analysis of the HBs that were underexpressed node-DEGs in the CM and CP networks.

CP and CM networks were represented by DNA replication and the cell cycle (Fig. 5B).

Clustering and GO analysis – Clustering analysis of the networks was performed to understand the role of bioactive lipids in cardiac differentiation. As a result of this analysis, four statistically significant clusters were identified in both the CP and CM networks that were above the threshold values (Figs. 6 and 7). The predominant GOs in clusters I-CP, II-CP, and III-CP (Fig. 6) were related to biological processes that are essential for heart development, such as the regulation of cell proliferation, differentiation, the epithelial-to-mesenchymal transition, neural crest cell migration and differentiation, and mesenchymal and epithelial development (Figs. 6A to C). Biological processes related to the response to lipids and to cellular lipid and sphingoid metabolism were also represented in clusters I-

CP, II-CP and III-CP, which may indicate a relationship between bioactive lipids and morphogenetic processes (Fig. 6A to C). Additionally, the majority of the node-DEGs that encode proteins related to these processes were overexpressed (Fig. 6A to C). In the CM network (Fig. 2B), similar biological processes were detected in clusters I-CM and III-CM, which were predominantly represented by overexpressed node-DEGs (Fig. 7A and C). Alternatively, cluster II-CM was related to cardiac metabolism associated with heart contraction (Fig. 6B).

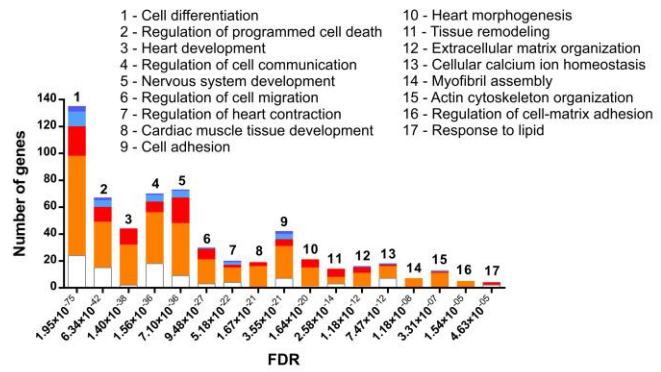
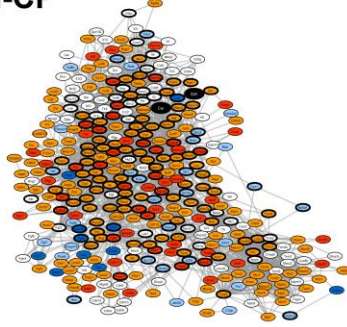
Clusters IV-CP and IV-CM were primarily represented by underexpressed node-DEGs related to the cell cycle, RNA processing, DNA repair and replication (Fig. 6D and 7D).

Interference analysis - The most relevant results according to the interference analysis were selected within each analyzed cluster and

A Cluster I-CP

348 nodes
2 SMCI
2004 edges

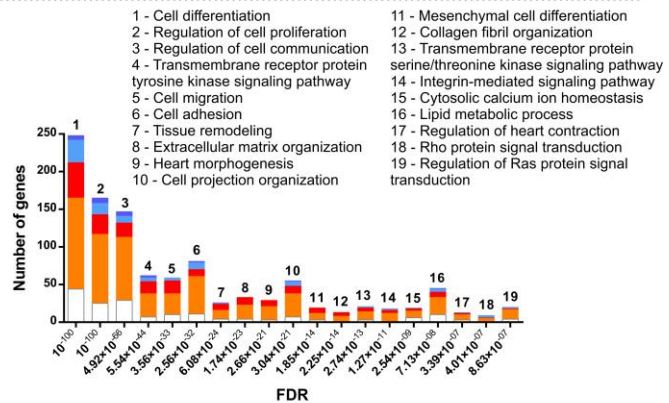
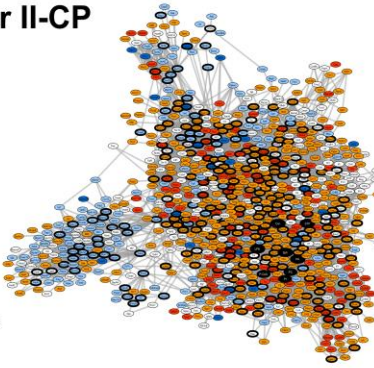
○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs



B Cluster II-CP

905 nodes
8 SMCI
4236 edges

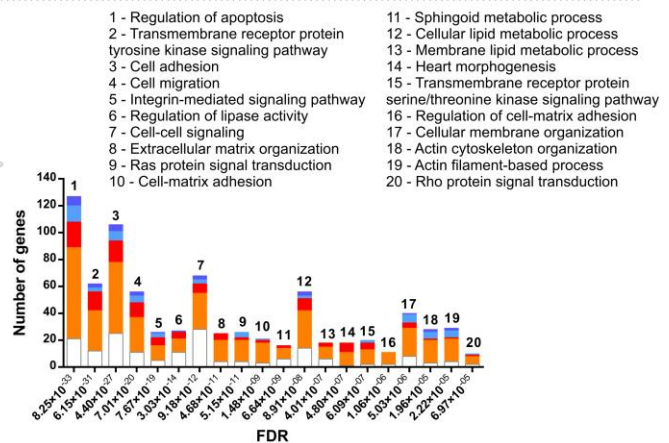
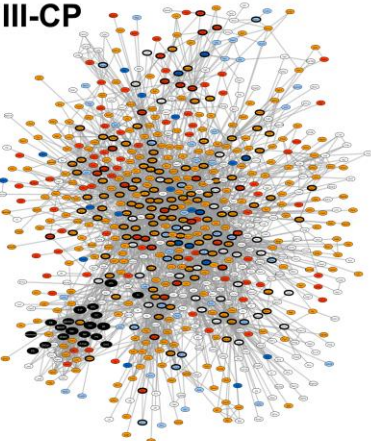
○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs



C Cluster III-CP

710 nodes
19 SMCI
2767 edges

○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs



D Cluster IV-CP

843 nodes
0 SMCI
6862 edges

○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs

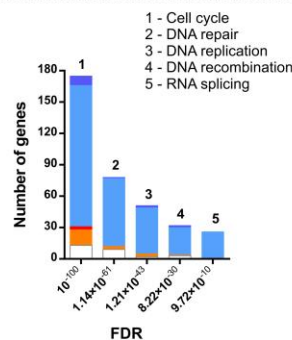
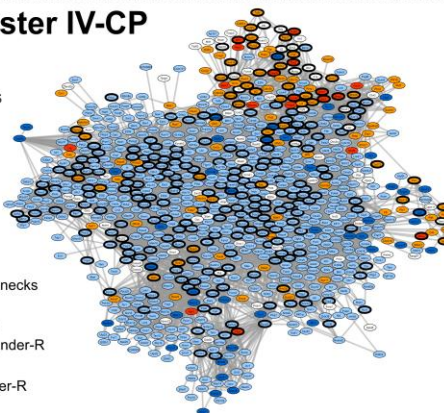


Figure 6. Cluster representation of the CP network, as well as the most relevant biological processes. **A)** Cluster I-CP; **B)** Cluster II-CP; **C)** Cluster III-CP; **D)** Cluster IV-CP. In the graphs, the x axis corresponds to the FDR for GO analysis, and the y axis corresponds to the number of node-DEGs. The colored bars are described in the legend. Legend: thick edge, HB; black, SMCI; dark blue,

underexpressed node-DEG based on both the RNA-seq and microarray analyses; light blue, underexpressed node-DEG based on either the RNA-seq or microarray analysis; red, overexpressed node-DEG based on both the RNA-seq and microarray analyses; orange, overexpressed node-DEG based on the RNA-seq or microarray analysis; and white, non-DEG.

are presented in Table 2. These transcription factors interfered with the betweenness score of several nodes related to cardiac development, indicating that in a biological context, these target nodes can be positively regulated by the removed nodes. Thus, the virtual knockout of Hand2 affected Cd44 and TGF- β 1 in both the I-CP and II-CP clusters (Table 2). In addition, in II-CP, Nos3 was affected by the virtual knockout of Stat3, whereas the Smad3 knockout affected the betweenness score of Myod1 and Pitx2 (Table 2). Similarly, in cluster III-CP, Smad3 knockout affected Fn1 and Mmp9. Interference analysis was also performed to identify the important nodes in our networks that were associated with bioactive lipid signaling. For this purpose, S1PR1, S1PR3, Sphk1, LPAR1, LPAR3 and CerK were selected for virtual knockout. The removal of these nodes which are associated with bioactive lipid signaling interfered with several node-DEGs associated with signaling cascades, such as Vegfa, Akt1 and Rhoa in the III-CM cluster. Alternatively, in the III-CP cluster, the removal of these nodes increased interference with Nras, Rhoa and Ptgs2.

DISCUSSION

Our results indicated the manner in which murine cardiogenesis progresses under *in vitro* conditions. Figs. 3 and 5 show the node-DEG sets and bioprocesses necessary for each specific stage of development (CP cells and CMs), as well those which are shared between both stages of development.

Membrane dynamics - The embryonic vertebrate heart undergoes a series of orchestrated events during cardiac development, growth and maturation; these events involve cell movements and morphological transformations (36). The ECM is a dynamic structure that provides a scaffold for cell adhesion in the interstitial space and that facilitates the propagation of mechanical signals (37–39). The HB NSMase (Smpd1), which was overexpressed in the CP and CM networks (Fig. 4), can be

transiently mechanoactivated in caveolae, leading to SM cleavage and promoting Cer and PC production (40). Moreover, SM cleavage promotes the redistribution of cholesterol in the plasma membrane bilayer, altering the cholesterol concentration and modulating the activity of membrane-associated signal transduction proteins. Accordingly, GO analysis indicated the membrane lipid metabolic process represented by overexpressed node-DEGs in the main network and in the III-CP cluster (Fig. 3A and 6C) (41, 42).

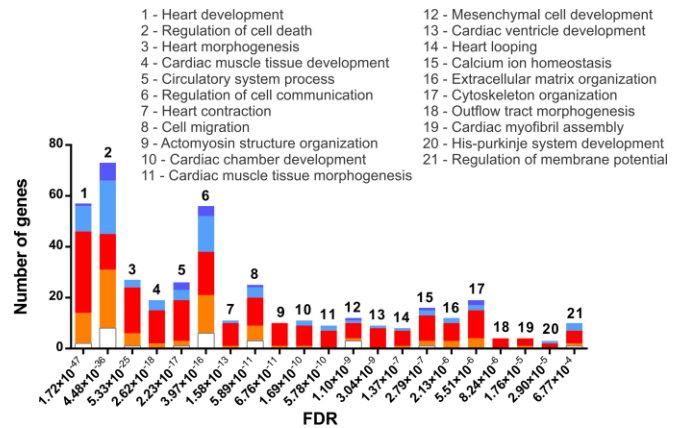
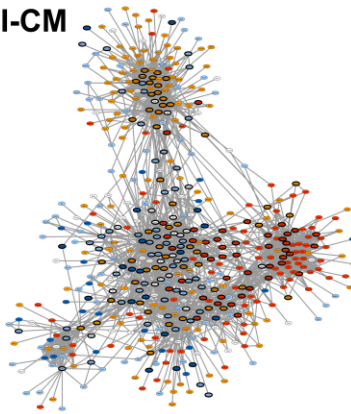
Notably, Edn1, a peptide whose receptor (the endothelin B receptor Ednrb) is associated with Cav1 in caveolae, is capable of increasing the Cer and glycosphingolipid levels (43, 44). The HBs Edn1 and Cav1 were overexpressed in the CP and CM networks, and Edn1 interacted directly with bioactive lipids in both networks (Fig. 4). Furthermore, Edn1 induces Nkx2.5 recruitment in cardiac progenitor cells and promotes the differentiation of pacemaker cells during cardiogenesis (45).

