UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio: desvendando novos mecanismos moleculares

Paulo Roberto Jannig

São Paulo
2017

PAULO ROBERTO JANNIG

Adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio: desvendando novos mecanismos moleculares

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração:
Biodinâmica do Movimento Humano

Orientador:
Profa. Dra. Patricia Chakur Brum
Coorientador:
Prof. Dr. Jorge Lira Ruas

São Paulo
2017

Catalogação da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Jannig, Paulo Roberto
Adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio: desvendando novos mecanismos moleculares / Paulo Roberto Jannig. -- São Paulo : [s.n.], 2017.
127p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Lira Ruas

1. Músculo esquelético 2. Metabolismo 3. Exercício físico 4. Saúde I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: JANNIG, Paulo Roberto

Título: Adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio: desvendando novos mecanismos moleculares

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Aos meus pais Tarciso e Ana, por me ensinarem que com dedicação e ética podemos fazer coisas incríveis

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Brum, por ser um exemplo de professora-pesquisadora-orientadora-mentora-mãe-pessoa. Nunca esquecerei que já na nossa primeira conversa, durante o CELAFISCS de 2008, pude perceber o seu comprometimento em dar oportunidade para todos. Cheguei para trabalhar com você já graduado, mas sem saber direito o que era uma proteína. Sem medir esforços, você me ensinou e proporcionou toda a oportunidade possível para meu desenvolvimento. Tenho ainda um longo caminho, mas já aprendi com você qual tipo de professor eu quero ser. Agradeço imensamente a confiança depositada.

Ao professor Jorge Ruas, com quem tive a sorte de trabalhar durante o doutorado e que me proporcionou enorme amadurecimento científico e profissional. Obrigado pelos conselhos e por me motivar a continuar trabalhando com todo o rigor possível.

À minha amada noiva Ivy, por todo amor, companheirismo, apoio e compreensão durante todo o desenvolvimento dessa tese. Obrigado percorrer esse caminho sempre ao meu lado, me lembrando de todas as conquistas, do meu potencial, e de que juntos podemos realizar todos nossos sonhos.

Aos meus pais Tarciso e Ana, por serem a base da minha vida e por nunca terem medido esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. À minha irmã Juliana, cunhado David e sobrinho Otávio, por representarem sempre um porto seguro. Amo vocês!

Aos amigos e colegas com quem convivi no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da EEFE-USP. Como costumo brincar, o lab é um ambiente onde aprendemos por osmose, e com cada um de vocês aprendi muito e sou muito grato por isso. A molaridade de pessoas competentes e interessantes no nosso laboratório é, e sempre, foi muito alta. Da mesma maneira, agradeço todos os alunos da Professora Edilamar e Professor Paulo Ramires.

Aos técnicos Ney, Marcele, Glória, Luciano, Sarah e Úrsula, por darem todo o suporte ao laboratório. Também ao técnico e amigo Alex, com quem muito aprendi durante o mestrado.

To all friends from Ruas' Lab: Leo, Duarte, Shamim, Vicente, Paula, Jorge Correia, Igor, Amanda, Manizheh, Miguel and Margareta. Thanks to you, I had a life-changing experience in Stockholm. I'm also thankful to all other friends and collegues from KI.

Aos amigos de República, Bechara, Van, Bozi, Ju, Ancely e, claro, aos sempre presentes Gabriel e Ney, pelo suporte de todos os dias. Conviver com vocês me fez crescer em todos os

sentidos, seja pelas longas conversas sobre a vida, o universo e tudo mais, ou pela barriga proporcionada pelos inúmeros fardinhos e pizzas compartilhadas.

Aos amigos-irmãos de Joinville por estarem sempre por "perto" dando suporte e mostrando que a localização geográfica pouco importa quando queremos bem de alguém.

Ao professor Eriberto Fleischmann, por ter proporcionado minha primeira oportunidade de trabalhar com pesquisa ainda na época de graduação. Com você que fiz minha primeira visita à EEFE, e desde então eu soube onde queria chegar.

À Carla Werlang Coelho, professora, orientadora, colaboradora e hoje amiga, por ter acompanhado toda minha trajetória desde a graduação, sempre torcendo e dando suporte para meu sucesso. Estendo também meu agradecimento ao Luiz Coelho, por todas as conversas e conselhos.

À Aline Bacurau, primeira pessoa a me acolher no laboratório, que com toda paciência me ensinou os primeiros experimentos e me ajudou a entrar nesse mundo de biomol que hoje sou apaixonado. Obrigado por ter acreditado em mim desde minha chegada à São Paulo.

Aos professores Raphael Ritti-Dias e Andreia Queiroz, os quais não poderia deixar de lembrar. Vocês foram os primeiros de SP a reconhecer meu trabalho, lá nos CELAFISCS que participei durante a graduação. As palavras e conselhos de vocês ajudaram a encontrar meu caminho para USP, que à época, parecia inalcançável.

Ao professor Carlos Ugrinowitsch, por todas as conversas e reflexões proporcionadas, as quais me ajudaram a ter certeza do caminho que quero trilhar.

Aos colaboradores Davi Fonseca e Animesh Sharma, do *Proteomics and Metabolomics Core Facility (PROMEC)*, da *Norwegian University of Science and Technology* (NTNU, Noruega).

Ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP), em nome dos técnicos Jô, Mário e Fernando.

Aos secretários da CPG-EEFE, Márcio e Cláudia por estarem sempre disponíveis para sanar qualquer dúvida e auxiliar na resolução de problemas. Se temos um programa de excelência, devemos em grande parte ao trabalho de vocês.

Aos funcionários da EEFE-USP com quem convivi quase que diariamente nos últimos anos e que tanto trabalham para tornar a Escola um ambiente próspero e amigável.

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processos 2013/21065-3 e 2014/26797-5).

"The reasonable man adapts himself to the world; the unreasonable one persists in trying to adapt the world to himself. Therefore all progress depends on the unreasonable man"

George Bernard Shaw

RESUMO

JANNIG, P. R. **Adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio: desvendando novos mecanismos moleculares**. 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

O aumento da capacidade oxidativa é considerado o fator central dos seus benefícios à saúde induzidos pelo exercício físico aeróbio (EFA). A musculatura esquelética é um dos tecidos mais envolvidos na realização de exercícios físicos, com capacidade notável de adaptação metabólica e estrutural frente ao estímulo mecânico. Os músculos esqueléticos são ricos em mitocôndrias e altamente dependentes da fosforilação oxidativa para a produção energia. Assim, o aumento da capacidade aeróbia induzido pelo EFA ocorre grande parte em função de adaptações mitocondriais. Inúmeros estudos demonstram a capacidade do EFA em induzir biogênese mitocondrial, onde o coativador de transcrição PGC-1α1 atua coordenando a expressão de genes nucleares e mitocondriais no contexto do EFA. No entanto, animais com deleção de PGC-1α1 no músculo esquelético ainda apresentam remodelamento mitocondrial importante após período de treinamento físico aeróbio, evidenciando a existência de mecanismos ainda desconhecidos. Embora a formação de novas mitocôndrias seja fundamental, a manutenção de mitocôndrias saudáveis por meio de mecanismos de controle de qualidade parece ser de igual ou maior importância para uma adaptação mitocondrial adequada. Um desses mecanismos de controle de qualidade mitocondrial envolve a remoção de mitocôndrias danificadas/envelhecidas via autofagia mitocondrial (mitofagia). Contudo, os mecanismos envolvidos na mitofagia induzida pelo EFA são pouco conhecidos. Considerando o papel da adaptação mitocondrial sobre os efeitos benéficos do EFA, realizamos um estudo exploratório para buscar novos mecanismos envolvidos neste processo. Para isso, utilizamos uma abordagem proteômica direcionada à fração mitocondrial muscular de camundongos submetidos a uma única sessão de EFA. Num primeiro estudo, utilizamos os resultados de proteômica para procurar por proteínas envolvidas na ativação da mitofagia durante o EFA. A partir desse estudo, verificamos que uma sessão de EFA de fato induz sinais de mitofagia na musculatura esquelética. Além disso, propomos que as proteínas Phb2 e Mief2 podem acumular em mitocôndrias danificadas durante o EFA e colaborar para o recrutamento da maquinaria autofágica para a organela, auxiliando no controle de qualidade e adaptação mitocondrial induzidos pelo EFA. Em segundo estudo, tivemos como objetivo identificar nos resultados de proteômica possíveis reguladores de transcrição gênica envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA. Dessa maneira, identificamos que a proteína mitocondrial Spryd4, cuja função não havia sido estudada até então, parece aumentar na fração mitocondrial muscular durante o EFA. Observamos ainda que a expressão gênica muscular de Spryd4 diminui em camundongos idosos ou com distrofia muscular, aumenta em animais saudáveis após treinamento físico aeróbio e também parece aumentar em humanos treinados. *In vitro*, observamos que a atenuação da expressão de Spryd4 em miotubos primários promove disfunção mitocondrial, associada à diminuição da expressão de genes de complexos mitocondriais e envolvidos no transporte e metabolismo de lipídeos, além de promover atrofia de miotubos. Num contexto geral, a análise do proteoma mitocondrial muscular após uma sessão de EFA nos permitiu identificar proteínas que parecem estar envolvidas em adaptações mitocondriais, em especial, em mecanismos de mitofagia e controle do fluxo de substratos energéticos.

Palavras-chave: Músculo esquelético, mitofagia, autofagia, mitocôndria, metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

JANNIG, P. R. **Aerobic exercise-induced mitochondrial adaptation: unraveling novel molecular mechanisms**. 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

Increased oxidative capacity induced by regular aerobic exercise (AE) is considered a major factor in health. Skeletal muscle is one of the most compromised tissues during exercise and has remarkable metabolic and structural plasticity upon mechanical stimuli. Muscles are rich in mitochondria and heavily reliant on oxidative phosphorylation for energy production. Thus, increased aerobic capacity induced by regular AE occurs largely due to mitochondrial adaptations. Many studies have shown that AE is able to induce mitochondrial biogenesis, and the transcription coactivator PGC-1α1 is known to coordinated gene expression both in nuclei and mitochondria. However, muscle-specific PGC-1α1 knockout mice still display major mitochondrial remodeling after AE training, supporting the existence of unknown mechanisms of AE-induced mitochondrial adaptations. Although making new mitochondria is crucial, the maintenance of a healthy pool of this organelle through mechanisms of quality control seems to be of equal or greater importance during mitochondrial adaptation. One mechanism for mitochondrial quality control comprises the removal of damaged/aged mitochondria via autophagy (mitophagy). Nonetheless, the mechanisms of AE-induced mitophagy are poorly understood. Given the importance of mitochondrial adaptation to the health benefits of AE, we conducted an exploratory study to uncover new mechanisms underlying this process. For this, we performed a proteomic analysis in the skeletal muscle mitochondria-enriched fractions of mice submitted to a single bout of AE. In a first study, we have used these proteomics data to seek for proteins that might be involved in AE-induced mitophagy. On this matter, we confirmed that a single bout of AE in mice increases skeletal muscle mitophagy signaling. Additionally, we suggest that Phb2 and Mief2 accumulate in damaged mitochondria in skeletal muscle during AE and might assist in the recruitment of the autophagic machinery to the organelle, thus aiding to mitochondrial quality control and AE-induced mitochondrial adaptation. In a second study, we have used the same proteomics data to identify transcriptional regulators that might have a role in AE-induced mitochondrial adaptation. Thereby, we have found that the mitochondrial protein Spryd4, whose function was so far unknown, seems to increase in the skeletal muscle mitochondria-enriched fractions following AE. Here we show that skeletal muscle Spryd4 gene expression decreases in aged and dystrophic mice, increases in healthy trained animals and also seems to increase in trained humans. *In vitro*, we have seen that Spryd4 loss of function in primary myotubes promotes mitochondrial dysfunction, decreases expression of genes involved in mitochondrial complex function, as in fatty acid oxidation and transport. Indeed, Spryd4 loss of function promoted myotube atrophy. Taken together, by analyzing the skeletal muscle mitochondrial proteome after a single bout of AE in mice, we have identified proteins that might participate in AE-induced mitophagy and substrate metabolism, and thus in skeletal muscle adaptation to AE.

Keywords: Skeletal muscle, mitophagy, autophagy, mitochondria, oxidative metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos objetivos da tese. 28
Figura 2 – Abordagem para identificação do proteoma muscular de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbio (EFA). 30
Figura 3 – Respostas agudas e crônicas do exercício físico aeróbio (EFA) na expressão de genes relacionados à autofagia/mitofagia no músculo esquelético de camundongos. 33
Figura 4 – Resposta de proteínas relacionadas à autofagia e mitofagia no músculo quadríceps e na fração mitocondrial muscular de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbio (EFA). 35
Figura 5 – Busca por alvos envolvidos na mitofagia induzida pelo exercício físico aeróbio (EFA). 38
Figura 6 – Avaliação do fluxo autofágico em C2C12 expressando de forma estável mCherry-GFP-LC3. 43
Figura 7 – Participação das proteínas Mief2 e Phb2 no fluxo autofágico induzido por cafeína em células C2C12. 45
Figura 8 – Modelo proposto para possível função de Phb2 e Mief2 na mitofagia muscular induzida pelo exercício físico aeróbio. 49
Figura 9 – Spryd4 está enriquecida na fração mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio (EFA). 52
Figura 10 – Spryd4 apresenta associação positiva com diversos genes relacionados à mitocôndria. 55
Figura 11 – Expressão gênica muscular de *Spryd4* em diferentes condições experimentais. .58
Figura 12 – Expressão de complexos mitocondriais após silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários. 60
Figura 11 – Silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários promove reprogramação gênica e alterações em sinalização celular. 62
Figura 12 – Spryd4 está envolvida na manutenção da função mitocondrial. 63
Figura 13 – Silenciamento de *Spryd4* promove atrofia e sinais de diminuição de diferenciação em miotubos primários. 66
Figura 14 – Modelo proposto para papel da Spryd4 na melhora da função mitocondrial muscular induzida pelo exercício físico aeróbio. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Predição de motivos LIR das proteínas aumentadas na fração mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio. 37

Tabela 2 – Anotação funcional no DAVID para genes apresentando correlação positiva com a expressão gênica de *Spryd4* na musculatura esquelética de diferentes linhagens BXD. 53

Tabela 3 – Anotação funcional no DAVID para genes apresentando correlação negativa com a expressão gênica de *Spryd4* na musculatura esquelética de diferentes linhagens BXD. 53

Tabela 4 – Lista de Primers.....75

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMPK	5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*
ATP	Adenosina trifosfato
BAT	Tecido adiposo marrom interescapular
Cox4i1	Citocromo C oxidase subunidade 4 isoforma 1
Cpt1b	Carnitina-acil transferase
Cq	Cloroquina
Cs	Citrato sintase,
CytB	Citocromo B
ECAR	Taxa de acidificação extracelular
EDL	Extensor longo dos dedos
EFA	Exercício físico aeróbio (EFA)
ERR	Receptores relacionados ao estrogênio
ETC	Cadeia de transporte de elétrons (ETC)
eWAT	Tecido adiposo branco visceral epididimal
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
Hk2	Hexoquinase 2
iWAT	Tecido adiposo branco subcutâneo inguinal
LDH	Lactato desidrogenase
Ldha	Lactato desidrogenase A
LIR	Região de interação com LC3
MEF2	*Myocyte enhancer fator-2*
Mief2	*Mitochondrial elongation factor 2*
MKO-PGC-1α	Animais com deleção muscular de PGC-1α
mRNA	RNA mensageiro (mRNA)
Mrpl38	*39S ribosomal protein L38, mitochondrial*
Mrps27	*28S ribosomal protein S27, mitochondrial*
mtDNA	DNA mitocondrial
Myh7	Miosina de cadeia pesada do tipo I
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)
nDNA	DNA nuclear
Nrf1	Fatores respiratório nuclear 1

