



“Avaliação morfológica e molecular da perda de função de Emerina em mioblastos *in vitro*”

Lizandra Maia de Sousa¹, Ana Helena Macedo Pereira², Sílvio Roberto Consonni¹

- 1- Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica (LCI), Instituto de Biologia (IB) – UNICAMP
- 2- Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) – Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM)

O músculo estriado é constituído por miócitos, os quais possuem sarcômeros associados por disco Z, que além de representar uma junção mecânica entre dois sarcômeros, é um importante local na transmissão de forças geradas. Além do disco Z, o complexo de ligação do nucleoesqueleto e citoesqueleto (LINC) é responsável por conectar e transmitir forças mecânicas do citoesqueleto ao núcleo através do envoltório nuclear. Os principais componentes do complexo LINC na membrana externa do EN são as proteínas nesprinas que se ligam ao citoesqueleto e que interagem com a porção C-terminal das proteínas domínio-SUN na membrana interna do EN. Este conjunto interage com as lamínas A/C e Emerina. A Emerina estabiliza e proporciona a formação da rede cortical de actina nuclear regular a atividade e localização de fatores de transcrição e modular a estrutura nuclear e condensação da cromatina. Mutações no gene que codifica a Emerina, o *Emd* leva a uma distrofia muscular: Emery-Dreifuss. Desta forma, o objetivo deste projeto é avaliação morfológica e molecular da perda de função de Emerina durante o processo de diferenciação de mioblastos *in vitro*. Assim, foram utilizados mioblastos de músculo estriado esquelético, C2C12 derivadas de camundongos C3H, com o estabelecimento da linhagem shEmerina por transdução viral. Estas linhagens foram construídas, em projeto anterior, a partir de plasmídeos da família pLKO_TRC_puro: pLKO_TRC_puro_shEmerina (1 e 2) e pLKO_TRC_puro_shGFP (controle). As células foram mantidas em meio de manutenção, DMEM FBS [10% de soro fetal bovino + 1% penicilina-estreptomicina (PS)] e ao atingirem 70% de confluência, foram plaqueadas para indução a diferenciação. A indução foi realizada quando as células atingiram 100% de confluência em duas condições: 1) com o meio de manutenção DMEM FBS ou 2) com meio de diferenciação DMEM HS (2% soro de cavalo + 1% PS), trocados diariamente. Assim, foram estabelecidos os grupos: dia 1 (D1) e dia 5 (D5) com FBS ou HS, para ensaios de microscopia confocal, microscopia eletrônica de transmissão de células em monocamada para avaliação morfológica da sarcomerogênese e PCR em tempo real para analisar a expressão gênica de proteínas estruturais, com o intuito de avaliar o início de sarcomerogênese no processo de diferenciação, além da análise da expressão de genes classicamente envolvidos com o ciclo celular. Os resultados de microscopia confocal mostraram diferenças quanto à organização de citoesqueleto e forma nuclear. O grupo controle em diferenciação no D5 tratado com HS apresentou citoesqueleto organizado e núcleos predominantemente elípticos, o mesmo não foi observado nos grupos shEMD1 e shEMD2, independente dos dias e do tipo de tratamento. Os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão relevaram aparente ausência de alteração nos complexos de poro, nas membranas externas e internas do envoltório nuclear, enquanto que o citoesqueleto das células tratadas com HS, particularmente as células shGFP em D5 apresentam organização evidente e deposição regular de material elétron-denso como provável início de formação de sarcômeros. Os genes de proteínas estruturais (*alfa actinina* e *actina 1*) nos grupos shEMD1 e shEMD2 tiveram expressão gênica significativamente menor à observada no grupo shGFP. Quanto aos genes relacionados ao ciclo celular, os grupos shEMD1 e shEMD2, mostram que há uma redução menor, tanto de *Ciclina E1* e de *CDK-2*, quando em comparação ao grupo shGFP HS e FBS. Portanto, nosso estudo forneceu dados significativa respeito de alterações na morfologia e expressão gênica no silenciamento de Emerina em mioblastos no processo de diferenciação *in vitro*.