Cell motility, migration and cytoskeletal reorganization - Transient increases in the Cer levels promote the activation of a signaling cascade triggered by Src (40). The Src-associated node-DEG was overexpressed in the CP and CM networks and was also associated with bioactive lipids, as shown in Fig. 4. Furthermore, Src regulates Cav1 cellular localization and mediates Ptk2 phosphorylation, modulating F-actin dynamics, cell polarity and adhesion during migration, as demonstrated by our GO analysis of the clusters and the overexpressed HBs (Figs. 5A, 6A to C and 7A to C) (46, 47). In addition, the HB Pxn was an overexpressed node-DEG that is essential for focal adhesion complexes that interacted directly with LPA in the interactomic networks (Fig. 4). One study reported that LPA is able to stimulate Ptk2 and Pxn phosphorylation in a surface receptor-dependent manner and that this stimulation is essential for the migration of PANC-1 cells (48).

A Cluster I-CM

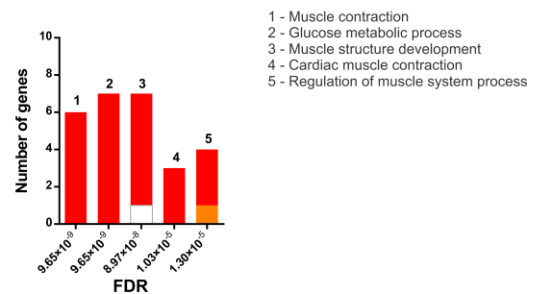
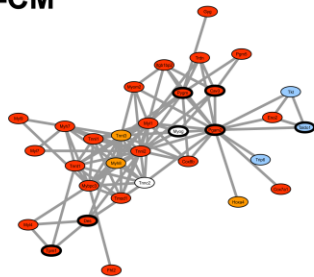
514 nodes
0 SMCI
2540 edges

○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs

**B Cluster II-CM**

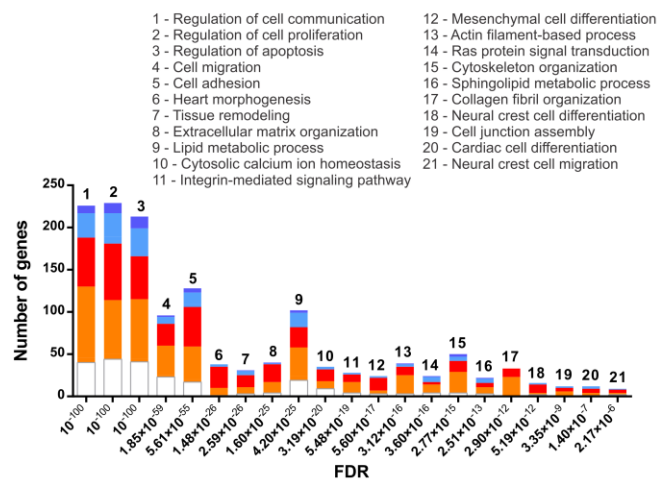
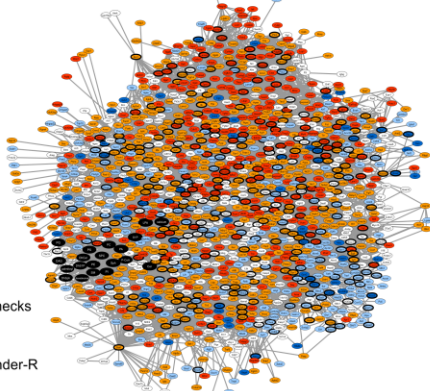
32 nodes
0 SMCI
96 edges

○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs

**C Cluster III-CM**

1363 nodes
20 SMCI
7043 edges

○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs

**D Cluster IV-CM**

1022 nodes
0 SMCI
8475 edges

○ Hub-bottlenecks
● SMCI
● under-RM
● under-M/under-R
● over-RM
● over-M/over-R
○ NDEGs

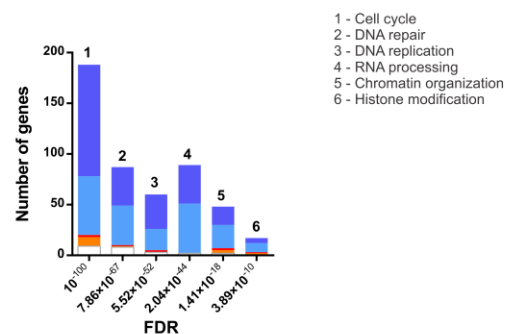
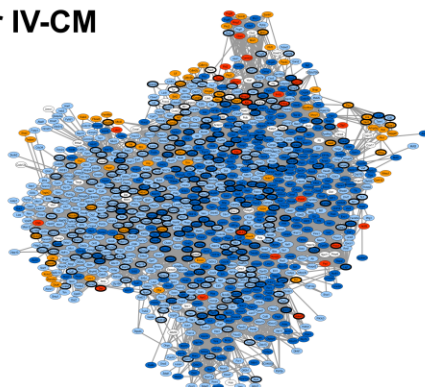


Figure 7. Cluster representation of the CM network, as well as a graphical representation of the most relevant biological processes. **A)** Cluster I-CM; **B)** Cluster II-CM; **C)** Cluster III-CM; **D)** Cluster IV-CM. In the graphs, the x axis corresponds to the FDR for GO analysis, and the y axis corresponds to number of genes. The colored bars are described in the legend. Legend: thick edge, HB; black,

SMCI; dark blue, underexpressed node-DEG based on both the RNA-seq and microarray analyses; light blue, underexpressed node-DEG based on either the RNA-seq or microarray analysis; red, overexpressed node-DEG based on both the RNA-seq and microarray analyses; orange, overexpressed node-DEG based on either the RNA-seq or microarray analysis; and white, non-DEG.

Furthermore, cell motility and cell-cell contacts are related to filamin A (Flna), whose node-DEG was overexpressed in the CP and CM networks. Flna promotes plasma membrane cross-linking between Sphk1 and S1PR1, forming an intracellular signaling scaffold that is able to recruit Rho GTPases and orchestrate cell migration and lamellipodia formation (49, 50). Additionally, the PI3k/Akt pathway, which may be regulated by Cer and S1PR1, is required for the expression of cardiac transcription factors in mesodermal cells and has been associated with cardiac commitment, lamellipodia formation, and cytoskeletal reorganization via Rac1 activation (11, 51–53).

Cell-ECM communication and ECM remodeling - Cardiac morphogenesis is an adhesion-dependent process in which integrin signaling mediates the interaction between the cell and the ECM, as well as cell-cell interactions (54). Furthermore, integrin signaling activation is positively regulated by lipid rafts (55). Accordingly, integrin signaling was detected in the II-CP, III-CP and III-CM clusters (Fig. 6B and C, 7C), whereas ECM organization was detected in I-CP, II-CP, III-CP, I-CM and III-CM (Fig. 6A-C, 7B and C). One study proposed that stable membrane rafts, which are enriched in cholesterol and SM, are necessary for the activity of hyaluronan synthase (Has). In the CP and CM networks, Has2 was found to be an overexpressed node-DEG associated with Cd44, a hyaluronan receptor that interacts with Cer, as shown in Fig. 4. Hyaluronan is an abundant component of cardiac jelly and is essential for the endocardial cushion and atrioventricular canal morphogenesis during heart development (56). Furthermore, PI3K/Akt activation is associated with increased hyaluronan synthesis via a mechanism that involves S1P stimulation (55, 69, 70). In addition, S1P promotes the nuclear accumulation of myocardin (Myocd), which was overexpressed in the CP and CM networks. Myocd transcriptionally co-activates Srf in a RhoA-dependent manner (57). S1P and LPA activate Srf, which has been reported to regulate cardiac and smooth muscle genes, and the Srf null mutant exhibits disrupted gastrulation and mesoderm development (58, 59). In addition, Srf

activation by S1P and LPA is mediated by RhoA/Rho activity; GO analysis revealed Rho signaling in the II-CP and III-CP clusters (Fig. 6B and C).

Importantly, during heart morphogenesis, LPA activates and increases Mmp2 and Mmp9 gene expression in a LPA receptor signaling-dependent manner (60–62), promoting ECM degradation during cardiac loop formation and tissue remodeling; this effect was detected in the I-CP, II-CP, III-CM clusters (Fig. 6A-B, 7C) (63, 64). Furthermore, S1P is able to induce Timp2 cell release, which is required to generate active Mmp2, which was an overexpressed HB in both the CP and CM networks (64, 65).

In the CP and CM networks, Yap1 was found to be an overexpressed node-DEG. The nuclear localization and activation of Yap1 is regulated by S1P via F-actin polymerization (66). Yap1 is considered as a sensor and mediator of mechanotransduction that has been associated with cardiac regeneration and cardiac growth (67). Furthermore, Yap1 acts as a cofactor of Tbx5, a transcription factor that is expressed in the heart tube during cardiac morphogenesis, and the loss of Tbx5 function causes heart septum defects (68).

Virtual knockout of transcription factors and molecules associated with bioactive lipid signaling – Virtual knockout of the transcription factor Hand2 affected the betweenness centrality of Cd44, Fgf8 and TGF- β 1, which are essential components of cardiogenesis (69, 70). Interestingly, sphingolipids are co-regulators of the TGF- β signaling pathway, and cells transfected with sphingosine-1-phosphate phosphatase (Sgpp1) increase collagen type 1 alpha expression synergistically with the TGF- β cascade (71). Furthermore, S1P transactivates the TGF- β receptor, thereby inducing connective tissue growth factor (CTGF), which has been associated with myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction (72, 73).

Moreover, S1P initiates a signaling cascade via S1PR1 and activates the transcription factor Stat3 (74), which is necessary for left ventricular hypertrophy (75). Virtual knockout of Stat3 altered the betweenness score of Nos3 (Table 2). In the CP network, Nos3 was detected as an overexpressed HB that interacted directly with

bioactive lipids, as shown in Fig. 4. Furthermore, Nos3 deficiency results in congenital septal defects and heart failure via increased apoptosis in atrioventricular cushion regions, as well as increased incidence of bicuspid aortic valve formation (76).

However, Smad3 interfered with the transcriptional activation of the muscle-specific target genes Myod1 and Pitx2. Pitx2 is a target of Smad2/3 signaling that is crucial for the orientation of left/right identity during heart development (77, 78). Furthermore, Smad3 phosphorylation is induced by TGF- β and is increased in the presence of Sgpp1 (71).

The most relevant interference analysis results in the multiple set knockout for genes related to bioactive lipid signaling were Akt1 and Rho; as previously described, Akt1 and Rho are essential for sphingolipid signaling and the progression of heart morphogenesis. In addition, virtual knockout of genes related to bioactive lipid signaling interfered with the betweenness score of Vegfa, which plays important roles in endocardial cushion formation and in the endothelial-to-mesenchymal transition (118).

CONCLUSION

In this study, a meta-analysis of different transcriptomic data was performed to evaluate the relationship between DEGs and bioactive

lipids. Based on these results, we propose an interaction between the extracellular environment, which is composed of matrix molecules, and bioactive signaling lipids. External environmental stimuli and morphogens affect lipid membrane composition and lipid rafts, inducing several signaling cascades by altering the levels of available Cer, SM and cholesterol. Additionally, transient changes in the Cer and SM levels can stimulate S1P and LPA and activate signaling cascades associated with cell communication, adhesion and motility. The signaling pathways modulated by bioactive lipids also induce the remodeling of the ECM and the synthesis of new ECM components. Currently, it is understood that changes in the external cellular environment can regulate gene expression. Similarly, this study suggests that the signaling activated by bioactive lipids may be associated with the cellular response to various stimuli; these responses generate cell signaling and gene expression adaptation during differentiation and cardiac morphogenesis.