Nrf2	Fatores respiratório nuclear 2
OCR	Taxa de consumo de oxigênio
OxPhos	Fosforilação oxidativa (OxPhos)
PDH	Piruvato desidrogenase
PGC-1α	*Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) *γ coactivator-1α*
Phb	*Prohibitin*
Phb2	*Prohibitin 2*
Pink1	*PTEN-induced kinase 1*
PPAR	*Peroxisome proliferator-activated receptor*
PSM	Peptídeo sinal para mitocôndria
PSSM	*Position-specific scoring matrix*
siMief2	siRNA para *Mief2*
siPhb2	siRNA para *Phb2*
siRNA	Pequeno RNA de interferência
siScramble	siRNA controle
siSpryd4	siRNA para *Spryd4*
Spryd4	*SPRY domain-containing protein 4*
TA	Tibial anterior
TCA	Ciclo do ácido cítrico (TCA)
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
Tufm	*Elongation factor Tu, mitochondrial*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Exercício físico e doenças 16
1.2 Adaptações musculares induzidas pelo exercício físico aeróbio 18
1.3 Exercício físico aeróbio e remodelamento mitocondrial 21
2 OBJETIVOS 28
2.1 Objetivo geral 28
2.2 Objetivos específicos 28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
3.1 Proteoma mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio 29
3.2 Novos mecanismos envolvidos na mitofagia induzida pelo exercício físico aeróbio 31
3.2.1 O que descobrimos sobre a mitofagia induzida pelo exercício físico aeróbio? 47
3.3 Identificação de reguladores de transcrição gênica na adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio 49
3.3.1 O que descobrimos sobre a Spryd4? 67
4 CONCLUSÃO 70
5 MATERIAIS E MÉTODOS 71
5.1 Modelos animais 71
5.2 Teste incremental máximo em esteira rolante 71
5.3 Protocolo de exercício físico aeróbio 72
5.4 Isolamento de mitocôndrias 72
5.5 Expressão proteica 72
5.6 Proteômica mitocondrial 73
5.7 Expressão gênica 74
5.8 Cultura de células musculares 77
5.9 Silenciamento gênico por transfecção de siRNA 77
5.10 Expressão estável de mCherry-GFP-LC3 em células C2C12 78
5.11 Análise do fluxo autofágico em células C2C12 mCherry-GFP-LC3 78
5.12 Localização subcelular de Spryd4 em miotubos primários 79
5.13 Função mitocondrial de miotubos primários 79
5.14 Determinação do diâmetro de miotubos primários 80
5.15 Linhagens BXD 80
5.16 *GEO datasets* 80
5.17 Análise estatística 81
REFERÊNCIAS 82
ANEXOS 95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Exercício físico e doenças

A relação entre inatividade física e o desenvolvimento de doenças é conhecida desde a antiguidade. Na Grécia antiga, Hipócrates já proferia que se houvesse qualquer deficiência na alimentação ou na atividade física o corpo adoeceria. Por pelo menos 95% de sua história, a espécie humana viveu em pequenos grupos nômades de caçadores-coletores com dietas e gasto energético diário muito diversos dos atuais. De fato, mais de dois terços do consumo energético diário na sociedade moderna são provenientes de alimentos que, nas dietas pré-agrícolas, contribuíam pouco ou nada ao total de energia consumida (CORDAIN et al., 2000). Em perspectiva evolutiva, mudanças recentes em características nutricionais como carga glicêmica, composição de ácidos graxos, composição macro e micronutrientes, balanço ácido-base, razão sódio-potássio, e conteúdo de fibras desafiam o funcionamento adequado do genoma humano (CORDAIN et al., 2005). Somadas à diminuição considerável dos níveis de atividade física após a primeira revolução industrial, essas mudanças trouxeram aumento na incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas sem precedentes (CORDAIN et al., 1998; HALLAL et al., 2012).

É fato que o avanço das ciências médicas auxiliou no considerável aumento da expectativa de vida global. Contudo, dados de 2010 demonstram que a expectativa de vida corrigida pela incapacidade, ou expectativa de vida saudável, apresentou leve queda quando comparados com dados de 1990 (MURRAY et al., 2012). Ainda mais alarmante é notar que as importantes reduções na incidência de doenças infecciosas e na mortalidade infantil foram compensadas pelo notável aumento de doenças não-comunicáveis, com destaque para doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico e depressão (MURRAY et al., 2012). Assim, existe uma tendência global das pessoas conviverem um maior percentual de suas vidas com doenças crônicas, e, por conseguinte, com menor qualidade de vida.

A obesidade afeta diretamente a qualidade de vida e é um dos principais fatores de risco para doenças não-comunicáveis (GBD OBESITY et al., 2017). Sua prevalência dobrou em mais de 70 países desde a década de 80, e contabilizou ≈4 milhões de mortes no ano de 2015, sendo que 70% destas foram por doenças cardiovasculares (GBD OBESITY et al., 2017). Por outro lado, mesmo na presença de sobrepeso e obesidade, um pequeno aumento no nível de atividade física já exerce efeito positivo na redução do risco de mortalidade por todas as causas (EKELUND et al., 2015). Hoje considerada uma pandemia global, a inatividade física é o

quarto fator de risco mais prevalente, tendo sido responsável por mais de 5,3 milhões de mortes em 2008 (LEE et al., 2012). Considerado o quarto fator de risco mais prevalente para mortalidade no mundo, estima-se que a inatividade física promova aumento de 6% na incidência de doença arterial coronariana, 7% de diabetes tipo 2 e 10% de câncer de mama ou cólon (WHO, 2009; LEE et al., 2012). Em contrapartida, se a inatividade física não existisse, a expectativa de vida da população mundial poderia aumentar em 0,7 anos (LEE et al., 2012). De fato, as evidências científicas são suficientes para colocar a inatividade física como um problema de saúde pública prioritário que requer o desenvolvimento e a implantação de intervenções multidisciplinares e multisetoriais (REIS et al., 2016).

Entre os diversos benefícios da atividade física, o aumento da capacidade cardiorrespiratória é o fator determinante para a redução no risco de mortalidade, independente de idade, gênero e doenças e fatores de risco associados (MYERS et al., 2002; RUIZ et al., 2008; KODAMA et al., 2009). Associando essas observações clínicas com a base teórica da evolução dos organismos aeróbios, Koch e Britton (2001) propuseram a "hipótese aeróbia", sugerindo que a variação na capacidade de metabolizar oxigênio é o mecanismo central de divisão entre a saúde e o desenvolvimento de doenças complexas. Para testar tal hipótese, estes cientistas realizaram uma seleção artificial de ratos, segregando-os pela capacidade aeróbia herdada. Dessa maneira, geraram duas linhagens de animais distintas, uma com alta capacidade intrínseca de corrida (*High Capacity Runners*, HCR) e outra com baixa capacidade intrínseca de corrida (*Low Capacity Runners*, LCR). De fato, após algumas gerações de seleção artificial foi observado 30% de aumento no consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) dos animais HCR em relação aos animais LCR, que por sua vez passaram a apresentar diversos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como disfunção endotelial, disfunção cardíaca, pressão arterial elevada, dislipidemia, obesidade e resistência à insulina (WISLOFF et al., 2005). Além disso, os animais HCR se demonstraram mais resistentes aos efeitos do envelhecimento, apresentando maior longevidade quando comparados aos animais LCR (KOCH et al., 2011). Considerando esses achados, torna-se evidente que a aptidão aeróbia apresenta grande relação com o estado geral de saúde, desenvolvimento de doenças e envelhecimento.

Os efeitos benéficos da prática regular do exercício físico (treinamento físico) frente à prevenção e ao tratamento de doenças, e também ao aumento da performance atlética, acontecem em razão das adaptações agudas e crônicas que coordenam o funcionamento integrado de diversos sistemas orgânicos (FIUZA-LUCES et al., 2013; HAWLEY et al., 2014). Essas adaptações de ocorrem em múltiplos órgãos e sistemas, com destaque para o

remodelamento cardíaco fisiológico, aumento da função endotelial, aumento do número dos alvéolos e melhor troca de gases nos pulmões, melhora da função hepática, diminuição de marcadores de neurotoxicidade, entre muitos outros (HEINONEN et al., 2014; CERVENKA et al., 2017). De fato, o exercício físico é considerado uma espécie de polipílula com efeitos tão diversos sobre a saúde que dificilmente poderá ser mimetizado por um único fármaco (FIUZA-LUCES et al., 2013). Todas respostas agudas e adaptações induzidas pelo exercício físico, quando vistas por uma perspectiva "músculo-cêntrica", ocorrem em curto prazo para suprir a demanda energética aumentada pela contração muscular, e em longo prazo para reduzir o distúrbio homeostático causado pelo exercício físico. Como consequência, o organismo desenvolve resistência à quebra da homeostasia por perturbações metabólicas, reduzindo a fadiga precoce e a instalação de quadros patológicos (EGAN; ZIERATH, 2013; HAWLEY et al., 2014).

1.2 Adaptações musculares induzidas pelo exercício físico aeróbio

A musculatura esquelética é um dos tecidos mais envolvidos na realização de exercícios físicos, com capacidade notável de adaptação metabólica e estrutural frente ao estímulo mecânico, ou ausência dele (EGAN; ZIERATH, 2013; GOODPASTER; SPARKS, 2017). Enquanto as consequências fisiológicas dessas adaptações já são bem conhecidas, apenas recentemente pesquisadores começaram a desvendar o conjunto de moléculas regulatórias e vias de sinalização celular que as coordenam. Agudamente, a contração muscular promove alterações (reciclagem de adenosina trifosfato [ATP], fluxo de cálcio, balanço redox, produção de espécies reativas de oxigênio [ERO], estresse mecânico e pressão intracelular de oxigênio) que ativam ou inativam determinadas vias de sinalização celular, que por sua vez causam mudanças na atividade e localização subcelular de enzimas (BOSTROM et al., 1974; GREEN et al., 1992; LAWLER et al., 1993), na tradução de RNA mensageiro (mRNA) (SAKO et al., 2016), na síntese, degradação e secreção de proteínas (DOHM et al., 1987; STEENSBERG et al., 2002; WILKINSON et al., 2008; BOSTROM et al., 2012), e também na atividade de fatores, coativadores e repressores de transcrição gênica (BAAR et al., 2002; YU et al., 2003; WRIGHT et al., 2007; MCGEE et al., 2009). As alterações nessas vias são transientes e podem atingir picos entre 3 e 12 horas após a realização do exercício físico, e geralmente retornam aos níveis basais dentro de ~24 horas (PILEGAARD et al., 2000; BICKEL et al., 2005; YANG et al., 2005; PERRY et al., 2010). Nesse sentido, adaptações de longo prazo induzidas pelo treinamento físico provavelmente decorrem do acúmulo de efeitos subagudos de cada sessão

de exercício físico. A intensidade, duração e frequência do exercício físico são fatores determinantes para essas respostas moleculares e suas consequências funcionais. Além disso, muitas das adaptações induzidas pelo exercício físico dependem da modalidade praticada, onde exercícios físicos aeróbios (EFA) e de força representam extremos opostos de um contínuo de adaptação (EGAN; ZIERATH, 2013).

As vias de sinalização intracelular moduladas EFA induzem adaptações na estrutura e função da célula muscular, como na atividade e concentração de enzimas metabólicas, no conteúdo lipídico e de glicogênio, na composição de proteínas sarcoméricas, e no remodelamento mitocondrial, seja por biogênese, fissão, fusão ou mitofagia. Além disso, essas vias de sinalização podem promover alterações no microambiente muscular pela secreção de fatores que auxiliam no relaxamento endotelial e vasodilação, na formação de novos capilares (angiogênese), na comunicação com células residentes ou ainda com ação autócrina/parácrina (EGAN; ZIERATH, 2013; FIUZA-LUCES et al., 2013; HAWLEY et al., 2014).

O exercício físico impõe uma alta demanda energética não apenas pela necessidade de ATP para manutenção dos ciclos de ponte-cruzada entre actina e miosina (miosina ATPase), mas também para manter a excitabilidade do sarcolema (Na^+/K^+ ATPase) e recaptar Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático (Ca^{2+} ATPase). Dessa maneira, o *turnover* muscular de ATP durante o EFA pode aumentar em até 100x em relação ao repouso (GAITANOS et al., 1993). A concentração intramuscular de ATP em repouso é extremamente baixa, o que requer a rápida ativação de vias metabólicas para ressintetizar o ATP e manter o funcionamento da fibra muscular em exercício.

A intensidade e duração do exercício determinam a via metabólica preponderante para a ressíntese de ATP, entre elas o sistema creatina-fosfato, a glicólise (anaeróbia ou aeróbia), o ciclo do ácido cítrico (TCA, ou ciclo de Krebs) e a fosforilação oxidativa (OxPhos) pela cadeia de transporte de elétrons (ETC). O funcionamento dessas vias depende da mobilização de carboidratos e lipídeos, utilizados como substrato para gerar intermediários como Acetil-CoA, alimentando o TCA, e das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), as quais atuam como carreadoras de elétrons para geração de energia pela OxPhos. Na glicólise, a ressíntese de ATP ocorre por uma série de reações enzimáticas envolvendo a conversão de glicose-6-fosfato, proveniente da quebra de glicogênio intramuscular (catalisada pela enzima glicogênio fosforilase) e da fosforilação de glicose (catalisada pela enzima hexoquinase), em piruvato. Este último é convertido em Acetil-CoA e transportado para a mitocôndria pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH). Na ausência de oxigênio molecular, ocorre aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase

(LDH) e a consequente a redução de piruvato a lactato (glicólise anaeróbia). Quando o acúmulo de prótons (H^+) provenientes da hidrólise de ATP supera a capacidade da LDH em reduzir piruvato em lactato, ocorre acidose e fadiga muscular (ROBERGS et al., 2004). No metabolismo de lipídeos, ácidos graxos são captados da circulação pelo receptor CD36 e ativados no citosol formando Acil-CoA, que em seguida é transportado para as mitocôndrias pela ação da carnitina-acil transferase (Cpt1b) e conjugação com carnitina. No interior das mitocôndrias, por fim, ocorre a β-oxidação de Acil-CoA, produzindo os intermediários Acetil-CoA, NADH e $FADH_2$, os quais serão utilizados pelo TCA e pela ETC, respectivamente, para ressíntese de ATP.

A contribuição de substratos energéticos provenientes do metabolismo de carboidratos e lipídeos depende diretamente da intensidade do exercício físico. Esforços curtos e intensos utilizam predominantemente a oxidação de glicose como fonte energética, ao passo que em exercícios prolongados e de intensidade baixa e moderada aumenta a participação da oxidação de ácidos graxos na produção de energia (EGAN; ZIERATH, 2013; HAWLEY et al., 2014). Após período de treinamento físico, o percentual de ATP proveniente da oxidação de ácidos graxos aumenta para uma mesma intensidade absoluta (TALANIAN et al., 2010), demonstrando a capacidade adaptativa do metabolismo muscular frente à prática regular de EFA.

As células musculares, ou fibras musculares, são dividas em diferentes tipos, os quais divergem principalmente quanto à capacidade oxidativa e/ou glicolítica e velocidade de contração muscular. Fibras musculares do tipo I são caracterizadas pela coloração avermelhada, devido ao elevado conteúdo de mioglobina (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006; MURGIA et al., 2017), apresentam capacidade oxidativa aumentada associada a maior conteúdo mitocondrial e resistência à fadiga. Essas fibras apresentam ainda característica de contração muscular lenta, fato devido à maior expressão de Myh7, miosina de cadeia pesada com baixa atividade ATPase (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006; MURGIA et al., 2017). Por outro lado, as fibras musculares do tipo II possuem maior capacidade glicolítica e expressão das isoformas de miosina de cadeia pesada com alta atividade ATPase (Myh1 e Myh2), conferindo característica de contração muscular rápida com baixa resistência à fadiga (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006; MURGIA et al., 2017). Ainda, as fibras musculares do tipo II apresentam subtipos, os quais apresentam gradativo aumento na capacidade oxidativa no sentido IIB → IIX → IIA. Reforçando a plasticidade da musculatura esquelética, o EFA é capaz de induzir transição das fibras musculares tipo II para um perfil mais oxidativo, dessa forma, diminuindo a quantidade de fibras IIB e IIX com aumento de fibras IIA (FITZSIMONS et al., 1990; BASSEL-DUBY;

OLSON, 2006). De fato, após período de treinamento físico aeróbio, as fibras do tipo II podem apresentar capacidade oxidativa tão grande quanto fibras do tipo I de indivíduos sedentários (SALTIN et al., 1977). Contudo, a transição entre fibras tipo I e tipo II em seres humanos ainda é controversa (BOOTH et al., 2015).

Para suportar o elevado metabolismo oxidativo, as fibras musculares do tipo I, quando comparadas às fibras do tipo II, apresentam uma extensa rede de capilares sanguíneos, necessários para o transporte de oxigênio e nutrientes. Durante o EFA, ocorre ainda vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo muscular pela produção de óxido nítrico e prostaglandinas (MORTENSEN et al., 2007). Por sua vez, o treinamento físico aeróbio promove a formação de novos capilares no microambiente muscular, processo chamado de angiogênese (PRIOR et al., 2004). Uma combinação entre fatores de crescimento, hipóxia, estresse de cisalhamento e estresse mecânico parece mediar a angiogênese induzida pelo EFA (PRIOR et al., 2004).

1.3 Exercício físico aeróbio e remodelamento mitocondrial

Mitocôndrias são organelas intracelulares compostas por duas membranas lipídicas, uma interna e outra externa, as quais sustentam um gradiente de prótons entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial, necessário para o funcionamento da ETC e apropriada OxPhos. É na matriz mitocondrial onde ocorre, entre outros processos, o TCA e a β-oxidação, constituindo assim organelas especializadas na produção aeróbia de energia. As mitocôndrias derivam de alfaproteobacterias incorporadas por células eucarióticas primitivas em uma relação de endosimbiose que deu origem aos primeiros organismos aeróbios complexos (ANDREUX et al., 2013). Devido à sua origem bacteriana, as mitocôndrias possuem seu próprio genoma circular (DNA mitocondrial, mtDNA) e apesar de durante o processo evolutivo muitos dos genes mitocondriais terem sido transferidos para o núcleo (DNA nuclear, nDNA) da célula hospedeira, o mtDNA ainda é responsável pela codificação de 13 importantes proteínas mitocondriais (ANDREUX et al., 2013). Assim, qualquer adaptação mitocondrial requer a expressão de genes localizados no núcleo e nas mitocôndrias, o que torna ainda mais desafiante a compreensão de seus mecanismos.

Uma vez que os músculos esqueléticos são ricos em mitocôndrias e altamente dependentes da OxPhos para a produção energética, não surpreende o fato de que o aumento da capacidade aeróbia induzido pelo EFA ocorra, em grande parte, em função de adaptações mitocondriais (EGAN; ZIERATH, 2013). De fato, o trabalho clássico de John Holloszy (1967)

foi o primeiro a demonstrar que apenas seis semanas de treinamento físico aeróbio era capaz de dobrar o conteúdo mitocondrial muscular e sua capacidade oxidativa em ratos. Apesar desta descoberta ter ocorrido há 50 anos, somente no início da década passada ocorreram avanços significativos no sentido de elucidar os mecanismos moleculares que coordenam essa resposta.

A grande dificuldade até então era compreender como o exercício físico era capaz de orquestrar a transcrição e tradução de genes mitocondriais codificados tanto no genoma mitocondrial como no nuclear, e assim expressar proteínas envolvidas no aumento da densidade, volume e número de mitocôndrias, em um processo chamado de biogênese mitocondrial. Inicialmente, foram identificados fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes nucleares que codificam diversas proteínas da cadeia respiratória mitocondrial, como os fatores respiratórios nuclear 1 e 2 (Nrf1 e Nrf2) (EVANS; SCARPULLA, 1990; VIRBASIUS et al., 1993). Em seguida, foi descoberto um cofator de transcrição chamado de *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) *γ coactivator-1α* (PGC-1α), que se demonstrou um regulador chave da atividade de diversos fatores de transcrição nuclear como Nrf1 e Nrf2, e também do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), responsável pela transcrição e a replicação do mtDNA (PUIGSERVER et al., 1998; SCARPULLA, 2002). Logo após sua descoberta, diversos estudos demonstraram que uma única sessão de exercícios físicos é capaz de aumentar rapidamente a atividade e a expressão de PGC-1α (BAAR et al., 2002; PILEGAARD et al., 2003). Dessa maneira, se demonstrou que essa molécula possui um papel fundamental na ativação dos genes nucleares e mitocondriais necessários para a biogênese mitocondrial induzida por estímulos fisiológicos, como o EFA (ARANY, 2008). Além de seu papel na biogênese mitocondrial, a coativação mediada por PGC-1α dos receptores nucleares da família PPAR, receptores relacionados ao estrogênio (ERR) e dos fatores de transcrição da família *myocyte enhancer fator-2* (MEF2) também promove aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo e transporte de ácidos graxos, metabolismo de glicose, reprogramação do tipo de fibras musculares, angiogênese e defesa antioxidante (ARANY, 2008).

Mais recentemente, foi descoberto que o gene da PGC-1α (*Ppargc1a*) expressa quatro isoformas diferentes desta proteína no músculo esquelético pela ativação de diferentes promotores e por *splicing* alternativo (RUAS et al., 2012). A partir de então a isoforma clássica passou a ser denominada como isoforma 1 (PGC-1α1), ao passo que foi demonstrado que a isoforma 4 (PGC-1α4) induz um programa transcricional distinto da isoforma clássica e relacionado à hipertrofia muscular (RUAS et al., 2012; MARTINEZ-REDONDO et al., 2015).

No entanto, é interessante destacar que animais com deleção de PGC-1α no músculo esquelético (MKO-PGC-1α) ainda apresentam remodelamento mitocondrial importante após período de treinamento físico aeróbio (GENG et al., 2010; ROWE et al., 2012), o que corrobora para existência de outros fatores ainda desconhecidos que possam influenciar na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA.

Ainda que a biogênese mitocondrial seja apontada como um evento crítico para a sua adaptação, a função das mitocôndrias também depende do rápido e contínuo remodelamento da rede tubular que estas organelas formam nos músculos (YAN et al., 2012). Realmente, as mitocôndrias são organelas dinâmicas, capazes de se movimentar na célula e de realizar fusão e fissão de acordo com mudanças no contexto celular (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). A fusão mitocondrial é caracterizada pela união das membranas externas e internas de duas ou mais mitocôndrias, enquanto na fissão, uma mitocôndria dá origem a duas novas organelas. Os processos de fusão e fissão permitem a manutenção de uma rede interconectada de mitocôndrias íntegras e funcionais por meio do compartilhamento de proteínas, substratos e mtDNA e da segregação de regiões danificadas e disfuncionais (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012).

Embora incipientes, estudos demonstram que o exercício físico é capaz de regular tanto a fissão como a fusão mitocondrial no músculo esquelético (CARTONI et al., 2005; GARNIER et al., 2005; DING et al., 2010). De fato, Garnier et al. (2005) observaram uma correlação positiva da respiração mitocondrial máxima com os níveis de mRNA de Mitofusina 2 (Mfn2 envolvida na fusão mitocondrial) e Drp1 (envolvida na fissão mitocondrial), e ainda demonstraram que essa resposta é dependente da capacidade física do indivíduo, sugerindo que a dinâmica mitocondrial está associada ao aumento da capacidade oxidativa induzido pelo exercício físico. Ding et al. (2010) submeteram ratos a uma única sessão de EFA e avaliaram parâmetros de fusão, fissão e função mitocondrial na musculatura esquelética durante e após a sessão de exercício físico. Durante a realização do EFA, os pesquisadores observaram redução da expressão proteica de Mfn1 (envolvida na fusão mitocondrial) e aumento de Fis1 (relacionada à fissão mitocondrial), sendo que a magnitude dessa resposta dependeu da duração do EFA. Tais respostas foram acompanhadas de diminuição do controle respiratório e aumento da produção de ERO mitocondrial. É interessante observar que a produção de ERO diminuiu logo após o aumento da expressão proteica de Fis1, o que sugere um papel da fissão mitocondrial no controle da produção de ERO mitocondrial. A expressão proteica de Mfn1 se manteve reduzida, enquanto a de Fis1 aumentada mesmo após 24h de recuperação da sessão de EFA, apesar dos níveis de mRNA de Mfn1 e Mfn2 (também envolvida na fusão mitocondrial) estarem elevados nesse mesmo momento, sugerindo uma resposta compensatória. O aumento

compensatório da expressão gênica de mitofusinas após EFA também foi observado em humanos por Cartoni et al. (2005), que sugeriram um importante papel da fusão mitocondrial na adaptação metabólica ao exercício físico, podendo auxiliar na redução da resistência à insulina. Os mecanismos celulares pelos quais o exercício físico induz alterações na dinâmica mitocondrial ainda não estão esclarecidos.

A proteína AMPK (5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) é conhecida como sensor energético da célula por ser ativada pelo aumento da razão AMP:ATP em decorrência de redução da ingesta calórica ou aumento do dispêndio energético e apresenta importante atividade reguladora da dinâmica mitocondrial (LONG; ZIERATH, 2006; ROMANELLO et al., 2010). O EFA é reconhecido como um potente indutor de AMPK (MU et al., 2001; EGAN; ZIERATH, 2013), o que pode explicar como o exercício aumenta a dinâmica mitocondrial. Porém, essa relação direta nunca foi demonstrada.

O balanço redox, ou homeostase redox, depende do equilíbrio entre a produção e a remoção de ERO. As mitocôndrias são as maiores fontes de produção de ERO celular, devido ao escape de elétrons em complexos da cadeia respiratória durante o processo de OxPhos (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Quando produzidas em excesso, as ERO podem causar danos irreversíveis em diversos componentes celulares, reduzindo sua função, o que pode levar à apoptose celular caso estes componentes não sejam removidos (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Inclusive, o excesso intracelular de ERO pode danificar a própria estrutura mitocondrial, causando diminuição do potencial de membrana e acelerando ainda mais a produção de ERO mitocondrial, em um ciclo vicioso relacionado a diversos quadros patológicos (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; ANDREUX et al., 2013). Num paradoxo, durante o exercício físico a produção mitocondrial de ERO aumenta consideravelmente (POWERS; JACKSON, 2008). Contudo, o exercício físico é capaz de estimular defesas antioxidantes para tamponar esse excesso de ERO (POWERS; JACKSON, 2008). Além disso, as próprias ERO são consideradas hoje importantes sinalizadores celulares, atuando na modificação pós-traducional de proteínas específicas via oxidação, auxiliando assim na ativação de vias moleculares necessárias para a adaptação muscular (POWERS et al., 2010).

Assim, tem sido sugerido que o excesso de ERO produzido pelo exercício físico pode induzir fissão mitocondrial, necessária para segregar regiões danificadas da organela e manter uma população mitocondrial funcional (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). De fato, um estudo interessante em cultura de células (TWIG et al., 2008) observou que, mesmo em condições basais, a fissão mitocondrial dá origem a duas mitocôndrias distintas, uma com potencial de membrana, função respiratória e capacidade de fusão normais, e outra despolarizada,

disfuncional, incompetente para fusão e com uma grande quantidade de proteínas de membrana oxidadas. Os autores demonstraram ainda que esta última é destruída e tem seus componentes reciclados por um processo chamado de autofagia mitocondrial, ou mitofagia.

A macroautofagia, ou simplesmente autofagia, é um processo celular conservado evolutivamente que envolve o transporte de organelas e macromoléculas para degradação nos lisossomos, formando o chamado sistema proteolítico lisossomal-autofágico (CHOI et al., 2013). A autofagia pode ocorrer de duas formas: 1) não-seletiva, como a induzida por privação de nutrientes, degradando diversos componentes celulares para serem utilizados como substratos energéticos; e 2) seletiva, induzida por sinais moleculares específicos, com finalidade de remover proteínas agregadas/mal enoveladas e promover o *turnover* de organelas danificadas e/ou envelhecidas, como mitocôndrias, porções do retículo endoplasmático e complexo de Golgi (CHOI et al., 2013). Para isso, uma dupla membrana lipídica (fagóforo) se alonga e envolve componentes citoplasmáticos formando uma vesícula denominada de autofagossomo, que se funde a um lisossomo e libera seus constituintes para serem degradados pelas hidrolases lisossomais (CHOI et al., 2013). Esse processo requer a ação dos chamados genes relacionados à autofagia (*autophagy-related genes*, Atgs) que codificam proteínas chave para diversas etapas da autofagia, entre elas ULK1/Atg1, Atg5, Beclin1/Atg6, Atg7 e Atg8 (CHOI et al., 2013). A proteína ortóloga de Atg8 em mamíferos, LC3 (e também alguns de seus homólogos), é muito utilizada como marcadora de autofagia, por ser a única proteína conhecida que se mantém ligada ao autofagossomo mesmo após sua completa formação (KLIONSKY et al., 2016). Além disso, diversos estudos demonstram que LC3 interage com outras proteínas envolvidas especificamente na seleção dos alvos a serem englobados pelo autofagossomo (NOVAK et al., 2010; JOHANSEN; LAMARK, 2011).

A remoção seletiva de mitocôndrias via autofagia, a mitofagia, representa um evento crítico na manutenção de uma população mitocondrial funcional (YOULE; NARENDRA, 2011). Além disso, estudos recentes têm apontado uma importante relação entre o processo mitofágico e controle da massa e função muscular (MASIERO et al., 2009; ROMANELLO et al., 2010; LOKIREDDY et al., 2012). Muito do conhecimento existente sobre os mecanismos celulares envolvidos na mitofagia provém do campo da neurociência, o qual relacionou o mau funcionamento desse processo a desordens neurais, como Parkinson e Alzheimer (YOULE; NARENDRA, 2011). Atualmente, se sabe que o processo mitofágico é controlado pela ação de proteínas como Bnip3, Pink1 e Parkin, responsáveis por reconhecer as mitocôndrias danificadas e/ou envelhecidas e gerar sinais para recrutar a maquinaria autofágica necessária para a mitofagia (YOULE; NARENDRA, 2011).