REFERENCES

1. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150
2. Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W., and Welti, R. (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* **45**, 250–278
3. Berdichevets, I. N., Tyazhelova, T. V, Shimshilashvili, K. R., and Rogaev, E. I. (2010) Lysophosphatidic acid is a lipid mediator with wide range of biological activities. Biosynthetic pathways and mechanism of action. *Biochem. Biokhimiia* **75**, 1088–1097
4. De Faria Poloni, J., Chapola, H., Feltes, B. C., and Bonatto, D. (2014) The importance of sphingolipids and reactive oxygen species in cardiovascular development. *Biol. Cell* **106**, 167–181
5. Kleger, A., Liebau, S., Lin, Q., von Wichert, G., and Seufferlein, T. (2011) The impact of bioactive lipids on cardiovascular development. *Stem Cells Int.* **2011**, 916180

6. Bieberich, E. (2012) It's a lipid's world: Bioactive lipid metabolism and signaling in neural stem cell differentiation. *Neurochem. Res.* **37**, 1208–1229
7. Karliner, J. S., Honbo, N., Summers, K., Gray, M. O., and Goetzl, E. J. (2001) The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 1713–1717
8. Wendler, C. C., and Rivkees, S. a (2006) Sphingosine-1-phosphate inhibits cell migration and endothelial to mesenchymal cell transformation during cardiac development. *Dev. Biol.* **291**, 264–277
9. Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S., and Stainier, D. Y. R. (2000) A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* **406**, 192–195
10. Xu, Y. J., Panagia, V., Shao, Q., Wang, X., and Dhalla, N. S. (1996) Phosphatidic acid increases intracellular free Ca²⁺ and cardiac contractile force. *Am. Physiol. Soc.* **271**, H651–H659
11. Faustino, R. S., Behfar, A., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. (2008) Genomic chart guiding embryonic stem cell cardiopoiesis. *Genome Biol.* **9**, R6
12. Wamstad, J. A., Alexander, J. M., Truty, R. M., Shrikumar, A., Li, F., Eilertson, K. E., Ding, H., Wylie, J. N., Pico, A. R., Capra, A., Erwin, G., Kattman, S. J., Keller, G. M., Srivastava, D., Levine, S. S., Pollard, K. S., Holloway, A. K., Boyer, L. A., and Bruneau, B. G. (2013) Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage. **151**, 206–220
13. Smyth, G. K. (2005) in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* Statistics for Biology and Health (Gentleman, R., Carey, V. J., Huber, W., Irizarry, R. A., and Dudoit, S., eds.) pp. 397–420, Springer-Verlag, New York
14. Patel, R. K., and Jain, M. (2012) NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One* **7**, e30619
15. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359
16. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., and Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578
17. Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. (2014) HTSeq A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Prepr.* <http://biorxiv.org/content/early/2014/02/20/002824>
18. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140

19. Kuhn, M., Szklarczyk, D., Franceschini, A., von Mering, C., Jensen, L. J., and Bork, P. (2012) STITCH 3: zooming in on protein-chemical interactions. *Nucleic Acids Res.* **40**, D876–D880
20. Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., von Mering, C., and Jensen, L. J. (2013) STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* **41**, D808–D815
21. Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., and Ideker, T. (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* **27**, 431–432
22. Workman, C., Christmas, R., Avila-campilo, I., and Creech, M. (2013) Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* **2**, 2366–2382
23. Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., and Subramaniam, S. (2007) LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res.* **35**, W606–W612
24. Kanehisa, M., and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30
25. Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., AmiGO Hub, and Web Presence Working Group (2009) AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288–289
26. Bader, G. D., and Hogue, C. W. V (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* **4**, 2
27. Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**, 3448–3449
28. Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L., and Potier, M.-C. (2007) Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics* **23**, 401–407
29. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing Author (s): Yoav Benjamini and Yosef Hochberg Source : Journal of the Royal Statistical Society . Series B (Methodological), Vol . 57 , No . 1 Published by : J. R. Stat. Soc. Ser. B **57**, 289–300
30. Scardoni, G., Petterlini, M., and Laudanna, C. (2009) Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics* **25**, 2857–2859
31. Scardoni, G., and Laudanna, C. (2012) in *New Frontiers in Graph Theory* (Zhang, Y., ed.) pp. 323–348, InTech
32. Newman, M. E. J. (2005) A measure of betweenness centrality based on random walks. *Soc. Networks* **27**, 39–54

33. Scardoni, G., Montresor, A., Tosadori, G., and Laudanna, C. (2014) Node interference and robustness: performing virtual knock-out experiments on biological networks: the case of leukocyte integrin activation network. *PLoS One* **9**, e88938
34. Feltes, B. C., and Bonatto, D. (2013) Combining small molecules for cell reprogramming through an interatomic analysis. *Mol. Biosyst.* **9**, 2741–2763
35. Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2005) Calmodulin is involved in the Ca²⁺-dependent activation of ceramide kinase as a calcium sensor. *J. Biol. Chem.* **280**, 40436–40441
36. Chen, J.-N., Cowan, D. B., and Mably, J. D. (2005) Cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. *Heart Fail. Clin.* **1**, 157–170
37. Little, C. D., and Rongish, B. J. (1995) The extracellular matrix during heart development. *Experientia* **51**, 873–882
38. Rozario, T., and Desimone, D. W. (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis : A dynamic view. *Dev. Biol.* **341**, 126–140
39. Bowers, S. L. K. K., Banerjee, I., and Baudino, T. A. (2010) The extracellular matrix: at the center of it all. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 474–482
40. Czarny, M., and Schnitzer, J. E. (2004) Neutral sphingomyelinase inhibitor scyphostatin prevents and ceramide mimics mechanotransduction in vascular endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H1344–H1352
41. Qin, J., Berdyshev, E., Poirer, C., Schwartz, N. B., and Dawson, G. (2012) Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of Hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt. *J. Biol. Chem.* **287**, 13620–13632
42. Armstrong, D., and Zidovetzki, R. (2008) Amplification of diacylglycerol activation of protein kinase C by cholesterol. *Biophys. J.* **94**, 4700–4710
43. Yamaguchi, T., Murata, Y., Fujiyoshi, Y., and Doi, T. (2003) Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1816–1827
44. Catalán, R. E., Aragonés, M. D., Martínez, a M., and Fernández, I. (1996) Involvement of sphingolipids in the endothelin-1 signal transduction mechanism in rat brain. *Neurosci. Lett.* **220**, 121–124
45. Zhang, X., Guo, J.-P., Chi, Y.-L., Liu, Y.-C., Zhang, C.-S., Yang, X.-Q., Lin, H.-Y., Jiang, E.-P., Xiong, S.-H., Zhang, Z.-Y., and Liu, B.-H. (2012) Endothelin-induced differentiation of Nkx2.5⁺ cardiac progenitor cells into pacemaking cells. *Mol. Cell. Biochem.* **366**, 309–318
46. Westhoff, M. A., Serrels, B., Fincham, V. J., Frame, M. C., and Carragher, N. O. (2004) Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics

- to Survival Signaling Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 8113–8133
47. Rathor, N., Zhuang, R., Wang, J.-Y., Donahue, J. M., Turner, D. J., and Rao, J. N. (2014) Src-mediated caveolin-1 phosphorylation regulates intestinal epithelial restitution by altering Ca(2+) influx after wounding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G650–G658
 48. Liao, Y., Mu, G., Zhang, L., Zhou, W., Zhang, J., and Yu, H. (2013) Lysophosphatidic acid stimulates activation of focal adhesion kinase and paxillin and promotes cell motility, via LPA1-3, in human pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* **58**, 3524–3533
 49. Maceyka, M., Alvarez, S. E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2008) Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5687–5697
 50. Zhou, X., Borén, J., and Akyürek, L. M. (2007) Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* **17**, 222–229
 51. Sheehy, S. P., Grosberg, A., and Parker, K. K. (2012) The contribution of cellular mechanotransduction to cardiomyocyte form and function. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **11**, 1227–1239
 52. Castellano, E., and Downward, J. (2011) RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* **2**, 261–274
 53. Putnam, A. J., Schulz, V. V., Freiter, E. M., Bill, H. M., and Miranti, C. K. (2009) Src, PKCalpha, and PKCdelta are required for alphavbeta3 integrin-mediated metastatic melanoma invasion. *Cell Commun. Signal.* **7**, 10
 54. MacKenna, D., Summerour, S. R., and Villarreal, F. J. (2000) Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc. Res.* **46**, 257–263
 55. Leitinger, B., and Hogg, N. (2002) The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell Sci.* **115**, 963–972
 56. Camenisch, T. D., Biesterfeldt, J., Brehm-Gibson, T., Bradley, J., and McDonald, J. a (2001) Regulation of cardiac cushion development by hyaluronan. *Exp. Clin. Cardiol.* **6**, 4–10
 57. Zhao, X., Ding, E. Y., Yu, O. M., Xiang, S. Y., Tan-Sah, V. P., Yung, B. S., Hedgpeth, J., Neubig, R. R., Lau, L. F., Brown, J. H., and Miyamoto, S. (2014) Induction of the matricellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **75**, 152–161
 58. Lockman, K., Hinson, J. S., Medlin, M. D., Morris, D., Taylor, J. M., and Mack, C. P. (2004) Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors. *J. Biol. Chem.* **279**, 42422–42430

59. Brand, T. (2003) Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev. Biol.* **258**, 1–19
60. Kato, K., Fukui, R., Okabe, K., Tanabe, E., Kitayoshi, M., Fukushima, N., and Tsujiuchi, T. (2012) Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 790–793
61. Komachi, M., Sato, K., Tobo, M., Mogi, C., Yamada, T., Ohta, H., Tomura, H., Kimura, T., Im, D.-S., Yanagida, K., Ishii, S., Takeyoshi, I., and Okajima, F. (2012) Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. *Cancer Sci.* **103**, 1099–1104
62. Park, S. Y., Jeong, K. J., Panupinthu, N., Yu, S., Lee, J., Han, J. W., Kim, J. M., Lee, J. S., Kang, J., Park, C. G., Mills, G. B., and Lee, H. Y. (2011) Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene* **30**, 1351–1359
63. Kim, E.-S., Kim, J.-S., Kim, S. G., Hwang, S., Lee, C. H., and Moon, A. (2011) Sphingosine 1-phosphate regulates matrix metalloproteinase-9 expression and breast cell invasion through S1P3-Gαq coupling. *J. Cell Sci.* **124**, 2220–2230
64. Linask, K. K., Han, M., Cai, D. H., Brauer, P. R., and Maisastry, S. M. (2005) Cardiac morphogenesis: matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping. *Dev. Dyn.* **233**, 739–753
65. Mascall, K. S., Small, G. R., Gibson, G., and Nixon, G. F. (2012) Sphingosine-1-phosphate-induced release of TIMP-2 from vascular smooth muscle cells inhibits angiogenesis. *J. Cell Sci.* **125**, 2267–2275
66. Miller, E., Yang, J., DeRan, M., Wu, C., Su, A. I., Bonamy, G. M. C., Liu, J., Peters, E. C., and Wu, X. (2012) Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem. Biol.* **19**, 955–962
67. Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L. B., Murakami, M., Qi, X., McAnally, J., Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Tan, W., Shelton, J. M., Richardson, J. a, Sadek, H. a, Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2013) Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13839–13844
68. Horb, M. E., and Thomsen, G. H. (1999) Tbx5 is essential for heart development. *Development* **126**, 1739–1751
69. Azhar, M., Schultz, J. E. J., Grupp, I., Dorn II, G. W., Meneton, P., Molin, D. G. M., Gittenberger-de Groot, A. C., and Doetschman, T. (2003) Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 391–407
70. Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y.-P., Jiao, K., Schwartz, R. J., Klingensmith, J., and Meyers, E. N. (2006) Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development* **133**, 2435–2445

71. Sato, M., Markiewicz, M., Yamanaka, M., Bielawska, A., Mao, C., Obeid, L. M., Hannun, Y. a, and Trojanowska, M. (2003) Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators. *J. Biol. Chem.* **278**, 9276–9282
72. Katsuma, S., Ruike, Y., Yano, T., Kimura, M., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2005) Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by sphingosine 1-phosphate in rat cultured mesangial cells. *FEBS Lett.* **579**, 2576–2582
73. Garrett, Q., Khaw, P. T., Blalock, T. D., Schultz, G. S., Grotendorst, G. R., and Daniels, J. T. (2004) Involvement of CTGF in TGF-B1–Stimulation of Myofibroblast Differentiation and Collagen Matrix Contraction in the Presence of Mechanical Stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1109–1116
74. Nguyen, A. V, Wu, Y. Y., and Lin, E. Y. (2014) STAT3 and sphingosine-1-phosphate in inflammation-associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10279–10287
75. Kurdi, M., and Booz, G. W. (2010) Deciphering STAT3 Signaling In the Heart: Plasticity and Vascular Inflammation. *Congest. Hear. Fail.* **16**, 234–238
76. Liu, Y., and Feng, Q. (2012) NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation* **84**, 54–61
77. Stewart, M. H., Bendall, S. C., and Bhatia, M. (2008) Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency. *J. Mol. Med. (Berl)*. **86**, 875–886
78. Franco, D., and Campione, M. (2003) The Role of Pitx2 during Cardiac Development Linking Left–Right Signaling and Congenital Heart Diseases. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 157–163

Acknowledgments – We thank Msc. Bruno César Feltes for critically reading the manuscript, Dr. Giovanni Scardoni for aiding in the interference analysis and Msc. Kendi Nishino Miyamoto for helping with the transcriptomic microarray analysis.