Bnip3 é um membro da família Bcl-2, que migra para a membrana externa de mitocôndrias que estejam produzindo ERO em excesso e rompe o seu potencial de membrana. Essa proteína possui um domínio conservado evolutivamente que é responsável pela interação com LC3, chamado de LIR (Região de interação com LC3) (BIRGISDOTTIR et al., 2013). Portanto, após ligação com a membrana externa mitocondrial, Bnip3 interage com LC3 encaminhando a organela para mitofagia (NOVAK et al., 2010; THOMAS et al., 2011).

Pink1 (*PTEN-induced kinase 1*), é uma proteína quinase que se acumula na membrana externa de mitocôndrias despolarizadas, mas é rapidamente degradada em mitocôndrias saudáveis (NARENDRA et al., 2010). O acúmulo de Pink1 facilita a translocação da ubiquitina-ligase Parkin para a membrana mitocondrial (SHIBA-FUKUSHIMA et al., 2012). Após fosforilação de Parkin por Pink1, a primeira é ativada e catalisa a ubiquitinação de proteínas mitocondriais como Mfn1, Mfn2 e diversas outras ainda desconhecidas (CHEN; DORN, 2013). A ubiquitinação e subsequente degradação de Mfn1 e Mfn2 via proteassoma ou autofagia, atua no sentido de prevenir a fusão desta mitocôndria danificada com outras saudáveis (YOULE; NARENDRA, 2011). Ainda, a ubiquitinação das mitofusinas e de diversas outras proteínas mitocondriais serve de sinal para recrutar proteínas como p62, molécula adaptadora que possui um motivo de associação à ubiquitina e um motivo LIR (JOHANSEN; LAMARK, 2011). Dessa maneira, p62 interage com proteínas mitocondriais marcadas com ubiquitina e com LC3, promovendo a mitofagia (KIRKIN et al., 2009).

A dinâmica mitocondrial exerce influência direta sobre a mitofagia, uma vez que fissão mitocondrial é necessária para isolar regiões danificadas de mitocôndrias, potencializando os sinais para mitofagia presentes na mitocôndria (YOULE; NARENDRA, 2011). De fato, Romanello et al. (2010) demonstraram que a superexpressão de Bnip3 no músculo esquelético é capaz de dissipar o potencial de membrana mitocondrial, aumentar a autofagia e levar à atrofia muscular, e que o concomitante bloqueio da fissão mitocondrial é suficiente para impedir todos esses processos. A atividade da AMPK também está relacionada à indução de autofagia e mitofagia, uma vez que inibe a quinase mTOR (potente inibidor da autofagia), ativa de ULK1 e o fator de transcrição FoxO3a (regula expressão de LC3 e Bnip3) (ROMANELLO et al., 2010; EGAN et al., 2011; SANCHEZ et al., 2012).

Embora a maioria dos estudos em autofagia muscular tenham sido conduzidos em quadros patológicos, como câncer (PENNA et al., 2013), sepse (MOFARRAHI et al., 2012) e insuficiência cardíaca (JANNIG et al., 2014), Grumati et al. (2011) apresentaram indícios de uma ativação muscular transiente dessa via em situações fisiológicas como, por exemplo, após uma única sessão de EFA em camundongos saudáveis. Tal fato foi confirmado por He et al.

(2012), que demonstraram um significativo aumento da autofagia durante o exercício físico, tanto no músculo esquelético como cardíaco. Esses autores desenvolveram um modelo animal (BCL2-AAA) que mantém a atividade autofágica basal, porém é incapaz de aumentá-la frente a estímulos como jejum ou exercício físico. Assim, descobriram que quando exercitados, esses animais apresentam menor captação de glicose pelos músculos, ativação reduzida de AMPK e menor capacidade de corrida. Ainda, após tratarem esses animais com dieta hiperlipídica e os submeterem a oito semanas de treinamento físico aeróbio, não puderam observar a clássica redução da resistência à insulina proporcionada pelo EFA. De fato, Lira et al. (2013) demonstraram que a autofagia é necessária para as adaptações musculares e mitocondriais induzidas pelo treinamento físico aeróbio. Por fim, LoVerso et al. (LOVERSO et al., 2014) demonstraram que a autofagia é um processo crítico para a manutenção da função mitocondrial durante o EFA. Apesar dos indícios de que mecanismos reconhecidamente envolvidos na mitofagia (i.e., p62, Bnip3 e Parkin) estejam alterados durante o EFA, provavelmente ainda existem novas vias moleculares a serem descobertas.

Visto a importância da manutenção/melhora da capacidade oxidativa para o tratamento/prevenção de doenças crônicas, propusemos um estudo exploratório para buscar por novos mecanismos relacionados à adaptação mitocondrial induzida pelo EFA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Explorar novos mecanismos envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio (EFA).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o proteoma mitocondrial na musculatura esquelética de camundongos submetidos a uma sessão de EFA;
- Identificar novos alvos potencialmente envolvidos na mitofagia induzida pelo EFA na musculatura esquelética;
- Investigar reguladores de transcrição gênica potencialmente envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA na musculatura esquelética.

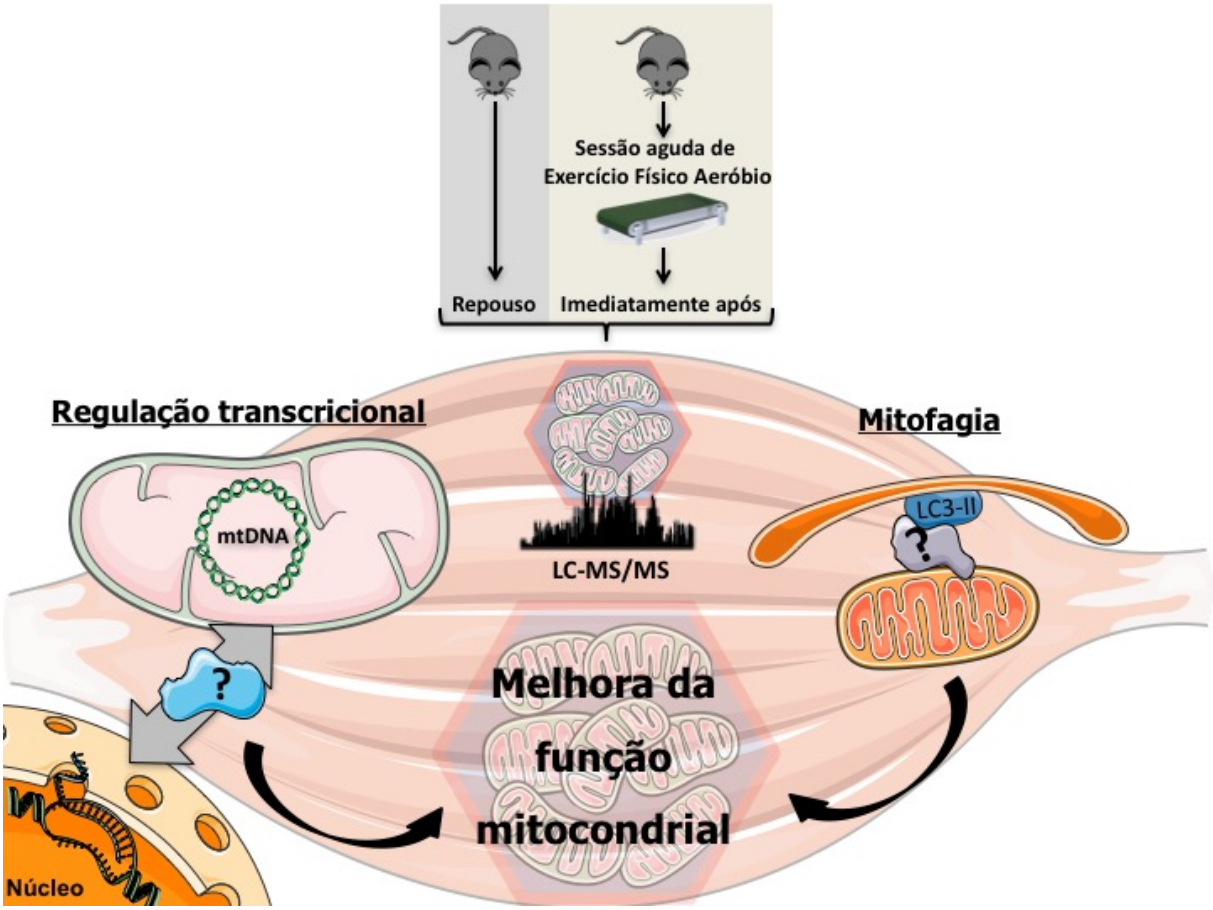

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos objetivos da tese.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA representa um tópico de intensa investigação, que, apesar de avanços recentes importantes (HAWLEY et al., 2014), ainda exibe importantes lacunas. Nesta tese, exploramos esses mecanismos na perspectiva dos efeitos agudos do EFA sobre o proteoma mitocondrial muscular. A seguir, apresentaremos os resultados obtidos na análise proteômica e nos estudos derivados.

3.1 Proteoma mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio

Com o intuito de identificar as modificações no proteoma mitocondrial muscular induzidas agudamente pelo exercício físico aeróbio (EFA), submetemos camundongos jovens (C57BL/6J, 8-12 semanas de idade) a uma sessão de 80 minutos de EFA realizada a 60% da velocidade máxima atingida em um teste incremental até a exaustão em esteira rolante (velocidade inicial de 6 m/min com incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos) (FERREIRA et al., 2007; HE et al., 2012). Os animais foram mortos imediatamente após a sessão de EFA. Foram utilizados como controle animais mantidos em repouso. Todos os músculos de uma das patas posteriores foram removidos e as frações citosólica e mitocondrial foram imediatamente separadas por etapas de centrifugação diferencial conforme Dimauro et al. (2012). Na figura 2A, está apresentado um diagrama do desenho experimental. A eficácia da extração pode ser observada na figura 2B, onde avaliamos a expressão proteica de α-tubulina como marcador citosólico (C) e complexo I mitocondrial como marcador mitocondrial (M). A seguir, submetemos as frações enriquecidas de mitocôndrias dos animais em repouso (n=4) e imediatamente após o EFA (n=4) a uma análise proteômica global (*label free quantification* – LC-MS/MS). Após alinhamento dos espectros adquiridos com o proteoma anotado de camundongo (UniProt, setembro 2015), 2716 proteínas foram comumente detectadas em ambos grupos experimentais (considerando apenas aquelas detectadas em pelo menos 3 das 4 amostras analisadas por condição) (Figura 2C). Destas, 497 encontraram-se diferencialmente expressas entre as duas condições ($p<0,05$), sendo 263 proteínas aumentadas e 234 diminuídas após a sessão de EFA.

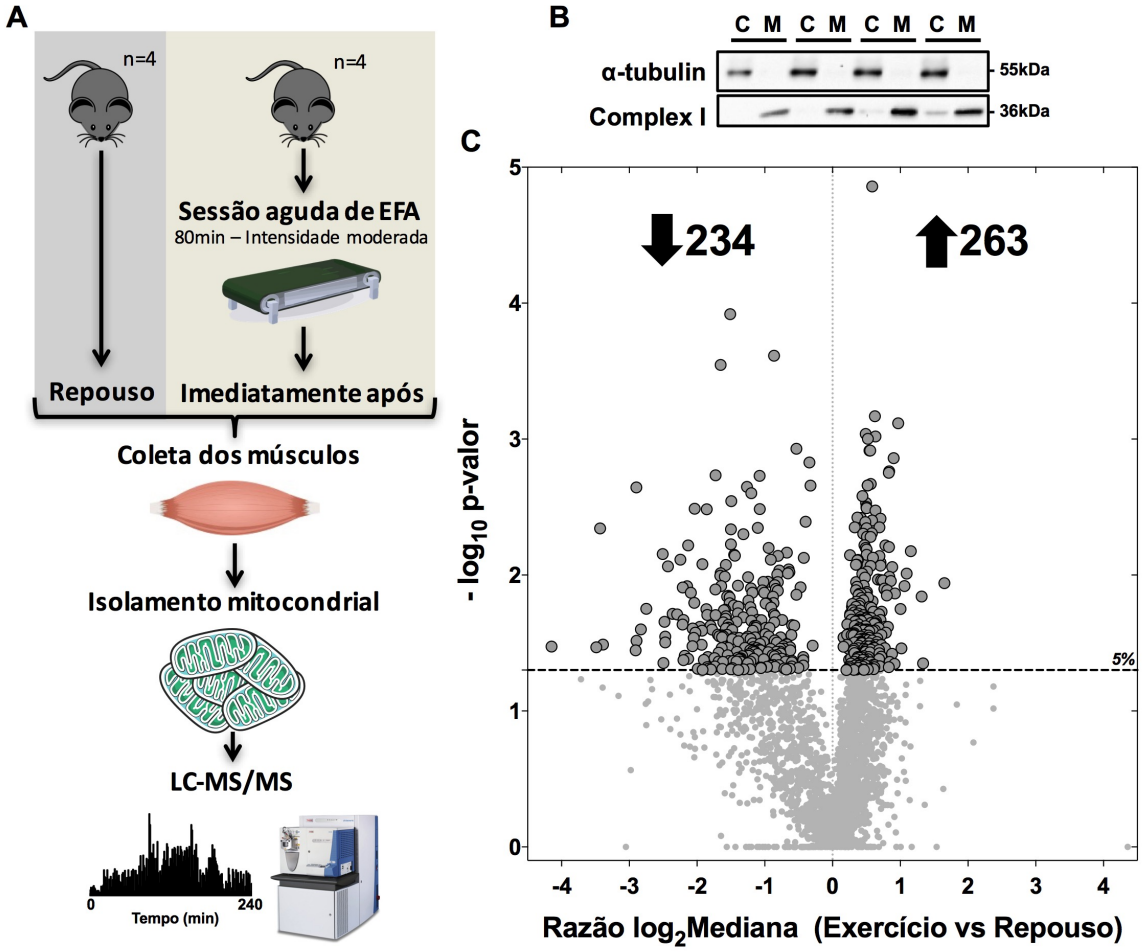

Figura 2 – Abordagem para identificação do proteoma muscular de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbio (EFA). **(A)** Desenho experimental. **(B)** Expressão proteica de α-tubulina, marcador citosólico (C), e complexo I mitocondrial, marcador mitocondrial (M), demonstrando a eficácia na separação das frações citosólica e mitocondrial. **(C)** *Volcano plot* apresentando os valores de log2 da mediana de mudança das proteínas encontradas na fração mitocondrial muscular após o EFA, registrados em função dos valores de -log10 de p-valor. A linha pontilhada horizontal indica o limiar de significância estatística (5%, $p<0,05$, -log10=1,3).

A avaliação imparcial do proteoma mitocondrial após uma sessão de EFA, até então nunca realizada, permite explorar tais resultados utilizando diversas abordagens, as quais podem priorizar a descoberta mecanismos envolvidos em diferentes processos da adaptação mitocondrial induzida pelo EFA. Dessa maneira, desenvolvemos duas abordagens distintas: 1) a busca por proteínas potencialmente envolvidas na mitofagia induzida pelo EFA; e 2) identificação de possíveis reguladores de transcrição gênica envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA. Nos próximos tópicos apresentaremos os resultados encontrados nessas duas abordagens.