FOOTNOTES

*This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant no. 301149/2012-7), the Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT de Processos Redox em Biomedicina- REDOXOMA; grant no. 573530/2008-4), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul FAPERGS (PRONEM grant no. 11/2072-2) and the Programa Binacional de Terapia Celular – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROBITEC-CAPES; grant no. 004/12).

¹ To whom correspondence may be addressed: Diego Bonatto, Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 219, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, BRAZIL, 91509-900. Phone: (+55 51) 3308-6080; Fax: (+55 51) 3308-7309; E-mail: diego@cbiot.ufrgs.br.

² The following abbreviations are used: Cer, ceramide; CM, cardiomyocyte; CP, cardiac precursors; DAG, diacylglycerol; DEGs, differentially expressed genes; DhCer, dihydroceramide; DhSph, sphinganine; DhS1P, dihydrosphingosine-1-phosphate; ECM, extracellular matrix; GEO, Gene Expression Omnibus; GO, gene ontology; HB, hub-bottleneck; LPA, lysophosphatidic acid, P-CoA, palmitoyl-CoA; PA, phosphatidic acid, PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphorylethanolamine; SM, sphingomyelin; Sph, sphingosine; S1P sphingosine-1-phosphate; SMCI, small molecules and Ca²⁺; SPC, sphingosylphosphorylcholine.

TABLE LEGENDS

TABLE 1. Overexpressed node-DEGs shared between the CP and CM networks and associated with bioactive lipid metabolism.

TABLE 2. Most relevant virtual knockouts of the transcription factors and molecules associated with bioactive signaling.

TABLE 1

Gene	Description	Function
Agpat-1, -3, -6, -9	lysophosphatidic acid acyltransferase	Converts lysophosphatidic acid to phosphatidic acid
Asah-1, -2	N-acylsphingosine amidohydrolase	Hydrolyzes ceramide into sphingosine
Cerk	ceramide kinase	Promotes the phosphorylation of ceramide, generating ceramide-1-phosphate
Lass4	(dihydro)ceramide synthase	Involved in the ceramide <i>de novo</i> synthesis pathway, which converts dihydrosphingosine to dihydroceramide
Lpar-1, -3	lysophosphatidic acid receptor	Membrane receptor of lysophosphatidic acid
Pld-1, -2	phospholipase D2	Catalyzes the conversion of phosphatidylcholine to phosphatidic acid
Ppap-2a, -2b	phosphatidic acid phosphatase type 2	Catalyzes the conversion of phosphatidic acid to diacylglycerol
S1pr-1, -3	sphingosine-1-phosphate receptor	Membrane receptor of sphingosine-1-phosphate
Sgpl1	sphingosine phosphate lyase	Promotes the cleavage of phosphorylated sphingoid bases
Sgpp1	sphingosine-1-phosphate phosphatase	Catalyzes sphingosine-1-phosphate degradation via salvage and promotes the recycling of sphingosine
Smpd-1, -3	sphingomyelinase	Converts sphingomyelin to ceramide
Sphk1	sphingosine kinase	Promotes the phosphorylation of sphingosine, generating sphingosine-1-phosphate
Spns2	spinster homolog 2	Mediates sphingosine-1-phosphate cell export
Sptlc1	serine palmitoyltransferase	Converts L-serine and palmitoyl-CoA to 3-ketodihydrosphingosine. Promotes the first step of the <i>de novo</i> biosynthesis of ceramide

TABLE 2

Cluster	Virtual knockout	Target	Description	Interference value
Cluster I-CP	Foxc1	Fgf2	fibroblast growth factor 2	0.187
		Pitx2	paired-like homeodomain 2	0.113
	Hand2	TGF- β 1	transforming growth factor, beta 1	0.131
		Cd44	CD44 antigen	0.053
Cluster II-CP	Hand2	Cd44	CD44 antigen	0.053
		TGF- β 1	transforming growth factor, beta 1	0.131
		Fgf8	fibroblast growth factor 8	0.028
	Stat3	Nos3	nitric oxide synthase 3	0.031
	Smad3	Myod1	myogenic differentiation 1	0.061
		Pitx2	paired-like homeodomain 2	0.026
Cluster III-CP	Runx1	Egfr	epidermal growth factor receptor	0.108
	Smad3	Fn1	fibronectin 1	0.043
		Mmp9	matrix metalloproteinase 9	0.026
	Tbx2	Trpc1	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1	0.12
		Hand2	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2	0.102
		Src	Rous sarcoma oncogene	0.054
	S1PR1, S1PR3, Sphk1, LPAR1, LPAR3 and CerK	Nras	neuroblastoma ras oncogene	0.088
		Rhoa	ras homolog gene family, member A	0.077
		Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	0.061
	Cluster III-CM	Cebpb	Jun	Jun oncogene
Fos			FBJ osteosarcoma oncogene	0.026
Foxc2		Vegfa	vascular endothelial growth factor A	0.047
Klf6		Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0.049
Tbx5		Fgf10	fibroblast growth factor 10	0.072
S1PR1, S1PR3, Sphk1, LPAR1, LPAR3 and CerK		Vegfa	vascular endothelial growth factor A	0.051
		Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1	0.04
		Rhoa	Ras homolog gene family member A	0.027

4 DISCUSSÃO

As análises transcritômicas, em conjunto com as ferramentas de biologia de sistemas, permitiram identificar a relação entre lipídeos bioativos e a expressão de genes associados com a cardiogênese. Assim, esta discussão será focada nas informações e dados abordados no Capítulo 2, bem como nos resultados descritos no Capítulo 3, os quais foram obtidos pelo uso das ferramentas de biologia de sistemas descritas no Capítulo 1.

4.1 Metabolismo energético e estresse oxidativo

Conforme apresentado no Capítulo 3 desta dissertação, os genes superexpressos encontrados apenas em cardiomiócitos (rede CM) são representados por ontologias relacionadas com o transporte de íons, sistema de transporte de elétrons, processos de oxidação e redução, geração de metabólitos precursores e energia (Capítulo 3, Figura 3A). No entanto, em precursores cardíacos (rede CP) os processos relacionados à geração de metabólitos precursores e energia e cadeia de transporte de elétrons são representados por genes subexpressos, tais como citocromo c oxidase (*Cox5b* e *Cox6b2*), piruvato desidrogenase (*Pdhb*), succinato desidrogenase (*Sdhd*) e NADH desidrogenase (*Ndufaf1*, *Ndufb3*, *Ndufb5*, *Ndufb10*, *Ndufc2*, *Ndufs1*, *Ndufs7*, *Ndufv1* e *Ndufv2*) (Capítulo 3, Figura 3B). É conhecido que, durante a diferenciação da célula-tronco embrionária (CTE) para células cardíacas, é necessário que ocorra uma troca do metabolismo fermentativo para a fosforilação oxidativa mitocondrial. Porém, essa troca é progressiva e apenas no período neonatal se torna expressiva. Desta forma, no coração fetal, prevalece a produção de ATP derivado do lactato, conforme observado na análise ontológica no módulo II-CM (Capítulo 3, Figura 7), e, em menor taxa, a β -oxidação de

ácidos graxos (13%) (Lopaschuk and Jaswal, 2010). Em torno de 21 dias após o nascimento, a β -oxidação prevalece e representa 80% do metabolismo energético de cardiomiócitos, enquanto que a glicólise representa 7% da produção de ATP (Lopaschuk and Jaswal, 2010).

A partir da análise de GO também foi observado resposta celular a estresse oxidativo, caracterizada por genes superexpressos, dentre eles a superóxido dismutase *SOD3*, e as glutathiona peroxidases *GPX1*, *GPX3* e *GPX8* (Capítulo 3, Figura 3A e 5A). Durante o desenvolvimento, as Nox são uma das principais fontes de ERO, gerando superóxido, peroxinitrito e peróxido de hidrogênio (de Faria Poloni et al., 2014). Desta forma, a rede interatômica CP apresenta superexpressão dos genes que codificam para enzimas de destoxificação de superóxido e peróxido de hidrogênio (*SOD3*, *GPX3* e *GPX8*), enquanto que a rede CM apresenta superexpressão de *GPX1*, *GPX3* e *GPX8*, que atuam na destoxificação do peróxido de hidrogênio.

Conforme apresentado no Capítulo 2, ERO está diretamente relacionado aos esfingolipídeos, e sua atuação é também dependente dos níveis de ERO. Por outro lado, durante o desenvolvimento cardíaco, ERO podem ativar diferentes proteínas, como Src, Ras GTPase, Mapk e influenciar na morfogênese cardíaca (de Faria Poloni et al., 2014).

4.2 Estímulo e metabolismo de lipídeos bioativos durante a cardiogênese

De acordo com as análises ontológicas dos módulos I-CP, II-CP, III-CP e III-CM, foram observados processos relacionados a metabolismo de lipídeos e resposta a lipídeos (Capítulo 3, Figura 6 e 7). Adicionalmente, genes que codificam para proteínas essenciais ao metabolismo de lipídeos, conforme descrito na Tabela 1 do Capítulo 3, foram observados como *hub-bottleneck* (HB) superexpressos, dentre eles estão *Smpd1*,

Sphk1 e *Lpar1* na rede CM, enquanto que a rede CP apresenta *Smpd1* (SMase), *Sphk1*, *Lpar1* e *Lpar3* (Capítulo 3, Figura 4). Estas e outras proteínas encontram-se associadas à membrana de organelas e/ou à membrana plasmática (Capítulo 2, Figura 2), principalmente nos *rafts* lipídicos (Means and Brown, 2009; Siow and Wattenberg, 2012; Zhao et al., 2011).

Os *rafts* lipídicos podem formar caveolas, que são reguladas por Prtf (cavina) e Cav1 (caveolina 1). A caveola é uma estrutura que atua como sensor a estímulos externos, respondendo à mecanoestimulação que é necessária para a modulação da função de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos (Parker and Ingber, 2007; Parton and Simons, 2007). Nesse sentido, já foi observado que SMase presentes na caveola podem ser transitoriamente ativada por estímulos mecânicos, convertendo SM para Cer (Czarny and Schnitzer, 2004). No contexto do desenvolvimento do coração, a contração das células cardíacas poderia ser responsável por esta mecanoativação.

A citocina Tnf- α secretada por miofibroblastos também pode estimular a atividade de SMase, resultando na geração de Cer e PC (Porter and Turner, 2009). Adicionalmente, esses estímulos podem gerar aumentos transitórios nos níveis de Cer e também de ERO, o que poderia colaborar com a morfogênese cardíaca.

A clivagem de SM promove a redistribuição do colesterol para bicamada lipídica, alterando a concentração de colesterol nos *rafts*, modulando a atividade de proteínas que promovem a transdução de sinal associadas à membrana (Armstrong and Zidovetzki, 2008; Qin et al., 2012). A formação de PC pela clivagem de SM pode gerar um desbalanço na composição lipídica da membrana plasmática, e levar a conversão para PA pela atividade da PLD2, uma fosfolipase enriquecida na caveola (Czarny et al., 2000). Adicionalmente, PA pode induzir a translocação de *Sphk1* para regiões ricas em

PA nos compartimentos da membrana, e então estimulando a formação de S1P (Delon et al., 2004).

Embora PA seja rapidamente hidrolisado a DAG por Ppap2b (fosfatases de ácido fosfatídico), a mesma está associada à formação de fibras de estresse mediada pela ativação Rho e regulação da formação de F-actina (Cohen et al., 2004; Cross et al., 1996).

4.3 Resposta mediada por Ca^{+2}

O ion Ca^{+2} foi observado nas redes CP e CM como um HB, interagindo em ambas as redes com os lipídeos Cer, LPA, PA, Sph, S1P e SPC (Capítulo 3, Figura 4). Nas análises de ontologia gênica referente aos módulos I-CP, II-CP, I-CM e III-CM foram observados os bioprocessos relacionados com a homeostase de cálcio (Capítulo 3, Figuras 6 e 7).

A importância do Ca^{+2} durante o desenvolvimento cardíaco associado a movimentos morfogenéticos relativos à polarização celular e à expressão gênica já é amplamente conhecido (Porter et al., 2003; Slusarski and Pelegri, 2007).

Adicionalmente, proteínas que atuam na sinalização de Ca^{+2} podem estar associadas a lipídeos bioativos, como Calm1 (calmodulina 1) que induz a translocação de Sphk1 para a membrana plasmática (Sutherland et al., 2006). Uma vez na membrana plasmática, Sphk1 pode fosforilar Sph, aumentando os níveis de S1P (Sutherland et al., 2006). Além disso, S1P induz a homeostase e mobilização de Ca^{+2} em fibroblastos embrionários (Claas et al., 2010). Além disso, PA também pode mediar a liberação do Ca^{+2} sarcoplasmático e aumento do influxo de Ca^{+2} , regulando a contração de cardiomiócitos (Xu et al., 1996).

Durante a formação do coração, o Ca^{+2} pode modular a expressão gênica de *Gata4* e *Myl2* (cadeia leve de miosina 2V) durante o desenvolvimento embrionário (Porter et al., 2003). Adicionalmente, o gene de *Ppp3ca* (subunidade catalítica de calcineurina) está superexpresso tanto nas redes CP e CM. A calcineurina é uma fosfatase dependente de Ca^{+2} que atua desfosforilando *Nfatc* e permitindo sua translocação nuclear de forma dependente da composição e integridade dos *rafts* de membrana (Crabtree, 2001; Izsepi et al., 2013). Nas redes CP e CM, *Nfatc* também está superexpresso (Capítulo 3, Figura 2), e a sinalização desencadeada por calcineurina/*Nfatc* é essencial para a indução da transição endotélio-mesenquimal, alongação e remodelagem das valvas cardíacas (Lin et al., 2012).

4.4 Remodelagem e morfogênese durante o desenvolvimento cardíaco

4.4.1 Proteínas associadas à MEC

No desenvolvimento cardíaco, a interação entre as células cardíacas e a MEC é altamente regulada durante a migração devido a interrupção parcial da adesão focal (Imanaka-Yoshida et al., 2004; Machesky and Hall, 1997). Adicionalmente, a remodelagem de MEC é responsável por providenciar suporte mecânico e estrutural, além de influenciar na migração, diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose (Imanaka-Yoshida et al., 2004). Por esta razão, a remodelagem de MEC é regulada pela síntese, deposição e degradação dos seus componentes (Sottile and Chandler, 2005). Nas redes interatômicas CP e CM (Capítulo 3, Figura 4), *Fn1* apresenta-se superexpressa e interage diretamente com S1P, SPC e LPA. Nesse sentido, SPC pode estimular a expressão de *Fn1* em célula-tronco mesenquimais (CTMs) de forma

dependente da sinalização por Tgf- β (Moon et al., 2007). Adicionalmente, LPA e S1P estimulam a montagem da matriz de Fn1 na célula (Zhang et al., 1994, 1999). A polimerização de Fn1 promove a deposição e a estabilidade de algumas proteínas presentes na MEC, como colágeno e trombospondina 1, bem como a adesão da MEC com a célula (Sottile and Chandler, 2005; Sottile and Hocking, 2002). Foi observado que as células progenitoras de camundongos *Fn1*^{-/-} não se fusionam para a formação do tubo cardíaco, e os camundongos morrem durante o início do desenvolvimento devido à má formação da estrutura cardiovascular (Astrof et al., 2007). Adicionalmente, LPA pode induzir o espalhamento das células como resultado da aderência celular à Fn1 na MEC, através de sinalização desencadeada por receptores de LPA, Cdc42 (proteína de ligação à GTP) e Rac1 (proteína de ligação à GTP) (Ueda et al., 2001). Nas redes interatômicas CP e CM, tanto Fn1 quanto Cdc42 e Rac1 estão superexpressas e interagem com LPA (Capítulo 3, Figura 4).

Os lipídeos podem também influenciar na remodelagem e morfogênese durante o desenvolvimento pela interação de Cer com o HB superexpresso Serpina1 (inibidor do ativador de plasminogênio-1) (Capítulo 3, Figura 4A e B). Da mesma forma, SMase e Cer podem induzir a liberação de Serpina1 por estímulo de TNF- α em células vasculares endoteliais (Soeda et al., 1995, 1998). Serpina1 está envolvida com a remodelagem cardíaca e atua regulando eventos de migração e adesão celular (Czekay et al., 2011; Xu et al., 2010).

Cyr61 (proteína rica em cisteína 61) é uma proteína da MEC que promove a adesão e migração celular, e camundongos *Cyr61*^{-/-} apresentam defeitos na morfogênese valvuloseptal (Mo and Lau, 2006). Nas redes CP e CM, verificou-se que o gene *Cyr61* está superexpresso, sendo que a expressão deste gene pode ser estimulada por Edn1, S1P e LPA por meio da atividade de Rho (An et al., 2000; Han et al., 2003). S1P

também promove a translocação de Myocd de forma dependente de Rho, (Zhao et al., 2014).

4.4.2 Proteínas associadas à inflamação

Nos módulos I-CP, II-CP, III-CP, I-CM e III-CM (Capítulo 3, Figura 6 e 7) foi observado a superexpressão do gene codificante para *Ptgs2* (prostaglandina endoperóxido sintase). Em ambas as redes, *Ptgs2* interage diretamente com S1P, além de ser necessária para a correta morfogênese das células miocárdias na região da valva atrioventricular (Scherz et al., 2008). Muitos trabalhos já observaram a atividade de S1P na indução da expressão de *Ptgs2*, além de promover a secreção de prostaglandina E2 e IL-6 (Hsieh et al., 2006; Hsu et al., 2014; Pettus et al., 2003; Skaznik-Wikiel et al., 2006). Da mesma forma, IL-6 é um HB superexpresso na rede CP e CM que interage diretamente com S1P. Adicionalmente, IL-6 é secretado por miofibroblastos, onde a ausência de IL-6 em populações de células cardíacas atenuou a ativação de Stat3 e produção de Vegfa, além de levar ao acúmulo de colágeno intersticial e causar dilatação cardíaca e disfunção ventricular (Banerjee et al., 2009; Porter and Turner, 2009).

Outros interatores diretos de S1P, para ambas as redes CP e CM, é o receptor de Cxcr4 (quimiocina 4) e a Cxcl12 (quimicina ligante 12) (Capítulo 3, Figura 4). Cxcl12 pode direcionar a migração de células da crista neural, sendo o principal ligante do receptor de Cxcr7 (quimiocina 7), que se heterodimeriza com Cxcr4, potencializando a resposta de Cxcl12 (Sierro et al., 2007). Contudo, camundongos *Cxcr7*^{-/-} apresentam desenvolvimento anormal da valva cardíaca, defeitos no septo atrial e dilatação do ventrículo direito (Sierro et al., 2007). Adicionalmente, a deficiência de Cxcl12 ou Cxcr4 levou a falha na migração e aumento de apoptose nas células da crista neural,

ocasionando por consequência a má formações na região do conotronco, defeitos no septo ventricular e ventrículo direito de dupla saída (Sierro et al., 2007). Em células estromais e progenitores hematopoiéticos foi observado que S1P induziu a secreção celular de Cxcl12 (Golan et al., 2012).

4.4.3 Apoptose

Na rede interatômica de CP, Cer interage com os HB superexpressos Fas (receptor de morte da superfície celular), Bcl2l1(*Bcl2-like*) e Casp8 (caspase 8) (Capítulo 3, Figura 4A e B). Já na rede CM, interage com Bcl2 e Casp8 (Capítulo 3, Figura 4). Cer está associada com a via de indução de apoptose e é ativada por Fas, promovendo o aumento dos níveis de Ca^{+2} mitocondrial e ativação de Casp8 e Bid (Darios et al., 2003). Adicionalmente, foi observado nos módulos I-CP, III-CP e III-CM, o processo biológico da regulação da morte celular programada (Capítulo 3, Figuras 6 e 7).

A morte celular programada é um mecanismo essencial durante a embriogênese que tem por finalidade orquestrar a morfogênese do tecido em desenvolvimento, eliminando células em excesso ou indesejadas. (Sakamaki et al., 2002). Desta forma, foi mostrado que camundongos homozigotos mutantes para Casp8 morreram em E11.5 e apresentaram defeitos na formação neural e cardíaca (Sakamaki et al., 2002). Adicionalmente, Cer pode afetar a função de Bcl2 por induzir a desfosforilação da serina 70, cuja fosforilação é necessária para a atividade anti-apoptótica de Bcl2 (Ruvolo et al., 1999).

4.5 Relação entre lipídeos bioativos e fatores de crescimento

Dentre os principais fatores de crescimento presentes na rede que interagem com lipídeos, está IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1). Este fator de crescimento se encontra em ambas as redes como HB superexpresso e interage com Cer nas redes CP e CM (Capítulo 3, Figura 4A e B). Em cardiomiócitos, IGF1 está associada com a indução da expressão de proteínas contráteis, como a α -actina, a cadeia leve de miosina 2, a troponina e a cadeia pesada de β -miosina (Ren et al., 1999). Adicionalmente, IGF1 pode elevar a concentração intracelular de Ca^{+2} , regulando a contratilidade dos cardiomiócitos, além de estar envolvida no crescimento e remodelagem do miocárdio (Ren et al., 1999). Adicionalmente, S1P pode induzir a transativação de Egfr (receptor de fator de crescimento epidermal), Flk, IGF1 (receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1) e Pdgfr β r (receptor do tipo β para fator de crescimento derivado de plaquetas) que se encontram superexpressos na rede CP e CM (Capítulo 3, Figura 4A e B) (Tanimoto et al., 2002, 2004). Egfr interage na rede diretamente com LPA e Sph (Capítulo 3, Figura 4A e B) e pode ser localizado nos *rafts* lipídicos, sendo essencial durante o desenvolvimento cardíaco para a formação das valvas, além de modular a atividade de PLD2 e regular a sinalização de Bmp (Czarny et al., 2000; Iwamoto and Mekada, 2006). A expressão de Flk é regulada de maneira espaço-temporal na região atrioventricular, e apresenta importante papel na formação do CE e na transição endotélio-mesenquimal (Dor et al., 2001). Apesar de Flk não se apresentar na rede interagindo com lipídeos bioativos, Vegfa se conecta diretamente a S1P (Capítulo 3, Figura 4A e B). S1P também promove o aumento do mRNA de Vcam1, uma molécula de adesão essencial ao desenvolvimento cardíaco que, na rede interatômica de CP e CM, também interage diretamente com S1P (Capítulo 3, Figura 4A e B) (Kwee et al., 1995; Shimamura et al., 2004). Adicionalmente, Pdgfr pode levar

ao aumento de S1P pela ativação de Sphk1, além de ter importante papel no desenvolvimento normal e crescimento cardíaco (Levade et al., 2001; Price et al., 2003; Schattemann et al., 1996).

5 CONCLUSÕES GERAIS

As análises transcritômicas e de quimio-biologia de sistemas permitiram avaliar a interação dos lipídeos bioativos no desenvolvimento cardíaco, com o objetivo de elucidar o principal papel dessas moléculas nos diferentes bioprocessos que concernem à diferenciação cardíaca.