3.2 Novos mecanismos envolvidos na mitofagia induzida pelo exercício físico aeróbio

Desde o primeiro trabalho que demonstrou a capacidade de uma sessão de EFA em induzir autofagia no músculo esquelético (GRUMATI et al., 2011), diversos outros estudos foram publicados neste tema. Apesar da clara tendência do EFA induzir de fato autofagia (HE et al., 2012; JAMART et al., 2012a; JAMART et al., 2012b; JAMART et al., 2013; LOVERSO et al., 2014; PAGANO et al., 2014; SALEEM et al., 2014; LIU et al., 2015; SCHWALM et al., 2015; VAINSHTEIN et al., 2015; FRITZEN et al., 2016; HALLING et al., 2016; LENHARE et al., 2017), ainda existem estudos que não observam mudanças significantes (LOVERSO et al., 2014; FRITZEN et al., 2016; SMILES et al., 2017), e ainda outros que sugerem até mesmo uma diminuição da autofagia pós-EFA (KIM et al., 2012; FRITZEN et al., 2016). Em sua maioria, esses resultados conflitantes podem ser explicados por diferenças nos protocolos de exercício, onde o volume e intensidade da sessão de EFA parecem influenciar diretamente na magnitude de indução de sinais pró-autofágicos (HE et al., 2012; SCHWALM et al., 2015). Além disso, outros fatores como característica da contração muscular (concêntrica ou excêntrica), idade, sexo, músculo avaliado e momento de avaliação pós sessão de EFA também podem influenciar na resposta autofágica. Visto que os dados da literatura referente ao curso temporal de atuação da autofagia durante e após o EFA são muitas vezes discordantes, optamos por inicialmente investigar a expressão de genes e proteínas relacionados à autofagia/mitofagia neste contexto.

Utilizando desenho experimental semelhante ao apresentado na Figura 3A, porém, com a inclusão de um grupo de animais analisados após 3 horas de recuperação do EFA, avaliamos a expressão de diversos genes relacionados à autofagia e mitofagia no músculo gastrocnêmio desses animais (Figura 3A). Imediatamente após o EFA, observamos aumento significativo dos genes *Map1lc3b*, *Nix*, *Park2* e *Ctsl*, os quais, com exceção de *Park2*, permaneceram aumentados após 3 horas de recuperação. Ainda, os genes Map1lc3a, *Gabarapl1*, *Bnip3* e *Ctsd* apresentaram aumento significativo após 3 horas de recuperação em relação ao repouso. Agudamente, o EFA não modulou a expressão dos genes *Drp1*, *Fis1*, *Mfn1* e *Mfn2*, envolvidos nos processos de dinâmica mitocondrial. Uma vez que evidenciamos uma resposta transcricional pró-autofágica/mitofágica induzida pelo EFA, avaliamos a expressão gênica de fatores de transcrição que poderiam explicar tal resposta (Figura 3B). Nesse sentido, os fatores de transcrição *Atf4* e *Jun* apresentaram aumento significativo imediatamente após o EFA, sendo que a expressão de *Atf4* permaneceu aumentada após 3 horas de recuperação, enquanto *Jun* retornou ao nível de repouso. Por sua vez, os genes *Foxo1*, *Foxo3*, *Cebpb* e *Stat3* apresentaram

aumento de expressão significativo após 3 horas de recuperação do EFA. Como visto, diversos fatores de transcrição relacionados à autofagia/mitofagia são modulados por uma sessão de EFA, sugerindo que diferentes vias intracelulares contribuem para o aumento da expressão de genes autofágicos/mitofágicos (FENG et al., 2015).

Ainda, é interessante notar que a reprogramação transcricional pró-autofagia/mitofagia parece ser exclusiva de estímulos agudos de EFA, uma vez que não verificamos mudanças significativas na expressão de genes relacionados à autofagia/mitofagia no músculo gastrocnêmio de camundongos ativos por exposição a rodas de atividade física espontânea durante oito semanas (Figura 3C). Apesar de não termos observado regulação transcricional pró-autofagia/mitofagia em animais ativos, não é possível afirmar que a autofagia/mitofagia não seja modulada após período de treinamento físico aeróbio. Ademais, a avaliação apropriada do fluxo autofágico é complexa e requer estratégias que utilizam fármacos para impedir a degradação dos autofagossomos, ou outras que permitam quantificar a formação de autofagossomos e autolisossomos (KLIONSKY et al., 2016). De fato, Ju et al. (2016) observaram que camundongos submetidos a oito semanas de treinamento de natação apresentaram maior fluxo autofágico muscular, este avaliado pelo bloqueio da degradação de autofagossomos induzido por colchicina. Apesar de não terem avaliado o fluxo autofágico de maneira apropriada, este resultado também foi sugerido por Lira et al. (2013) em animais expostos a rodas de atividade física espontânea, mesmo modelo por nós utilizado. Lira et al. (2013) também observaram maior expressão de Bnip3 na musculatura de animais ativos, e a partir disso sugeriram maior fluxo mitofágico nesses animais. No entanto, ao avaliar animais com superexpressão muscular de PGC-1α1, os quais apresentam diversas características fenotípicas de animais ativos, Vainshtein et al (2015) observaram de fato maior capacidade lisossomal e fluxo autofágico muscular, contudo, com redução do fluxo mitofágico muscular. Apesar de resultados conflitantes, é nítido o papel do processo autofágico na adaptação muscular e mitocondrial induzida pelo treinamento físico aeróbio (LIRA et al., 2013).

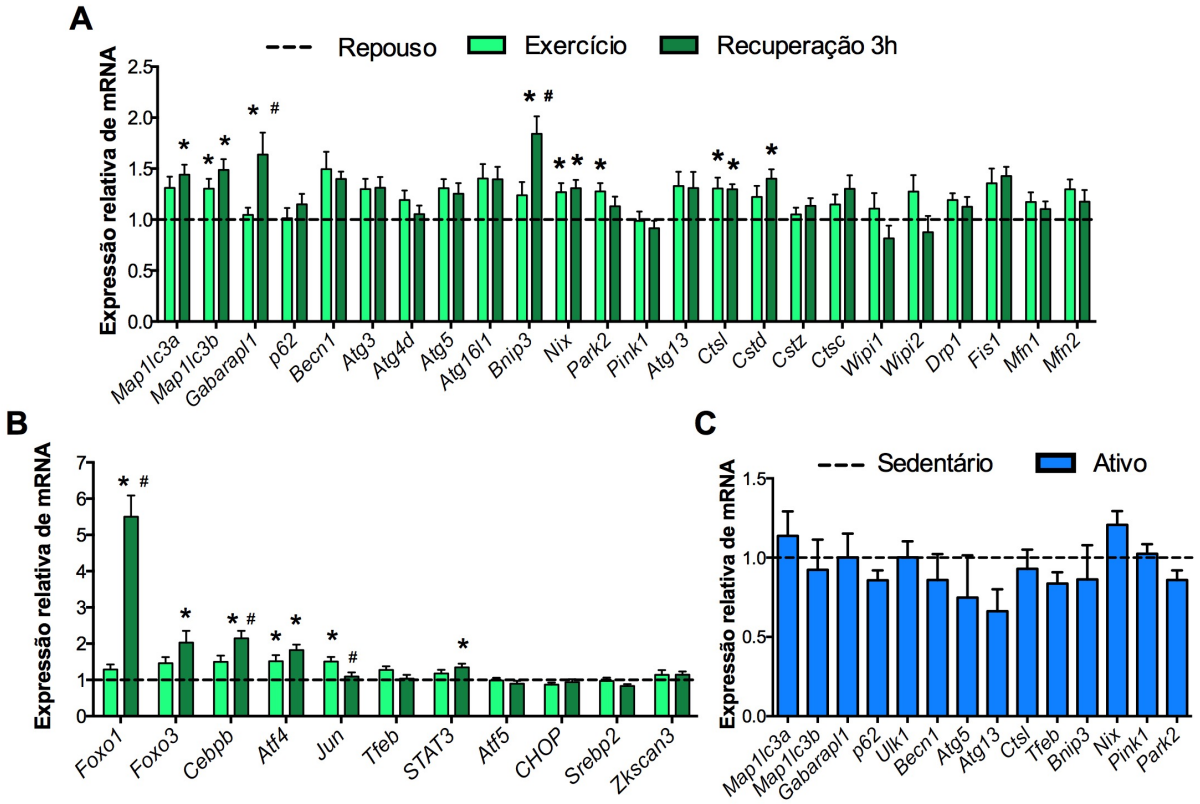

Figura 3 – Respostas agudas e crônicas do exercício físico aeróbio (EFA) na expressão de genes relacionados à autofagia/mitofagia no músculo esquelético de camundongos. Em **(A)** e **(B)**, análise realizada no músculo gastrocnêmio de animais em repouso (linha pontilhada), imediatamente após o EFA (Exercício) e após de 3h de recuperação (Recuperação 3h). Em **(C)**, análise realizada no músculo gastrocnêmio de animais sedentários (linha pontilhada) e expostos por 8 semanas à roda de atividade física espontânea (Ativo). Dados apresentados em média e erro padrão da média (5-8 animais por grupo). * $p<0.05$ *vs* Repouso; # $p<0.05$ *vs* Exercício.

Visto que o EFA realizado de forma aguda parece induzir resposta pró-autofágica/mitofágica em nosso estudo, avaliamos a expressão proteica de LC3, p62 e Bnip3 no lisado total do músculo quadríceps de camundongos em repouso (R) ou submetidos a uma sessão de EFA (Ex), avaliando também a resposta de recuperação após 3, 6, 12 e 24 horas (Figura 4). Não observamos nenhuma alteração na expressão de LC3-I e LC3-II no decorrer do curso temporal, contudo, houve uma tendência a redução da razão LC3-II/LC3-I 6 horas após a realização da sessão de EFA (Rec 6h) e uma diminuição significante 24 horas após a sessão (Rec 24h) (Figura 4A). Em relação à expressão proteica de p62, não observamos nenhuma alteração significativa (Figura 4B). Por outro lado, observamos tendência para redução da expressão de Bnip3 12 horas após a sessão de EFA (Rec 12h) (Figura 4C). A ausência de alteração de LC3-I ou LC3-II, p62 e Bnip3 no lisado total muscular, pode ser explicada por um possível *turnover* aumentado desses marcadores, hipótese sustentada pelo aumento da expressão gênica de alguns deles. Apesar da avaliação desses marcadores em um curso

temporal, como por nós realizada, levantar informações importantes, a adequada avaliação do fluxo autofágico é feita pela quantificação desses marcadores após bloqueio farmacológico da degradação lisossomal, como realizado por Vainshtein et al (2015).

Poucos estudos verificaram os efeitos do EFA sobre a mitofagia, esta avaliada pelo acúmulo de proteínas autofágicas em mitocôndrias isoladas da musculatura esquelética. Três desses trabalhos, utilizaram animais de experimentação e observaram indução de mitofagia (LOVERSO et al., 2014; SALEEM et al., 2014; VAINSHTEIN et al., 2015). Ao passo que apenas um, realizado em humanos, não observou alterações significativas (SCHWALM et al., 2017). Assim, avaliamos a expressão das mesmas proteínas em fração enriquecida de mitocôndrias extraída dos músculos das patas posteriores dos mesmos animais. De maneira interessante, observamos aumento da presença de LC3-II na fração mitocondrial imediatamente após a sessão de EFA (Ex) e em Rec 12h (Figura 4D), ao passo que houve um aumento gradual da presença de p62 na fração mitocondrial com tendência à significância ($p=0,08$) em Rec 6h e aumento significativo em Rec 12h (Figura 4E). Já a expressão de Bnip3 apresentou tendência a aumento na fração mitocondrial apenas em Rec 3h (Figura 4F). A ubiquitinação de proteínas mitocondriais é apresentada como outro fator indutor do processo mitofágico, uma vez que promove a translocação de p62 e outros receptores mitofágicos para a organela (SHAID et al., 2013; KLIONSKY et al., 2016). No entanto, não observamos acúmulo significativo de proteínas poli-ubiquitinadas em nenhum dos momentos analisados (Figura 4G).

Interessante ressaltar que na análise proteômica que realizamos na fração enriquecida de mitocôndrias musculares que foi isolada imediatamente após o EFA, encontramos aumento das proteínas Ctsd, Ctsl e Ctsz, proteases lisossomais chamadas de Catepsinas D, L e Z, respectivamente (Anexo 1), o que reforça a ideia da mitofagia induzida pelo EFA, uma vez que sugere a colocalização de lisossomos e mitocôndrias (BECHET et al., 2005).

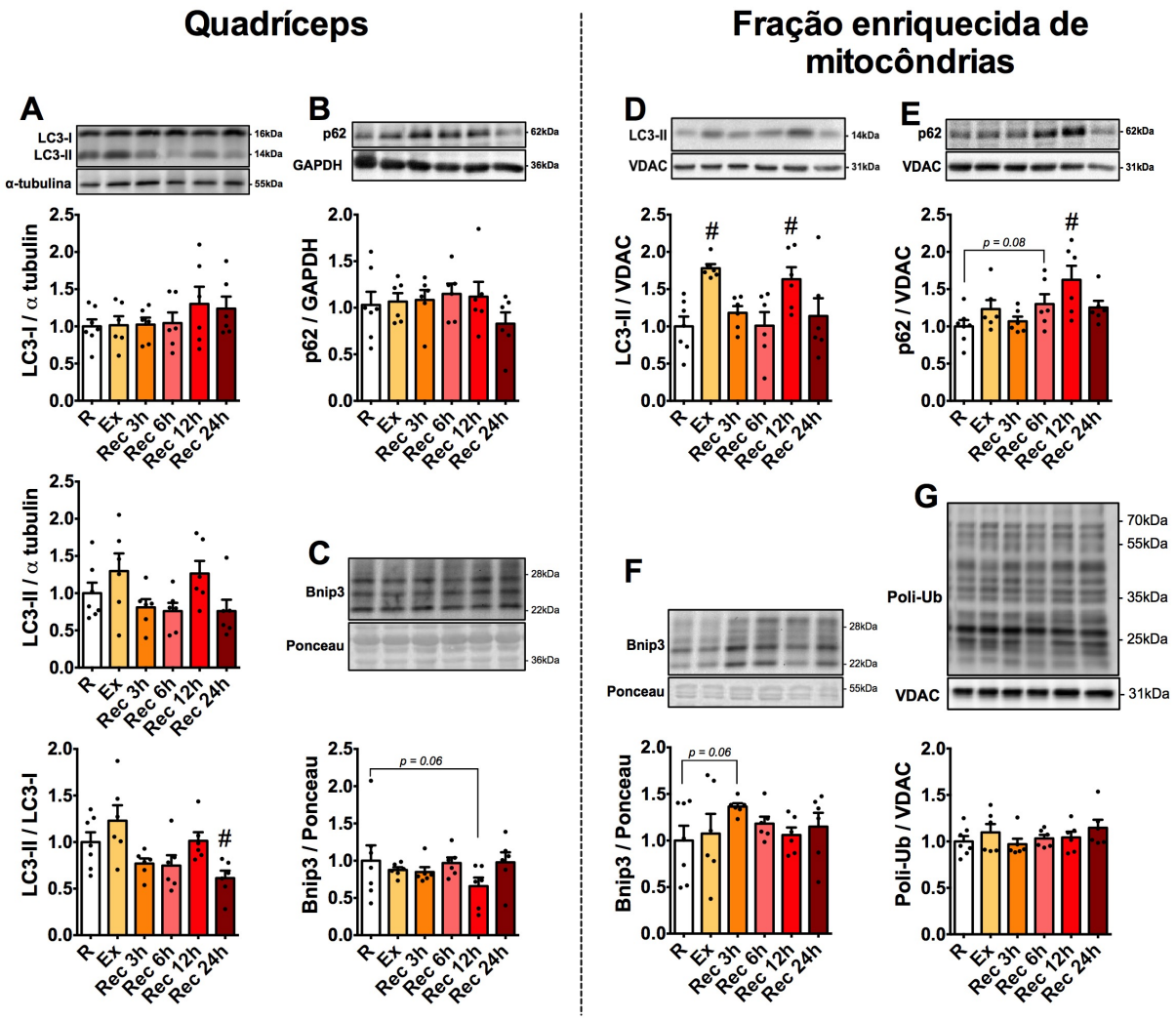

Figura 4 – Resposta de proteínas relacionadas à autofagia e mitofagia no músculo quadríceps e na fração mitocondrial muscular de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbio (EFA). Expressão proteica de **(A)** LC3-I, LC3-II e razão LC3-II/LC3-I, **(B)** p62 e **(C)** Bnip3 no músculo quadríceps de animais eutanasiados em repouso (R), imediatamente após uma sessão de 80 min de EFA (Ex) ou após recuperação (Rec) de 3, 6, 12 e 24 horas da sessão de EFA. Expressão proteica de **(D)** LC3-II, **(E)** p62, **(F)** Bnip3 e **(G)** proteínas poli-ubiquitinadas na fração enriquecida de mitocôndrias extraída da musculatura esquelética dos mesmos animais. Dados apresentados em média e erro padrão da média (6-7 animais por grupo). # $p<0.05$ *vs* repouso (R).