Lipídeos bioativos podem atuar como moléculas sensoras do ambiente externo, desencadeando diferentes cascatas de sinalização de acordo com o estímulo externo que pode ser constante, seja este por pressão ou constrição, ou então pode ser um estímulo periódico como, por exemplo, originado pela contração das células vizinhas. Adicionalmente, a presença do gradiente de morfógenos regulado pela composição da MEC também fornece condições para o estímulo dos lipídeos bioativos. Esses estímulos promovem alterações na composição da membrana pela clivagem de SM, um dos lipídeos mais abundantes na membrana celular, além de estimularem a produção de ERO em escala reduzida. Conseqüentemente, ocorre alteração na dinâmica da membrana, com aumento dos níveis de Cer e PC, além da distribuição do colesterol. No entanto, o aumento progressivo dos níveis de Cer ou a sua depleção, concomitante ao aumento de ERO, gera um desbalanço intracelular, afetando a viabilidade da célula e comprometendo o desenvolvimento cardíaco.

Assim, as análises realizadas nas redes interatômicas permitiram avaliar as principais relações dos lipídeos bioativos durante a diferenciação cardíaca. De acordo com nossos dados, os lipídeos bioativos interferem principalmente na comunicação celular, adesão e motilidade, além de induzir a expressão gênica e promover a remodelagem da MEC.

6 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- As redes interatômicas relacionadas ao desenvolvimento cardíaco permitiram observar a interação de lipídeos bioativos com módulos e bioprocessos específicos.
- A concentração de lipídeos bioativos pode ser modulada durante o desenvolvimento cardíaco a partir da morfogênese e produção de citocinas de forma regulada.
- A modulação dos lipídeos bioativos promove a alteração da dinâmica da membrana celular e, conseqüentemente, leva a alteração na atividade de proteínas específicas, como Egfr, Pdgfr, PKC, Src, Has, regulando as cascatas de sinalização desencadeada.
- Os lipídeos bioativos podem promover a remodelagem do citoesqueleto e adesão focal, regulando a migração das células.
- A concentração dos lipídeos bioativos é um ponto crucial na promoção das vias de sinalização, onde diferentes concentrações resultam em diferentes bioprocessos.
- Os dados indicam que lipídeos bioativos podem estimular a expressão de genes específicos associados principalmente à remodelagem da MEC e relacionados à contratilidade celular.
- A modulação de Ca^{+2} intracelular realizada por lipídeos bioativos é essencial à manutenção das células cardíacas e pode levar a expressão de genes específicos do tecido cardíaco.
- Em níveis adequados, ERO interagem com os lipídeos na regulação da sinalização celular.

7 REFERÊNCIAS

- ALLEN DL, WEBER JN, SYCURO LK, et al. Myocyte enhancer factor-2 and serum response factor binding elements regulate fast myosin heavy chain transcription in vivo. *J. Biol. Chem.* 280(17), 17126–17134, 2005.
- AN S, ZHENG Y, BLEU T. Sphingosine 1-Phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J. Biol. Chem.* 275(1), 288–296, 2000.
- AOKI J, INOUE A, OKUDAIRA S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim. Biophys. Acta.* 1781(9), 513–518, 2008.
- ARMSTRONG D, ZIDOVETZKI R. Amplification of diacylglycerol activation of protein kinase C by cholesterol. *Biophys. J.* 94(12), 4700–4710, 2008.
- ASTROF S, KIRBY A, LINDBLAD-TOH K, et al. Heart development in fibronectin-null mice is governed by a genetic modifier on chromosome four. *Mech. Dev.* 124, 551–558, 2007.
- BANERJEE I, FUSELER JW, INTWALA AR, et al. IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296(5), H1694–H1704, 2009.
- BARTKE N, HANNUN YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* 50(Suppl), S91–96, 2009.
- BENSON DA, KARSCH-MIZRACHI I, LIPMAN DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 35, D32–D37, 2011.
- BIEBERICH E. It's a lipid's world: Bioactive lipid metabolism and signaling in neural stem cell differentiation. *Neurochem. Res.* 37(6), 1208–1229, 2012.

- BOWERS SLKK, BANERJEE I, BAUDINO TA. The extracellular matrix: at the center of it all. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48(3), 474–482, 2010.
- BRADE T, PANE LS, MORETTI A, et al. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3(10), a013847, 2013.
- BUCKINGHAM M, MEILHAC S, ZAFFRAN S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* 6(11), 826–835, 2005.
- CHEN J-N, COWAN DB, MABLY JD. Cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. *Heart Fail. Clin.* 1(2), 157–170, 2005.
- CHUANG H-Y, HOFREE M, IDEKER T. A Decade of Systems Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26, 721–744, 2012.
- CLAAS RF, TER BRAAK M, HEGEN B, et al. Enhanced Ca²⁺ storage in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. *Cell. Signal.* 22(3), 476–483, 2010.
- CLARKE SD, THUILLIER P, BAILLIE RA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(4), 566–571, 1999.
- COHEN G, RUBINSTEIN S, GUR Y, et al. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Dev. Biol.* 267(1), 230–241, 2004.
- COMBS MD, YUTZEY KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ. Res.* 105(5), 408–421, 2009.
- CRABTREE GR. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* 276(4), 2313–2316, 2001.
- CROSS MJ, ROBERTS S, RIDLEY AJ, et al. Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Curr. Biol.* 6(5), 588–597, 1996.

- CYGANEK L, CHEN S, BORCHERT T, et al. Cardiac progenitor cells and their therapeutic application for cardiac repair. *J. Clin. Exp. Cardiol.* S11(008), 1–12, 2013.
- CZARNY M, FIUCCI G, LAVIE Y, et al. Phospholipase D2: functional interaction with caveolin in low-density membrane microdomains. *FEBS Lett.* 467(2-3), 326–332, 2000.
- CZARNY M, LIU J, OH P, SCHNITZER E, et al. Transient mechanoactivation of neutral sphingomyelinase in caveolae to generate ceramide. *J. Biol. Chem.* 278, 4424–4430, 2003.
- CZARNY M, SCHNITZER JE. Neutral sphingomyelinase inhibitor scyphostatin prevents and ceramide mimics mechanotransduction in vascular endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287(3), H1344–H1352, 2004.
- CZEKAY R-P, WILKINS-PORT CE, HIGGINS SP, et al. PAI-1: An integrator of cell signaling and migration. *Int. J. Cell Biol.* 2011, 562481, 2011.
- DARIOS F, LAMBENG N, TROADEC J-D, et al. Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *J. Neurochem.* 84(4), 643–654, 2003.
- DE FARIA POLONI J, CHAPOLA H, FELTES BC, et al. The importance of sphingolipids and reactive oxygen species in cardiovascular development. *Biol. Cell.* 106(5), 167–181, 2014.
- DELON C, MANIFAVA M, WOOD E, et al. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 279(43), 44763–44774, 2004.
- DOR Y, CAMENISCH TD, ITIN A, et al. A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Development.* 128(9), 1531–1538, 2001.

- EVANS SM, YELON D, CONLON FL, et al. Myocardial lineage development. *Circ. Res.* 107(12), 1428–1444, 2010.
- FUTERMAN AH, HANNUN YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 5(8), 777–782, 2004.
- FYRST H, SABA JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat. Chem. Biol.* 6(7), 489–497, 2010.
- GOLAN K, VAGIMA Y, LUDIN A, et al. S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. *Blood.* 119(11), 2478–2488, 2012.
- HAN J-S, MACARAK E, ROSENBLOOM J, et al. Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. Role of CREB and AP-1 transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 270(16), 3408–3421, 2003.
- HANNA AN, BERTHIAUME LG, KIKUCHI Y, et al. Tumor necrosis factor- α induces stress fiber formation through ceramide production: role of sphingosine kinase. *Mol. Biol. Cell.* 12(11), 3618–3630, 2001.
- HANNUN YA, OBEID LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(2), 139–150, 2008.
- HARVEY RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat. Rev. Genet.* 3(7), 544–56, 2002.
- HSIEH H-L, WU C-B, SUN C-C, et al. Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 207(3), 757–766, 2006.
- HSU C-K, LEE I-T, LIN C-C, et al. Sphingosine-1-phosphate mediates COX-2 expression and PGE₂/IL-6 secretion via c-Src-dependent AP-1 activation. *J. Cell. Physiol.* 1–31, 2014.

- HUTTENLOCHER A, HORWITZ AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(9), a005074, 2011.
- IMANAKA-YOSHIDA K, HIROE M, YOSHIDA T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol. Histopathol.* 19(2), 517–525, 2004.
- IWAMOTO R, MEKADA E. ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Struct. Funct.* 31(1), 1–14, 2006.
- IZSEPI E, HIMER L, SZILAGYI O, et al. Membrane microdomain organization, calcium signal, and NFAT activation as an important axis in polarized Th cell function. *Cytometry part A.* 83(2), 185–196, 2013.
- JACOT JG, MARTIN JC, HUNT DL. Mechanobiology of cardiomyocyte development. *J Biomech.* 43(1), 1–13, 2011.
- KWEE L, BALDWIN HS, SHEN HM, et al. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development.* 121(2), 489–503, 1995.
- LANDER ES, LINTON LM, BIRREN B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409(6822), 860–921, 2001.
- LAUGWITZ K-L, MORETTI A, CARON L, et al. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development.* 135(2), 193–205, 2008.
- LEVADE T, AUGÉ N, VELDMAN RJ, et al. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ. Res.* 89(11), 957–968, 2001.
- LIN C-J, LIN C-Y, CHEN C-H, et al. Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation and valve development. *Development.* 139(18), 3277–3299, 2012.
- LITTLE CD, RONGISH BJ. The extracellular matrix during heart development. *Experientia.* 51(9-10), 873–882, 1995.

- LOPASCHUK GD, JASWAL JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 56(2), 130–40, 2010.
- MACHESKY LM, HALL A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* 138(4), 913–926, 1997.
- MEANS CK, BROWN JH. Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovasc. Res.* 82(2), 193–200, 2009.
- MÉNARD C, GREY C, MÉRY A, et al. Cardiac specification of embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 93(4), 681–687, 2004.
- MO F-E, LAU LF. The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development. *Circ. Res.* 99(9), 961–969, 2006.
- MOON HJ, JEON ES, KIM YM, et al. Sphingosylphosphorylcholine stimulates expression of fibronectin through TGF-beta1-Smad-dependent mechanism in human mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(6), 1224–1234, 2007.
- NORDEN J, KISPERT A. Wnt/Ctnnb1 signaling and the mesenchymal precursor pools of the heart. *Trends Cardiovasc. Med.* 22(5), 118–122, 2012.
- O'MALLEY MA, DUPRÉ J. Fundamental issues in systems biology. *Bioessays.* 27(12), 1270–1276, 2005.
- OLSON EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science.* 313(5795), 1922–1927, 2006.
- PARKER KK, INGBER DE. Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362(1484), 1267–1279, 2007.

- PARLAKIAN A, TUIL D, HAMARD G, et al. Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 24(12), 5281–5289, 2004.
- PARTON RG, DEL POZO MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(2), 98–112, 2013.
- PARTON RG, SIMONS K. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(3), 185–194, 2007.
- PETTUS BJ, BIELAWSKI J, PORCELLI AM, et al. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *FASEB J.* 17(11), 1411–1421, 2003.
- PORTER GA, MAKUCK RF, RIVKEES SA. Intracellular calcium plays an essential role in cardiac development. *Dev. Dyn.* 227(2), 280–290, 2003.
- PORTER KE, TURNER NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol. Ther.* 123(2), 255–278, 2009.
- PRICE RL, HALEY ST, BULLARD TA, et al. Effects of platelet-derived growth factor-AA and -BB on embryonic cardiac development. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272(1), 424–433, 2003.
- QIN J, BERDYSHEV E, POIRER C, et al. Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of Hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt. *J. Biol. Chem.* 287(17), 13620–13632, 2012.
- RANA MS, CHRISTOFFELS VM, MOORMAN AFM. A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiol. (Oxf)*. 207(4), 588–615, 2013.
- RAY HJ, NISWANDER L. Mechanisms of tissue fusion during development. *Development.* 139(10), 1701–1711, 2012.