O acúmulo expressivo de LC3-II na fração mitocondrial muscular ainda durante o EFA pode sugerir que a sinalização para mitofagia acontece rapidamente, mas o processo até a degradação de uma mitocôndria despolarizada por levar horas, como demonstrado por Twig et al. (2008). Outras explicações cabíveis incluem a mitofagia ocorrer de forma mais lenta que o processo autofágico de outros substratos ou ainda o aumento da autofagia estar direcionado unicamente para a degradação mitocondrial, tendo em vista a ausência de alteração de LC3-II no lisado total muscular (JAHREISS et al., 2008; TWIG et al., 2008). Diferente de outros

estudos (LOVERSO et al., 2014; VAINSHTEIN et al., 2015), o acúmulo de LC3 por nós observado não parece ser explicado pelo aumento de p62 ou Bnip3 na fração mitocondrial, já que estas proteínas não apresentaram mudanças de expressão quando avaliadas tanto por *immunoblotting* como por análise proteômica (Anexo 1).

Ainda, por todo o curso temporal após o EFA, não observamos diferença significativa na ubiquitinação de proteínas mitocondriais, sugerindo que o mecanismo de mitofagia induzida por Parkin também não esteja envolvido. De fato, outros já observaram que animais que não expressam Parkin ainda assim apresentam mitofagia de mitocôndrias despolarizadas em neurônios, ratificando a existência de receptores mitofágicos alternativos (STERKY et al., 2011). Mais recentemente, Lazarou et al. (2015) demonstraram que Pink1 fosforila ubiquitina na Ser65 e induz recrutamento de receptores mitofágicos de maneira independente de Parkin. Isso sugere que a quantidade total de ubiquitinação de proteínas mitocondriais pode não ser determinante para a mitofagia, mas sim os níveis de fosforilação das moléculas de ubiquitina presentes na organela.

Deveras intrigante foi o acúmulo de LC3 na fração mitocondrial em dois momentos distintos do curso temporal: imediatamente (Ex) e 12 horas (Rec 12h) após a sessão de EFA. As proteínas p62 e Bnip3 funcionam como sinalizadoras para a mitofagia por permitir a translocação de LC3 para a organela (PANKIV et al., 2007; NOVAK et al., 2010). Assim, o aumento de LC3 na fração mitocondrial em Rec 12h pode ser explicado pelo acúmulo de p62 iniciado em Rec 6h e persistindo em Rec 12h. Contudo, p62 e Bnip3 não estão alteradas imediatamente após a sessão, sugerindo que algum mecanismo desconhecido esteja recrutando LC3 para a fração mitocondrial e promovendo, consequentemente, a mitofagia ainda durante o exercício.

A seguir, decidimos explorar de maneira imparcial os potenciais alvos envolvidos no recrutamento de LC3 para a mitocôndria durante o EFA (Figura 5A). Inicialmente, procuramos em nossa análise de proteômica mitocondrial por proteínas que possuíssem motivos de interação com LC3 (*LC3-interacting regions* – LIR) já previamente validados (WILD et al., 2014; YAMANO et al., 2014; MURAKAWA et al., 2015; BHUJABAL et al., 2017; WEI et al., 2017). Encontramos em nosso conjunto de dados 12 proteínas que possuiam motivos LIR experimentalmente validados (Fundc1, p62/Sqstm1, Bnip3, Calreticulin, Cltc, Fyco1, Tbc1d15, Tbc1d25, Stbd1, Fkbp8, Bcl2l13 e Phb2), sendo que Tbc1d15 apresentou redução significativa, enquanto Phb2 apresentou aumento significativo na fração mitocondrial imediatamente após o EFA (Figura 5A). Recentemente, foi demonstrado que o rompimento da membrana externa mitocondrial expõe Phb2 ao citosol, promovendo sua interação com LC3 e o consequente

encaminhamento da mitocôndria despolarizada para degradação via mitofagia (WEI et al., 2017). Diante disso, consideramos que esta proteína apresenta fortes indícios para um envolvimento no controle da adaptação mitocondrial induzida pelo EFA.

Adicionalmente, submetemos a uma análise de bioinformática os resultados obtidos na proteômica. Mais especificamente, utilizamos a ferramenta iLIR, um servidor *online* especializado na leitura da estrutura primária de proteínas em busca de possíveis motivos LIR (KALVARI et al., 2014). Resumidamente, o algoritmo utilizado pelo iLIR procura por sequências de aminoácidos compatíveis com um padrão refinado de motivos LIR (xLIR) ou com o motivo LIR canônico (WxxL) e classifica essas sequências de acordo com uma matriz de pontuação (*position-specific scoring matrix* – PSSM) criada a partir de motivos LIR experimentalmente comprovados. Além disso, o iLIR sobrepõe estas sequências com segmentos que residem ou estão adjacentes a regiões desordenadas e susceptíveis a formar interações de estabilização após ligação com outra proteína, como previsto pela ferramenta chamada ANCHOR (DOSZTANYI et al., 2009). Dessa maneira, a combinação de motivos xLIR/WxxL apresentando valores de PSSM elevados (>15) com a presença de segmentos ANCHOR fornece uma previsão relativamente confiável para a interação entre a proteína analisada e LC3. Ao analisarmos a estrutura primária das proteínas significativamente aumentadas na fração mitocondrial imediatamente após o EFA, encontramos 3 proteínas contendo motivos LIR preditos (PSSM>15 e presença de segmento ANCHOR), a saber: Mief2; Obscn; e Igfbp7 (Figura 5A) (Tabela 1).

Tabela 1 – Predição de motivos LIR das proteínas aumentadas na fração mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio.

Proteína	iLIR						
	Motivo	**Início**	**Fim**	**Sequência LIR**	**PSSM**	**e-valor**	**ANCHOR**
Mief2	WxxL	66	71	DSWKEL	19	1,2E-02	Sim
Obscn	xLIR	225	230	ADYLPL	15	4,2E-02	Sim
	xLIR	2181	2186	GSWTTL	18	1,6E-02	Não
Igfbp7	WxxL	229	234	TGWVLV	16	3,0E-02	Sim

Início e Fim rementem às posições do primeiro e último aminoácido da sequência LIR predita dentro da estrutura primária da proteína. PSSM, *position-specific scoring matrix*. E-valor, representa o número de hexapeptídeos aleatórios esperado para alcançar um score igual ou maior ao hexapeptídeo analisado.

Mitochondrial elongation factor 2 (Mief2, também conhecida como *Mitochondrial dynamics protein,* MiD49) é uma proteína presente na membrana externa das mitocôndrias, e está envolvida no processo de dinâmica mitocondrial por promover o recrutamento Drp1

(Dnm1l) (PALMER et al., 2011). Já *Obscurin* (Obscn) é uma enorme proteína (≈800kDa) expressa especificamente pelos músculos esquelético e cardíaco, se localiza na banda M dos sarcômeros e possui papel indispensável na miofibrilogênese por organizar a estrutura espacial e estabilizar as proteínas sarcoméricas (YOUNG et al., 2001; BORISOV et al., 2006). Por fim, *Insulin-like growth factor-binding protein 7* (Igfbp7) é uma proteína secretada que apresenta baixa afinidade de ligação com IGF-I e IGF-II quando comparada com outros membros da família IGFBP, possuindo ainda um possível papel na progressão tumoral (AKIEL et al., 2014). Diante do exposto, selecionamos Mief2 como um possível alvo relacionado à mitofagia induzida pelo EFA, uma vez que, dentre as proteínas identificadas, é a única com presença na membrana externa da mitocôndria e está envolvida em dinâmica mitocondrial, processo diretamente relacionado à mitofagia (TWIG et al., 2008).

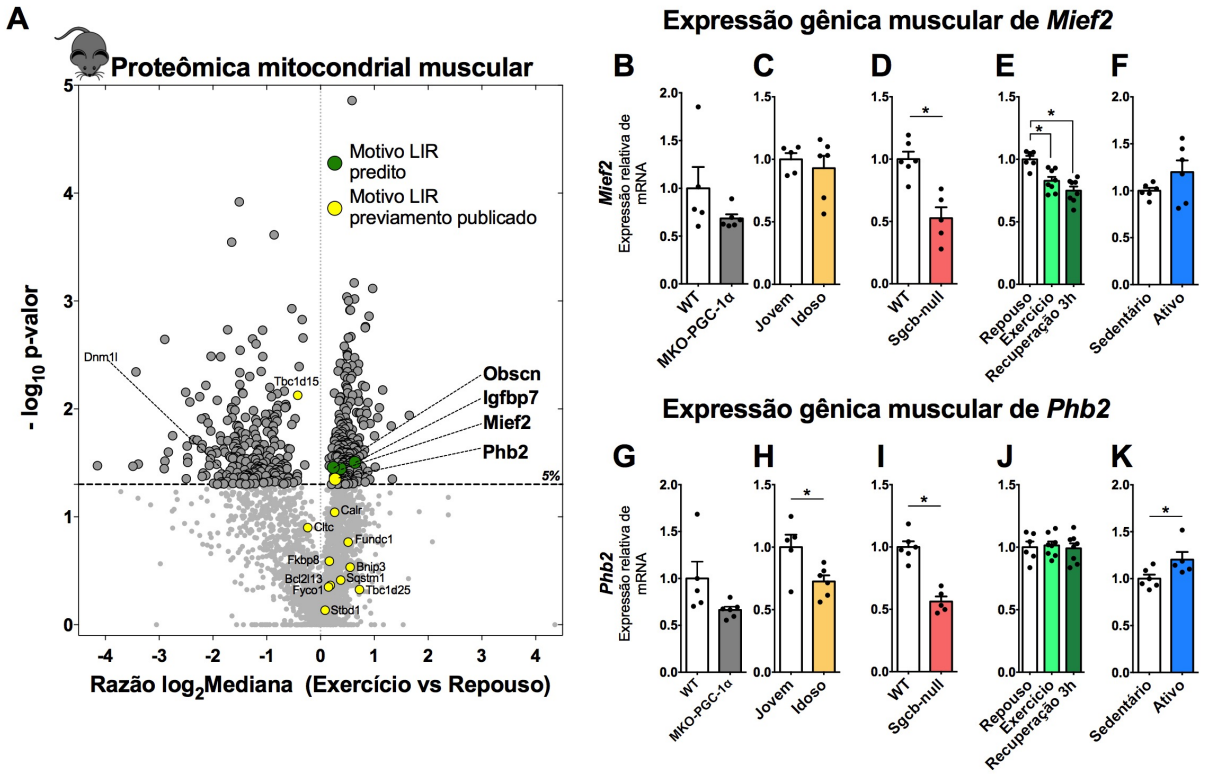

Figura 5 – Busca por alvos envolvidos na mitofagia induzida pelo exercício físico aeróbio (EFA). **(A)** Proteínas de proteínas enriquecidas na fração mitocondrial após uma sessão de EFA e com motivo de interação com LC3 (LIR) predito ou previamente validado. *Volcano plot* apresentando os valores de $\log_2$ da mediana de mudança das proteínas encontradas na fração mitocondrial muscular após o EFA, registrados em função dos valores de -log10 de p-valor. A linha pontilhada horizontal indica o limiar de significância estatística (5%, $p<0,05$, $-\log_{10}=1,3$). Expressão gênica de Mief2 e Phb2 no músculo esquelético de animais com deleção muscular de PGC-1α **(B e G)**, idosos **(C e H)**, com distrofia muscular **(D** e **I)**, submetidos a uma sessão de EFA (repouso, imediatamente após e 3h de recuperação) **(E** e **J)** ou expostos por 8 semanas à roda de atividade física espontânea **(F e K)**. Dados apresentados em média e erro padrão da média (5-8 animais por grupo). * $p<0.05$ entre os grupos.

Considerado que Mief2 e Phb2 podem estar envolvidas na mitofagia induzida pelo EFA, decidimos explorar tais alvos em diversos contextos fisiológicos e patológicos. Para isso, avaliamos a expressão gênica desses alvos no músculo gastrocnêmio de camundongos em diferentes condições experimentais: 1) deleção muscular de PGC-1α (WT vs. MKO-PGC-1α); 2) envelhecimento (7 semanas vs. 24 meses de idade); 3) distrofia muscular (WT vs. *Beta-Sarcoglycan-null*); 4) sessão aguda de EFA (Repouso vs. Imediatamente após vs. 3h de recuperação); e 5) oito semanas de exposição à roda de atividade física espontânea (Sedentário vs. Ativo). Para Mief2, observamos diminuição significativa da expressão gênica em modelo de distrofia muscular (Figura 5D) e após uma sessão de EFA (Figura 5E), ao passo que não encontramos diferenças nos camundongos MKO-PGC-1α (Figura 5B), idosos (Figura 5C) e ativos (Figura 5F). Em relação à Phb2, observamos que ocorre redução da expressão gênica tanto no envelhecimento (Figura 5H) como em modelo de distrofia muscular (Figura 5I), ao passo que estes genes parecem não ser modulados por deleção muscular de PGC-1α (Figura 5G) e após uma sessão aguda de EFA (Figura 5J). Ainda, observamos aumento da expressão gênica de *Phb2* em camundongos ativos (Figura 5K).

Prohibitin 2 (Phb2) é encontrada na membrana interna das mitocôndrias, onde exerce importante papel na regulação da morfologia da organela e previne a degradação de proteínas mitocondriais recém-sintetizadas, atuando assim como uma chaperona (NIJTMANS et al., 2000). Ainda, a perda de função da Phb2 induz fragmentação mitocondrial, diminuição de respiração mitocondrial (MERKWIRTH et al., 2008) e está relacionada à redução de longevidade, ao processo de envelhecimento e outras doenças como obesidade, diabetes e câncer (COATES et al., 1997; THEISS; SITARAMAN, 2011). De fato, verificamos que modelos experimentais de envelhecimento e com distrofia muscular apresentam menor expressão gênica muscular de *Phb2*, ao passo que sua expressão está aumentada na musculatura de camundongos ativos quando comparados com animais sedentários. É interessante notar ainda que na mitocôndria, a Phb2 forma um complexo com Phb (*Prohibitin*) (NIJTMANS et al., 2000), a qual nossos dados de proteômica também revelam estar aumentada na fração mitocondrial após o EFA (15% de aumento, p=0.05) (Anexo 1). Isso reforça que o complexo de Phb-Phb2 pode estar envolvido na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA.

A recente descoberta de que Phb2 interage com LC3 e induz a remoção de mitocôndrias danificadas quebra um paradigma de que receptores mitofágicos estariam localizados apenas na membrana externa das mitocôndrias (WEI et al., 2017). Wei et al. (2017) demonstraram que a degradação proteassomal da membrana mitocondrial externa via Parkin expõe ao citosol a proteína Phb2, localizada na membrana mitocondrial interna, e facilita sua interação com LC3

pelo motivo LIR. O silenciamento de *PHB2* em células HeLa foi capaz de abolir completamente a remoção de mitocôndrias despolarizadas mediada por Parkin. Ainda, esse bloqueio da mitofagia pelo silenciamento de *PHB2* foi comparável, em magnitude, ao bloqueio induzido pelo silenciamento de *ATG7*, essencial para a formação de autofagossomos.

Além de Phb2, identificamos Mief2 como outro alvo com potencial envolvimento na mitofagia induzida pelo EFA. Análise *in silico* da estrutura proteica primária de Mief2 identificou um provável motivo LIR canônico (WxxL), levantando a possibilidade dessa proteína interagir com LC3 e atuar como um receptor mitofágico. Mief2 é uma proteína de 454 aminoácidos (49kDa), está ancorada na membrana mitocondrial externa por um domínio transmembrana presente no N-terminal (aminoácidos 33 a 47), e sua porção C-terminal está exposta ao citosol (PALMER et al., 2011). O motivo LIR predito está localizado entre os aminoácidos 66 e 71 (DSWKEL), logo, no início da porção citosólica de Mief2. Interessante destacar que este motivo é completamente conservado em humanos (dados não apresentados).

Diversos estudos já exploraram o papel da Mief2 na dinâmica mitocondrial (PALMER et al., 2011; LIU et al., 2013; PALMER et al., 2013; YU et al., 2017). As proteínas Mief2, Mief1 (ou MiD51, a qual apresenta 45% de homologia com Mief2), Mff e Fis1, todas ancoradas à membrana mitocondrial externa, foram descritas como receptoras para recrutamento de Drp1 para a mitocôndria, passo central na indução de fissão mitocondrial (PALMER et al., 2011). Fis1 foi caracterizada inicialmente em leveduras, onde apresenta papel fundamental no recrutamento de Dnm1 (correspondente à Drp1 em leveduras) e na indução de fissão mitocondrial. Contudo, estudos recentes demonstram que em mamíferos Fis1 tem pequena participação na fissão mitocondrial basal (OTERA et al., 2010), mas auxilia na fissão mitocondrial induzida por estresse após o processo ter sido iniciado por Drp1 e Mff (SHEN et al., 2014). Além disso, Fis1 em mamíferos parece participar da mitofagia por interagir com TBC1D15, que por sua vez serve de receptor mitofágico para recrutamento de proteínas da família da LC3 (YAMANO et al., 2014). Yamano et al. (2014) demonstraram ainda que células que não expressam TBC1D15 apresentam acúmulo de agregados de LC3, de maneira muito semelhante ao que observamos após silenciamento de Mief2 (e também de Phb2). Esse fenômeno acontece pela inativação de GTPase Rab7 promovida por TBC1D15, o que auxilia na expansão da membrana autofágica ao redor da mitocôndria e seu enclausuramento no autofagossomo (YAMANO et al., 2014). Interessante ressaltar que não há diferenças em Fis1 ou qualquer proteína da família Rab em nossos dados de proteômica, e que Tbc1d15 apresenta redução na fração mitocondrial após o EFA, descartando a participação de Tbc1d15 no contexto da mitofagia induzida pelo EFA (Anexo 1).

Palmer et al. (2011) sugeriram que Mief1 e Mief2 são funcionalmente redundantes e complementares no contexto da dinâmica mitocondrial, uma vez que só observaram alterações morfológicas nas mitocôndrias quando ambas foram silenciadas. Nesse estudo, o silenciamento de Mief1 e Mief2 reduziu em aproximadamente quatro vezes a fragmentação mitocondrial induzida por CCCP, desacoplador mitocondrial. No entanto, Liu et al. (2013) apresentam diferenças importantes entre Mief1 e Mief2. A primeira é mais expressa em tecidos em desenvolvimento, enquanto a segunda predomina em tecidos adultos, sendo o músculo esquelético um dos tecidos que mais expressa Mief2. A superexpressão de Mief2 induz fusão mitocondrial mais proeminente quando comparada à superexpressão de Mief1, efeito ainda não explicado. Mief2 forma oligômeros de elevado peso molecular, ao passo que Mief1 está presente em grande parte como dímero. As consequências funcionais dessas diferenças ainda precisam ser determinadas. Apesar da considerável similaridade estrutural e funcional com Mief2, não identificamos motivo LIR em Mief1. Isso sugere que entre essas proteínas parálogas, apenas Mief2 apresenta possível papel na mitofagia.

Embora Mief1, Mief2 e Mff apresentem participação importante no recrutamento de Drp1 para a mitocôndria, o desfecho final no processo de fissão mitocondrial é distinto. Enquanto a superexpressão de Mff promove intensa fragmentação mitocondrial e seu silenciamento induz fusão mitocondrial (OTERA et al., 2010), tanto a superexpressão quanto o silenciamento de Mief1 ou Mief2 levam à fusão de mitocôndrias e formação de rede mitocondrial condensada ou tubular (PALMER et al., 2011). De fato, já havia sido demonstrado que Mief1/Mief2 recruta uma forma inativa de Drp1, o que favorece a fusão mitocondrial e explica o fenótipo de superexpressão (PALMER et al., 2013). No entanto, apenas recentemente foi demonstrado que a fissão mitocondrial parece depender de um adequado balanço na formação de um complexo trimérico entre Drp1/Mief1 ou 2/Mff (YU et al., 2017). Assim, o excesso de Mief1/2 favorece o sequestro e inativação de Drp1, enquanto a redução de Mief1/2 prejudica a captura de quantidade suficiente de Drp1 na superfície mitocondrial (YU et al., 2017). É curioso notar que nossos dados de proteômica indicam que tanto Drp1 (Dnm1l) como Dyn2 (Dnm2), recentemente reconhecida como componente essencial para fissão mitocondrial (LEE et al., 2016), estão significativamente reduzidas na fração mitocondrial muscular após o EFA. Uma vez que Mief2 está aumentada, Drp1 e Dyn2 diminuídas, e as proteínas Mfn1, Mfn2 e Opa1, envolvidas na fusão mitocondrial (LIESA; SHIRIHAI, 2013), não estão alteradas na fração mitocondrial muscular após o EFA, é possível sugerir favorecimento da fusão mitocondrial (Anexo 1). Esses dados corroboram os resultados de tese recente de nosso laboratório, a qual demonstrou por microscopia eletrônica um aumento do processo de fusão

mitocondrial na musculatura esquelética imediatamente após uma sessão de EFA em camundongos (VOLTARELLI, 2016).

Em seguida, por meio de ensaios de perda de função, decidimos testar o envolvimento de Mief2 e Phb2 na indução do fluxo autofágico. Para isso, utilizamos vetor retroviral para gerar uma linhagem de mioblastos C2C12 que expressa de forma estável a proteína recombinante LC3 ligada em tandem às proteínas mCherry e GFP (mCherry-GFP-LC3). Esta técnica se fundamenta em uma diferença físico-química entre mCherry (vermelho) e GFP (verde) frente à um pH ácido, onde a fluorescência de GFP é rapidamente extinta ao ser exposta a um meio ácido, ou seja, ao atingir os lisossomos (N'DIAYE et al., 2009; KLIONSKY et al., 2016). Ao acoplar esta técnica com a leitura de fluorescência em um microscópio de fluorescência conjugado a uma incubadora de células (INCell Analyzer 2200 system, GE), é possível acompanhar todo o processo autofágico em células vivas por meio da quantificação do número de autofagossomos (pontos vermelhos colocalizados com pontos verdes, i.e. amarelo) e autolisossomos (pontos vermelhos sem colocalização com pontos verdes) (Figura 6A) (PANKIV et al., 2007; MIZUSHIMA et al., 2010).

Para validar este método, realizamos um experimento com diferentes concentrações da substância cloroquina (1, 10 e 30μM), a qual bloqueia o fluxo autofágico por aumentar o pH lisossomal e inibir a ação das hidrolases lisossomais (KLIONSKY et al., 2016). Com esse bloqueio, o conteúdo presente nos autolisossomos (fusão autofagossomo-lisossomo) não será degradado e a fluorescência de GFP será mantida (Figura 6B). De fato, pudemos verificar que 6 horas de tratamento com 30uM de cloroquina induziu aumento do número de pontos amarelos (colocalizados, autofagossomos e autolisossomos não-funcionais) (Figura 6C), ao passo que o número de pontos vermelhos (autolisossomos funcionais) diminuiu (Figura 6D). Ainda, para que seja possível testar o envolvimento de Mief2 e Phb2 na indução do fluxo autofágico, foi necessário desenvolver uma estratégia para estimular esse fluxo de maneira semelhante ao EFA em cultura de células musculares. É sabido que durante o EFA ocorre acentuado aumento da concentração de cálcio (Ca^{2+}) citosólico, este necessário para a contração muscular, mas que paralelamente leva à ativação de diversas vias intracelulares envolvidas na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA (CHIN et al., 1998; ROSE et al., 2006). Deste modo, utilizamos a substância cafeína para promover liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (LAMB et al., 2001) e induzir ativação de AMPK via CAMKKβ, que por sua vez estimula a autofagia pela fosforilação e ativação da quinase ULK1 (GHISLAT et al., 2012) (Figura 6E). Observamos que o tratamento de mioblastos C2C12 com diferentes concentrações de cafeína

por 10 horas induziu aumento do número de autofagossomos (Figura 6F) e autolisossomos (Figura 6G), evidenciando a capacidade da cafeína de induzir fluxo autofágico.

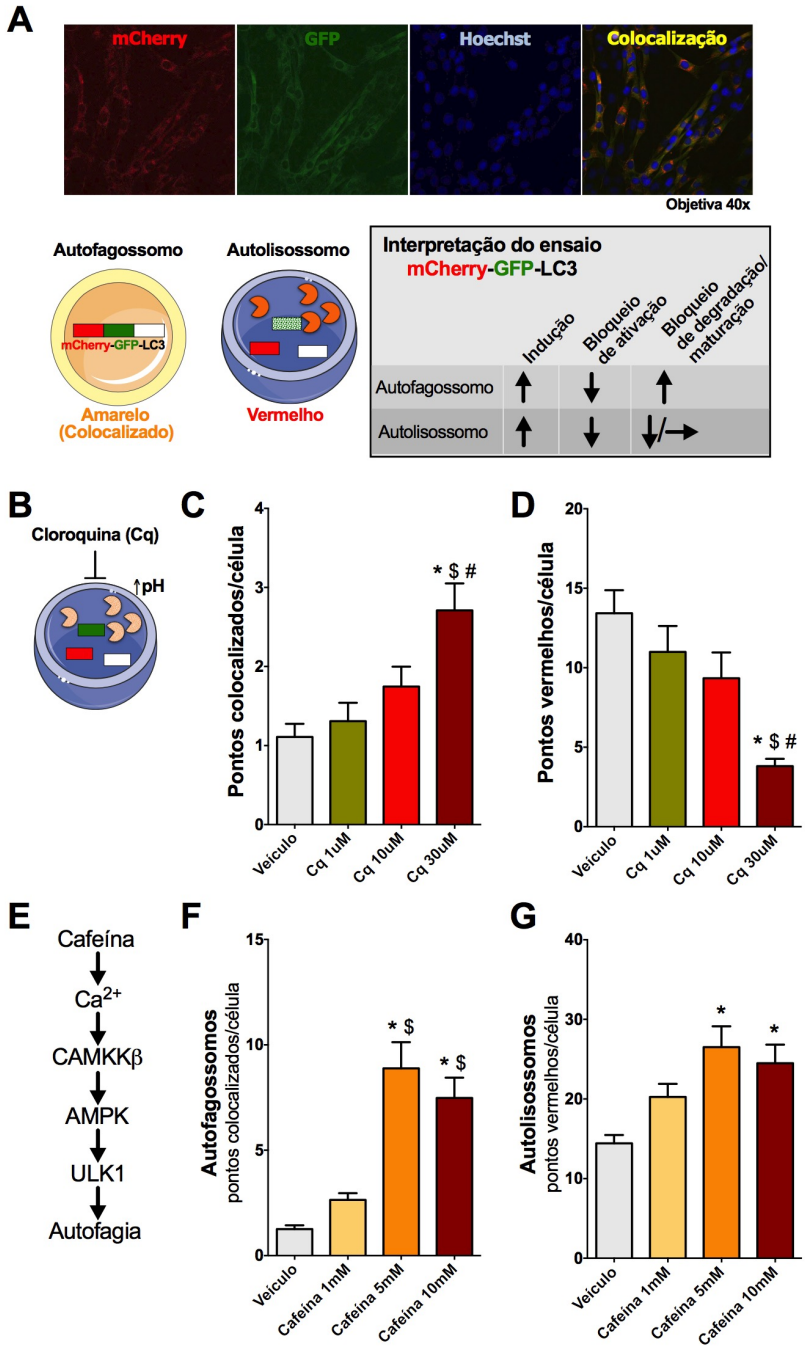

Figura 6 – Avaliação do fluxo autofágico em C2C12 expressando de forma estável mCherry-GFP-LC3. **(A)** A proteína recombinante mCherry-GFP-LC3 permite quantificar o número de autofagossomos (Colocalização de pontos vermelhos e verdes, resultando em pontos amarelos), e autolisossomos (pontos apenas vermelhos, já que a fluorescência de GFP foi extinta pelo pH ácido lisossomal). O aumento do fluxo autofágico é caracterizado pelo aumento do número de autofagossomos e autolisossomos. Quando há bloqueio na indução de formação de autofagossomos, observa-se diminuição tanto do número de autofagossomos como de autolisossomos. Já quando o bloqueio do fluxo autofágico é decorrente de diminuída degradação lisossomal ou defeito na maturação de autofagossomos em autolisossomos, há aumento do número de autofagossomos, com diminuição ou não alteração de autolissomos. **(B)**

Cloroquina (Cq) bloqueia o fluxo autofágico por inibir a degradação lisossomal por meio da modulação do pH da organela. **(C)** Pontos colocalizados (amarelos) por célula após tratamento com doses crescentes de Cq. **(D)** Pontos vermelhos por célula após tratamento com doses crescente de Cq. **(E)** Modelo para indução do fluxo autofágico por tratamento com cafeína. **(F)** Autofagossomos (pontos colocalizados, amarelos) por célula após tratamento com doses crescentes de Cafeína. **(G)** Autolisossomos (pontos vermelhos) por célula após tratamento com doses crescentes de Cafeína. Dados apresentados em média e erro padrão da média (150-300 células por condição). * $p<0.05$ *vs* Veículo; $ $p<0.05$ *vs* Cq 1uM/Cafeína 1mM; # $p<0.05$ *vs* Cq 10uM.