- REN J, SAMSON WK, SOWERS JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31(11), 2049–2061, 1999.
- RIDLEY AJ. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713–2722, 2001.
- ROZARIO T, DESIMONE DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis : A dynamic view. *Dev. Biol.* 341(1), 126–140, 2010.
- RUVOLO PP, DENG X, ITO T, et al. Ceramide iInduces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* 274(29), 20296–20300, 1999.
- SAKAMAKI K, INOUE T, ASANO M, et al. Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ.* 9(11), 1196–1206, 2002.
- SANTOS CXC, ANILKUMAR N, ZHANG M, et al. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 50(7), 777–793, 2011.
- SCHATTEMANN GC, LOUSHIN C, LI T, et al. PDGF-A is required for normal murine cardiovascular development. *Dev. Biol.* 176(1), 133–142, 1996.
- SCHERZ PJ, HUISKEN J, SAHAI-HERNANDEZ P, et al. High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function. *Development.* 135(6), 1179–1187, 2008.
- SCHROEDER JA, JACKSON LF, LEE DC, et al. Form and function of developing heart valves : coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. *J Mol Med.* 81, 392–403, 2003.
- SCHWALM S, PFEILSCHIFTER J, HUWILER A. Sphingosine-1-phosphate: a Janus-faced mediator of fibrotic diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831(1), 239–250, 2013.

- SHEEHY SP, GROSBERG A, PARKER KK. The contribution of cellular mechanotransduction to cardiomyocyte form and function. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 11(8), 1227–1239, 2012.
- SHIMAMURA K, TAKASHIRO Y, AKIYAMA N, et al. Expression of adhesion molecules by sphingosine 1-phosphate and histamine in endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 486(2), 141–150, 2004.
- SIERRO F, BIBEN C, MARTÍNEZ-MUÑOZ L, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(37), 14759–14764, 2007.
- SIOW D, WATTENBERG B. The compartmentalization and translocation of the sphingosine kinases: mechanisms and functions in cell signaling and sphingolipid metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 46(5), 365–375, 2012.
- SKAZNIK-WIKIEL ME, KANEKO-TARUI T, KASHIWAGI A, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor expression and signaling correlate with uterine prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression and angiogenesis during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 74(3), 569–576, 2006.
- SLUSARSKI DC, PELEGRI F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol.* 307(1), 1–13, 2007.
- SNIDER P, OLAOPA M, FIRULLI AB, et al. Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage. *Scientific World Journal.* 7, 1090–1113, 2007.
- SOEDA S, HONDA O, SHIMENO H, et al. Sphingomyelinase and cell-permeable ceramide analogs increase the release of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured endothelial cells. *Thromb. Res.* 80(6), 509–518, 1995.

- SOEDA S, TSUNODA T, KUROKAWA Y, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 from human umbilical vein endothelial cells: involvement of intracellular ceramide signaling event. *Biochim. Biophys. Acta.* 1448(1), 37–45, 1998.
- SOTTILE J, CHANDLER J. Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. *Mol. Biol. Cell.* 16(2), 757–768, 2005.
- SOTTILE J, HOCKING DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell.* 13(10), 3546–3559, 2002.
- SPIEGEL S, FOSTER D, KOLESNICK R. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8(2), 159–167, 1996.
- SPIEGEL S, MILSTIEN S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(5), 397–407, 2003.
- SRIVASTAVA D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell.* 126(6), 1037–1048, 2006.
- SUTHERLAND CM, MORETTI PAB, HEWITT NM, et al. The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 281(17), 11693–11701, 2006.
- TAKABE K, PAUGH SW, MILSTIEN S, et al. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 60(2), 181–195, 2008.
- TANIMOTO T, JIN Z-G, BERK BC. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J. Biol. Chem.* 277(45), 42997–43001, 2002.

- TANIMOTO T, LUNGU AO, BERK BC. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 94(8), 1050–1058, 2004.
- UEDA H, MORISHITA R, YAMAUCHI J, et al. Regulation of Rac and Cdc42 pathways by G(i) during lysophosphatidic acid-induced cell spreading. *J. Biol. Chem.* 276(9), 6846–6852, 2001.
- VAN VLIET P, WU SM, ZAFFRAN S, et al. Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovasc. Res.* 96(3), 352–362, 2012.
- WANG X, DEVAIAH SP, ZHANG W, et al. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* 45(3), 250–278, 2006.
- WILLIAMS M, BURDSAL C, PERIASAMY A, et al. The mouse primitive streak forms in situ by initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev Dyn.* 241(2), 270–283, 2013.
- XU YJ, PANAGIA V, SHAO Q, et al. Phosphatidic acid increases intracellular free Ca²⁺ and cardiac contractile force. *Am. Physiol. Soc.* 271(2), H651–H659, 1996.
- XU Z, CASTELLINO FJ, PLOPLIS VA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is cardioprotective in mice by maintaining microvascular integrity and cardiac architecture. *Blood.* 115(10), 2038–2047, 2010.
- ZHANG Q, CHECOVICH WJ, PETERS DM, et al. Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* 127(5), 1447–1459, 1994.
- ZHANG Q, PEYRUCHAUD O, FRENCH KJ, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates fibronectin matrix assembly through a Rho-dependent signal pathway. *Blood.* 93(9), 2984–2990, 1999.

ZHAO J, HE D, SU Y, et al. Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 301(4), L547–L556, 2011.

ZHAO X, DING EY, YU OM, et al. Induction of the matricellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 75, 152–161, 2014.

8 CURRICULUM VITAE

ENDEREÇO

Laboratório de Radiobiologia Molecular
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia
Universidade Federal Rio Grande do Sul (UFRGS)
Avenida Bento Gonçalves 9500 – Prédio 43421
Caixa Postal 15005
Porto Alegre – Rio Grande do Sul

BRASIL

Fone: (+55 51) 3308-6080

CV online:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4246302J9>

Email: joicefpoloni@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA E TITULAÇÃO

2008-2012 – Bacharel em Ciências Biológicas.

Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias do Sul, Brasil.

Título do trabalho de conclusão: Estudo dos mecanismos moleculares de interação de *Moniliophthora perniciosa* com os cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao*

Orientador: Dr. Daniel Luis Notari

Co-orientador: Dr. Diego Bonatto e Dra. Fabienne Micheli

2013 – Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Orientador: Dr. Diego Bonatto

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2012 - 2012 - I Curso de Inverno em Genética e Biologia Molecular. (Carga horária: 90h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2011 - 2011 - Controle da expressão gênica por micro RNA. (Carga horária: 2h). Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, SBMCTA, Ribeirao Preto, Brasil

2011 - 2011 - Células tronco de pluripotência induzida. (Carga horária: 15h).

Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2009 - 2009 - Estresse oxidativo e antioxidantes. (Carga horária: 40h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil

2009 - 2009 - Ornitologia no RS. (Carga horária: 8h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2009 - 2009 - Epigenética e Mutagênese. (Carga horária: 4h).
Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental,
SBMCTA, Ribeirao Preto, Brasil

2009 - 2009 - Reparo de DNA: mecanismos e forma de estudo. (Carga horária: 4h).
Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental,
SBMCTA, Ribeirao Preto, Brasil

2009 - 2009 - Bases Moleculares do relógio circadiano em plantas. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil

2008 - 2008 - Identificação Botânica. (Carga horária: 20h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2008 - 2008 - Bússola e GPS. (Carga horária: 20h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2008 - 2008 - Microbiologia: secreções. (Carga horária: 20h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2008 - 2008 - Uso da Biologia Molecular na Microbiologia Clínica. (Carga horária: 4h).
1º Simpósio Internacional de Microbiologia em Clínica, SBM, Brasil

2008 - 2008 - Paleontologia. (Carga horária: 20h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2008 - 2008 - Sistemas de tratamento de esgotos. (Carga horária: 32h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2008 - 2008 - Biomonitoramento da Poluição do Ar. (Carga horária: 10h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2008 - 2008 - Microbiologia: Processando Materiais Clínicos. (Carga horária: 4h).
1º Simpósio Internacional de Microbiologia em Clínica, SBM, Brasil

2008 - 2008 - Baleia Franca. (Carga horária: 4h).
Instituto Baleia Franca, IBF, Brasil

2007 - 2007 - Biologia da Conservação. (Carga horária: 20h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2003 - 2003 - Funções Inorgânicas. (Carga horária: 3h).

Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

IDIOMAS

Inglês

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem

PRÊMIOS E TÍTULOS

2014

Melhor apresentação oral no XVII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology
"The influence of oxygen in pluripotency maintenance of human embryonic stem cell through system biology tools"

2014

Terceiro lugar na "Most Recently Read Articles, Omics: a journal of integrative biology" Feltes et al., Omics: a journal of integrative biology, Mary Ann Liebert, Inc.

2012

Menção honrosa "Análise de biologia de sistemas na identificação de vias envolvidas nos mecanismos de defesa de *Theobroma cacao* quando infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*"

I Curso de Inverno em Genética e Biologia Molecular Humana

2011

Melhor Trabalho de Pesquisa "Análise dos mecanismos de defesa dos cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao* quando infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*"

17º Seminário de Iniciação Científica e 11º Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da UESC

2009

Melhor trabalho apresentado no IX Congresso da SBMCTA "Epigenetic Modulation of Embryonic Development and Senescence in *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Gallus gallus* as observed by the Systems Biology"

PRODUÇÃO

Artigos completos publicados em periódicos

1. Feltes, Bruno César, Poloni, Joice de Faria, Nunes, Itamar José Guimarães, Bonatto, Diego. Fetal Alcohol Syndrome, Chemo-Biology and OMICS: Ethanol Effects on Vitamin Metabolism During Neurodevelopment as Measured by Systems Biology Analysis. OMICS: Journal of Integrative Biology, v.18, p.344 - 363, 2014.

2. de Faria Poloni, Joice, Chapola, Henrique, Feltes, Bruno César, Bonatto, Diego. The importance of sphingolipids and reactive oxygen species in cardiovascular development. Biology of the Cell, v.106, p.167 - 181, 2014.

3. Feltes, Bruno César, Poloni, Joice de Faria, Notari, Daniel Luis, Bonatto, Diego. Toxicological Effects of the Different Substances in Tobacco Smoke on Human

Embryonic Development by a Systems Chemo-Biology Approach. Plos One, v.8, p.e61743, 2013.

4. Vargas, Jose, Feltes, B. C., Poloni, J. F., Lenz, G. Senescence; an endogenous anticancer mechanism. *Frontiers in Bioscience.* , v.17, p.2616 - 2643, 2012.

5. da Hora Junior, Braz Tavares, Poloni, Joice de Faria, Lopes, Maíza Alves, Dias, Cristiano Villela, Gramacho, Karina Peres, Schuster, Ivan, Sabau, Xavier, Cascardo, Júlio César De Mattos, Mauro, Sônia Marli Zingaretti Di, Gesteira, Abelmon da Silva, Bonatto, Diego, Micheli, Fabienne. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. *Molecular Biosystems (Print)*, v.8, p.1507, 2012.

6. Bonatto, Diego, Feltes, Bruno César, POLONI, J. F. Aging as a consequence of intracellular water volume and density. *Medical Hypotheses.* v.77, p.982-984, 2011.

7. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D. Melatonin as a central molecule connecting neural development and calcium signaling. *Functional & Integrative Genomics (Print)*. v.11, p.383 - 388, 2011.

8. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D. The developmental aging and origins of health and disease hypotheses explained by different protein networks. *Biogerontology (Dordrecht).* , v.12, p.293 - 308, 2011.

Artigos aceitos para publicação

1. Vargas, J., Puga, R., Poloni, J. F., Timmers, L., Porto, B., Souza, O. N., Bonatto, D., Pitrez, P. M., Stein, R. T. A network flow approach to predict protein targets and flavonoid backbones to treat respiratory syncytial virus infection. *Journal of Biomedicine*

Capítulos de livros aceitos para publicação

1. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Development and Aging: Two Opposite but Complementary Phenomena In: *Aging and Health - A Systems Biology Perspective*. 1 ed.: Interdisciplinary Topics in Gerontology,

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Poloni, J. F., Micheli, F., Bonatto, D.

Análise dos mecanismos de defesa dos cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao* quando infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*

17º Seminário de Iniciação Científica e 11º Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2011, Ilhéus. 17º Seminário de Iniciação Científica e 11º Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2011, Ilhéus.

2. Poloni, J. F., Micheli, F., Bonatto, D., Notari, D. L.

Estudo dos mecanismos moleculares de interação de *Moniliophthora perniciosa* com os cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao*

XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2011, Porto Alegre.

3. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

Exploring the molecular effects of waste metallurgy components from a systemic perspective by applying systems chemo-biology

X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), 2011, São Pedro.

4. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Inhibitory effect of nicotine in the retinoic acid signalization and bone development during embryogenesis.

X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Muragênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2011, São Pedro.

5. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Notari, D. L., Bonatto, D., Ely, M. R.

Resíduos metalúrgicos, indução de tumor e envelhecimento: um risco ocupacional apresentado pela quimio-biologia de sistemas

XIX Encontro de Jovens Pesquisadores, 2011, Caxias do Sul.

6. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A influência da melatonina no desenvolvimento neural e na sinalização de cálcio durante a embriogênese

XXII Salão de Iniciação Científica, 2010, Porto Alegre.

7. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A influência da melatonina no desenvolvimento neural e na sinalização de cálcio durante a embriogênese

XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2010, Caxias do Sul.

8. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Atuação da Proteína p53 em Resposta a Danos de DNA Induzidos por Espécies Reativas de Oxigênio no Desenvolvimento Embrionário

XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2010, Caxias do Sul.

9. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Efeito modulatório da nicotina na diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário

XXII Salão de Iniciação Científica, 2010, Porto Alegre.

10. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A Influência da Melatonina Materna no Ritmo Circadiano Fetal Durante o Desenvolvimento Embrionário de Diferentes Modelos de Vertebrados Por Meio de Análise de Biologia de Sistemas

XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre.

11. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A Influência do Ritmo Circadiano no desenvolvimento Embrionário de Diferentes Modelos de Vertebrados por Meio de Análise de Biologia de Sistemas In: XVII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2009, Caxias do Sul.

12. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A systems biology analysis of the major proteins associated to vasculogenesis and enzymatic antioxidant mechanisms during the embryonic development of *H. sapiens* and *M. Musculus*

IX Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto.

13. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Epigenetic Modulation of Embryonic Development and Senescence in *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Gallus gallus* as observed by the Systems Biology

IX Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto.

14. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Epigenetic modulation of embryonic development in *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Gallus gallus* as observed by the systems biology

55° Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

15. Feltes, b. C., poloni, j. F., bonatto, d.

Modulação Epigenética do Desenvolvimento Embrionário em *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Gallus gallus* como Observado pela Biologia de Sistemas

XVII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2009, Caxias do Sul.

16. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Modulação Epigenética do Desenvolvimento Embrionário em *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Gallus gallus* como Observado pela Biologia de Sistemas

XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre.

17. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

The influence of circadian rhythm in embryonic development in different types of vertebrates by the analysis of systems biology

55° Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A systems biology view about the role of nuclear melatonin receptors in neurogenesis. = International Society for Computational Biology Latin America Conference, 2010, Montevideo.

2. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Developmental aging in mammals: a systems biology analysis of epigenetic, development and senescence mechanisms.

International Society for Computational Biology Latin America Conference, 2010, Montevideo.

Apresentação de trabalho e palestra

1. Poloni, J. F., Bonatto, Diego, Micheli, F.

Análise de biologia de sistemas na identificação de vias envolvidas nos mecanismos de defesa e suscetibilidade de *Theobroma cacao* quando infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*.

2012. *Evento: I Curso de Inverno em Genética e Biologia Molecular Humana; Inst.promotora/financiadora: PPGBM UFRGS e Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

2. Poloni, J. F., Micheli, F., Bonatto, D.

Análise dos mecanismos de defesa dos cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao* quando infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*.

2011. *Evento: 17º Seminário de Iniciação científica e 11º Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Santa Cruz; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Santa Cruz*

3. Poloni, J. F., Micheli, F., Bonatto, D., Notari, D. L.

Estudo dos mecanismos moleculares de interação de *Moniliophthora perniciosa* com os cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao*.

2011. *Evento: XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

4. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

Exploring the molecular effects of waste metallurgy components from a systemic perspective by applying systems chemo-biology

2011 *Local: São Pedro; Evento: X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA); Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)*

5. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Inhibitory effect of nicotine in the retinoic acid signalization and bone development during embryogenesis.

2011. *Evento: X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)*

6. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Notari, D. L., Bonatto, D., Ely, M. R.

Resíduos metalúrgicos, indução de tumor e envelhecimento: um risco ocupacional apresentado pela quimio-biologia de sistemas.

2011. *Evento: XIX Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS; Inst.promotora/financiadora: Universidade de Caxias do Sul*

7. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A influência da melatonina no desenvolvimento neural e na sinalização de cálcio durante a embriogênese.

2010. *Evento: XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS; Inst.promotora/financiadora: Universidade de Caxias do Sul*

8. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A influência da melatonina no desenvolvimento neural e na sinalização de cálcio durante a embriogênese.

2010. *Evento: XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

9. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, Diego

A systems biology view about the role of nuclear melatonin receptors in neurogenesis.

2010. *Evento: ISCB Latin America 2010; Inst.promotora/financiadora: ISCB*

10. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Atuação da Proteína p53 em Resposta a Danos de DNA Induzidos por Espécies Reativas de Oxigênio no Desenvolvimento Embrionário.

2010. *Evento: XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS;*

Inst.promotora/financiadora: Universidade de Caxias do Sul

11. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, Diego

Developmental aging in mammals: a systems biology analysis of epigenetic, development and senescence mechanisms.

2010. *Evento: ISCB Latin America 2010; Inst.promotora/financiadora: ISCB*

12. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Efeito modulatório da nicotina na diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário.

2010. *Evento: XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS;*

Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

13. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A Influência da Melatonina Materna no Ritmo Circadiano Fetal Durante o Desenvolvimento Embrionário de Diferentes Modelos de Vertebrados Por Meio de Análise de Biologia de Sistemas.

2009. *Evento: XXI Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: UFRGS*

14. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A Influência do Ritmo Circadiano no desenvolvimento Embrionário de Diferentes Modelos de Vertebrados por Meio de Análise de Biologia de Sistemas.

2009. *Evento: XVII Encontro de Jovens Pesquisadores; Inst.promotora/financiadora: UCS*

15. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.

A systems biology analysis of the major proteins associated to vasculogenesis and enzymatic antioxidant mechanisms during the embryonic development of *H. sapiens* and *M. Musculus*.

2009. *Evento: IX Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental; Inst.promotora/financiadora: SBMCTA*

16. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Epigenetic Modulation of Embryonic Development and Senescence in *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Gallus gallus* as observed by the Systems Biology.

2009. *Evento: IX Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental; Inst.promotora/financiadora: SBMCTA*

17. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.

Epigenetic modulation of embryonic development in *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Gallus gallus* as observed by the systems biology

2009. *Evento: 55º Congresso Brasileiro de Genética; Inst.promotora/financiadora: SBG*

18. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.
Modulação Epigenética do Desenvolvimento Embrionário em *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Gallus gallus* como Observado pela Biologia de Sistemas.
2009. Evento: XVII Encontro de Jovens Pesquisadores; Inst.promotora/financiadora: UCS

19. Feltes, B. C., Poloni, J. F., Bonatto, D.
Modulação Epigenética do Desenvolvimento Embrionário em *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Gallus gallus* como Observado pela Biologia de Sistemas
2009. Evento: XXI Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: UFRGS

20. Poloni, J. F., Feltes, B. C., Bonatto, D.
The influence of circadian rhythm in the embryonic development of different vertebrates models by means of systems biology
2009. Evento: 55º Congresso Brasileiro de Genética; Inst.promotora/financiadora: SBG

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. I Simpósio em Pesquisas e Terapias com Células Tronco para regeneração tecidual, 2012.(Simpósio)

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) 17º Seminário de Iniciação Científica e 11º Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2011. (Encontro) Análise dos mecanismos de defesa dos cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao* quando infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*.

3. Apresentação Oral no(a) XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2011. (Encontro) Estudo dos mecanismos moleculares de interação de *Moniliophthora perniciosa* com os cultivares TSH 1188 e Catongo de *Theobroma cacao*.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), 2011. (Congresso) Exploring the molecular effects of waste metallurgy components from a systemic perspective by applying systems chemo-biology.

5. Apresentação Oral no(a) XIX Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2011. (Encontro) Resíduos metalúrgicos, indução de tumor e envelhecimento: um risco ocupacional apresentado pela quimio-biologia de sistemas.

6. Workshop sobre produtos naturais, 2011. (Seminário)

7. Semana Acadêmica de Biologia, 2011. (Seminário)

8. Apresentação Oral no(a) XXII Salão de Iniciação Científica, 2010. (Encontro) A influência da melatonina no desenvolvimento neural e na sinalização de cálcio durante a embriogênese.

9. Apresentação Oral no(a) XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2010. (Encontro) A influência da melatonina no desenvolvimento neural e na sinalização de cálcio durante a embriogênese.

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) International Society for Computational Biology Latin America Conference, 2010. (Congresso) A systems biology view about the role of nuclear melatonin receptors in neurogenesis.
11. I Reunião Sul Brasileira Sobre Agricultura Sustentável e III Encontro Caxiense para o Desenvolvimento da Agricultura Orgânica, 2010. (Simpósio)
12. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XXI Salão de Iniciação Científica, 2009. (Seminário) A Influência da Melatonina Materna no Ritmo Circadiano Fetal Durante o Desenvolvimento Embrionário de Diferentes Modelos de Vertebrados Por Meio de Análise de Biologia de Sistemas.
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XVII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2009. (Seminário) A Influência do Ritmo Circadiano no desenvolvimento Embrionário de Diferentes Modelos de Vertebrados por Meio de Análise de Biologia de Sistemas.
14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) IX Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009. (Congresso) A systems biology analysis of the major proteins associated to vasculogenesis and enzymatic antioxidant mechanisms during the embryonic development of H. sapiens and M. Musculus.
15. Apresentação de Poster / Paineis no(a) 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009. (Congresso) The influence of circadian rhythm in the embryonic development of different vertebrates models by means of systems biology.
16. Apresentação Oral no(a) Oficinas Ambientais nas Escolas, 2008. (Outra) Ministrante Mudanças Climáticas Globais e hortas escolares - 25horas.
17. SAB - O meio ambiente começa no meio da gente, 2008. (Seminário)
18. 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2008. (Simpósio)
19. IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e III Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, 2008. (Simpósio)
20. SAB - ATUAÇÃO pode fazer a diferença, 2007. (Seminário)
21. Workshop Acesso à Biodiversidade, 2007. (Seminário)

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

1. Poloni, J. F.

Aplicação da homeopatia na agricultura, saúde animal e no meio ambiente, 2010. (Outro, Organização de evento)

2. Poloni, J. F.

I Reunião Sul Brasileira Sobre Agricultura Sustentável e III Encontro Caxiense para o Desenvolvimento da Agricultura Orgânica, 2010. (Congresso, Organização de evento)

3. Onzi, A., Poloni, J. F.
Microbiologia do Solo, 2010. (Outro, Organização de evento)
4. Poloni, J. F.
Semana Acadêmica de Biologia 2010 - A Evolução da Consciência a Favor do Meio Ambiente, 2010. (Outro, Organização de evento)
5. Poloni, J. F.
Curso prático e teórico de Introdução à Primatologia, 2009. (Outro, Organização de evento)
6. Poloni, J. F.
Semana Acadêmica de Biologia 2009 - Uma Mente que se Abre a uma Nova Idéia Nunca Volta ao Seu tamanho Original, 2009. (Outro, Organização de evento)
7. Poloni, J. F.
IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e III Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, 2008. (Congresso, Organização de evento)

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES EM ANDAMENTO

Henrique Chapola. The influence of oxygen in pluripotency maintenance of human embryonic stem cell through system biology tools. 2013. Co-orientação, Iniciação científica (Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.