Demonstrado que o método de mCherry-GFP-LC3 é eficiente para avaliar o processo autofágico e que a cafeína é capaz de induzir aumento do fluxo autofágico em mioblastos C2C12, realizamos nessas mesmas células experimentos de silenciamento por transfecção de pequenos RNAs de interferência (siRNA) para genes *Phb2* (Figura 7A) e *Mief2* (Figura 7D) na presença ou ausência de tratamento com 5mM de cafeína por 10 horas.

De maneira contundente, o silenciamento de Phb2 promoveu acúmulo de autofagossomos (Figura 7B) sem alteração no número de autolisossomos, caracterizando uma redução no fluxo autofágico basal. Essa redução foi ainda mais acentuada ao tratamento das células com cafeína, ocorrendo aumento adicional de autofagossomos (Figura 7B) e o completo bloqueio no aumento de autolisossomos (Figura 7C).

Por sua vez, o silenciamento de *Mief2* não alterou o fluxo autofágico basal, ou seja, não alterou o número de autofagossomos (Figura 7E) e autolisossomos (Figura 7F). Contudo, o silenciamento de *Mief2* promoveu bloqueio parcial do fluxo autofágico mediado pela cafeína, visto o aumento do número de autofagossomos (Figura 7E) não acompanhado por aumento significativo de autolisossomos (Figura 7F).

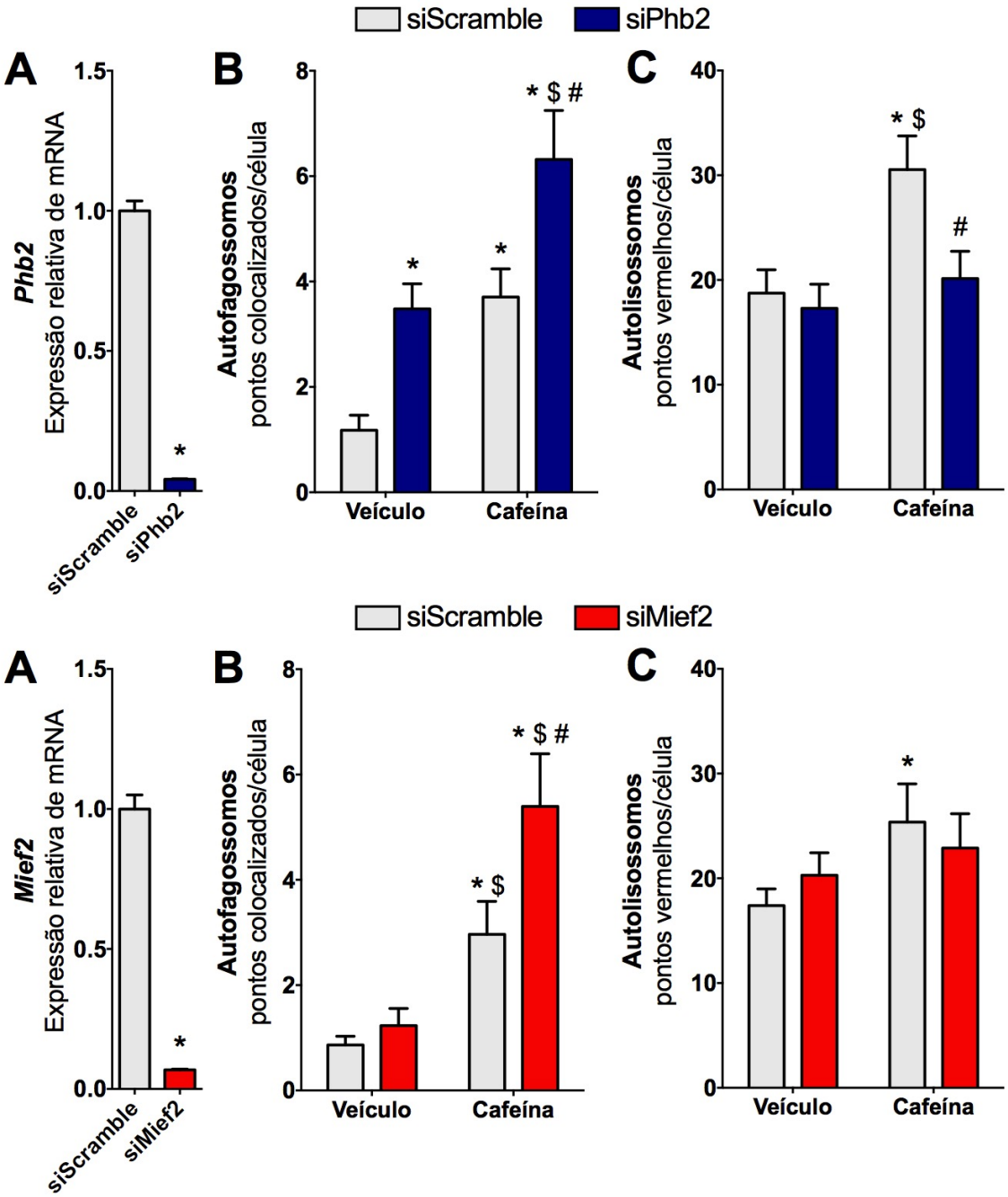

Figura 7 – Participação das proteínas Mief2 e Phb2 no fluxo autofágico induzido por cafeína em células C2C12. **(A)** Eficácia do silenciamento da expressão gênica após transfecção de siRNA contra *Phb2*. **(B)** Autofagossomos (pontos colocalizados, amarelos) por célula após silenciamento de *Phb2* e tratamento com 5mM de Cafeína. **(C)** Autolisossomos (pontos vermelhos) por célula após silenciamento de *Phb2* e tratamento com 5mM de Cafeína. **(D)** Eficácia do silenciamento da expressão gênica após transfecção de siRNA contra *Mief2*. **(E)** Autofagossomos (pontos colocalizados, amarelos) por célula após silenciamento de *Mief2* e tratamento com 5mM de Cafeína. **(F)** Autolisossomos (pontos vermelhos) por célula após silenciamento de *Phb2* e tratamento com 5mM de Cafeína. Dados apresentados em média e erro padrão da média (150-300 células por condição). * $p<0.05$ *vs* siScramble-Veículo; $ $p<0.05$ *vs* siPhb2/siMief2-Veículo; # $p<0.05$ *vs* siScramble-Cafeína.

Cabe salientar que o ensaio utilizando mCherry-GFP-LC3 representa a avaliação de todo o fluxo autofágico, não apenas da mitofagia seletiva. Portanto, o acúmulo de autofagossomos na ausência de Phb2 ou Mief2 pode ser resultado de aumento de autofagia não-seletiva em resposta ao acúmulo de mitocôndrias danificadas, como observado na inibição da fissão mitocondrial por silenciamento de Drp1 (PARONE et al., 2008). Ensaios avaliando a produção de ERO e o tratamento dessas células com antioxidantes poderiam auxiliar na compreensão desses resultados. No entanto, é nítido que na ausência de Phb2 esses autofagossomos não estão atingindo os lisossomos, vide a ausência de aumento no número de autolisossomos no estado basal ou estimulado por cafeína. Algumas possíveis explicações poderiam incluir um papel de Phb2 na maturação das vesículas mitofágicas, no transporte dos autofagossomos aos lisossomos ou ainda na fusão autofagossomo-lisossomo. Alternativamente, Wei et al. (2017) observaram que a formação de autolisossomos continuava intacta após silenciamento de *Phb2*, mas continham outros conteúdos que não mitocôndrias. Notaram ainda que mesmo com silenciamento de *Phb2*, havia pontos de LC3 próximos às mitocôndrias danificadas, indicando que a ausência de Phb2 não impede estágios da mitofagia anteriores ao recrutamento da membrana autofágica. De certa forma, isso poderia explicar o acúmulo de "autofagossomos" que observamos após silenciamento de *Phb2* em mioblastos C2C12, uma vez que o excesso de LC3 na proximidade das mitocôndrias poderiam formar pontos semelhantes à autofagossomos.

No modelo clássico de controle de qualidade mitocondrial induzido por mitofagia, a porção danificada da mitocôndria é segregada por fissão, formando uma mitocôndria com tamanho reduzido, que só então é ser reconhecida pela maquinaria autofágica e degradada via mitofagia (TWIG et al., 2008; TWIG; SHIRIHAI, 2011). Esse modelo é ainda muito aceito, já que mitocôndrias menores são mais facilmente englobadas pela vesícula autofágica em razão do tamanho limitado dos autofagossomos (TWIG et al., 2008; MAO et al., 2013). No entanto, Yamashita et al. (2016) recentemente questionaram o modelo clássico ao observarem que: a mitofagia induzida por hipóxia ou deferiprona (quelante de ferro), acontece de maneira independente de Drp1; a fragmentação mitocondrial não facilita a mitofagia; e células com deleção de Drp1 ainda apresentam pequenas mitocôndrias dentro de autofagossomos. Após uma longa série de experimentos, Yamashita et al. (2016) propuseram dois modelos para a segregação dessas pequenas mitocôndrias: 1) a própria membrana do fagóforo em expansão constringe e fissiona por força física uma porção da mitocôndria; ou 2) uma proteína desconhecida promove a divisão da mitocôndria no local de fechamento da membrana de isolamento. Num primeiro olhar, Mief2 poderia se encaixar neste segundo modelo. De fato, no

mesmo trabalho em que propuseram os novos modelos, Yamashita et al. (2016) avaliaram a mitofagia induzida por hipóxia ou deferiprona em células com deleção de Mief1/Mief2, onde concluíram que a mitofagia acontece normalmente na ausência dessas proteínas. Contudo, um olhar mais atento aos resultados por eles apresentados notaria que a deleção de Mief1/Mief2 promove ligeira redução na mitofagia induzida por deferiprona. Esses resultados suportam o papel de Mief2 como receptor mitofágico e um possível envolvimento na mitofagia induzida pelo EFA na musculatura esquelética.

Dado que o silenciamento de Phb2 e Mief2 promoveu acúmulo de autofagossomos, sem concomitante aumento de autolisossomos, não podemos descartar a possibilidade dessas proteínas regularem direta ou indiretamente a atividade de Rab GTPases, como a Rab7 (YAMANO et al., 2014), auxiliando assim na maturação dos autofagossomos.

3.2.1 O que descobrimos sobre a mitofagia induzida pelo exercício físico aeróbio?

Neste primeiro estudo, nosso objetivo foi buscar por novos mecanismos que possam estar envolvidos na mitofagia induzida pelo EFA. Nesse sentido, caracterizamos inicialmente o comportamento transcricional de genes relacionados à autofagia e à mitofagia na musculatura esquelética de camundongos após EFA agudo e período de treinamento físico. Verificamos que apenas o EFA agudo aumentou a expressão de diversos desses genes, ao passo que camundongos fisicamente ativos não apresentaram alterações significativas. Ainda, observamos que proteínas envolvidas na maquinaria autofágica não apresentaram mudança de expressão quando analisadas em lisado muscular total em um curso temporal de até 24 horas após o EFA. Por outro lado, a análise dessas proteínas na fração mitocondrial muscular revelou acúmulo do marcador autofágico LC3 imediatamente e 12 horas após a sessão de EFA. A translocação de LC3 para a fração mitocondrial 12 horas após o EFA pode ser explicada pelo concomitante aumento da p62, proteína que interage com LC3 e induz mitofagia (PANKIV et al., 2007). Contudo, a presença de LC3 na fração mitocondrial muscular imediatamente após o EFA não parece ser explicada por p62 ou Bnip3, outras proteínas conhecidas por interagir com LC3, sugerindo a existência de outra proteína que sirva como receptor para LC3 e induza a mitofagia durante o EFA.

Dado o interesse na identificação de proteínas envolvidas no recrutamento de LC3 e da maquinaria autofágica para mitocôndrias disfuncionais durante o EFA, utilizamos nossos dados de proteoma mitocondrial muscular após o EFA em camundongos para buscar por receptores mitofágicos conhecidos ou preditos que pudessem explicar tal fenômeno. A interação de

determinada proteína com LC3 acontece por um motivo já bem descrito na literatura, chamado de LIR (BIRGISDOTTIR et al., 2013). Associando análise de bioinformática e extensa busca na literatura, identificamos as proteínas Mief2 (conhecida também com MiD49) e *Prohibitin 2* (Phb2) como possíveis alvos envolvidos no recrutamento de LC3 para a mitocôndria durante o EFA. Mief2 foi identificada pelo software iLIR (KALVARI et al., 2014), o qual previu na estrutura da proteína, a existência de um motivo LIR. Já Phb2 apresenta motivo LIR recentemente validado e papel importante na degradação de mitocôndrias com lesão na membrana externa (WEI et al., 2017). Nossas análises *in vitro* utilizando mioblastos C2C12 demonstraram que Phb2 parece ter papel importante na manutenção do fluxo autofágico basal e na maturação de autofagossomos em situação de fluxo autofágico estimulado por tratamento com cafeína. Ao passo que, nestas mesmas células, Mief2 parece não influenciar no fluxo autofágico basal, mas também parece ter participação na maturação de autofagossomos quando o fluxo autofágico é estimulado por cafeína.

Apesar de termos encontrado indícios para a participação das proteínas Phb2 e Mief2 na indução da mitofagia induzida pelo EFA, ainda são necessários experimentos adicionais para confirmação de tal hipótese. Ainda *in vitro*, experimentos de perda de função dessas proteínas com concomitante avaliação do conteúdo mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial auxiliariam na compreensão dos resultados de fluxo autofágico aqui obtidos. Além disso, e especialmente no caso de Mief2, experimentos de mutagênese sítio-direcionada para perda de função dos motivos LIR e coimunoprecipitação de Phb2/Mief2 e LC3, determinariam o real envolvido dessas proteínas na indução de mitofagia. Observamos que ambas as proteínas se encontravam aumentadas na fração mitocondrial imediatamente após o EFA, mas resta a dúvida do seu comportamento no curso temporal de recuperação da sessão de EFA. Outro grande desafio seria a realização de experimentos de perda de função *in vivo* dessas proteínas, especialmente sob condição de EFA. Caso se confirme o envolvimento dessas proteínas na mitofagia induzida pelo EFA, experimentos de ganho de função seriam necessários para apresentar o papel terapêutico desses alvos. De fato, o desenvolvimento de estratégias para maximizar a mitofagia muscular induzida por estresse poderia auxiliar no controle de qualidade mitocondrial e no tratamento e/ou prevenção de doenças crônico-degenerativas e envelhecimento.

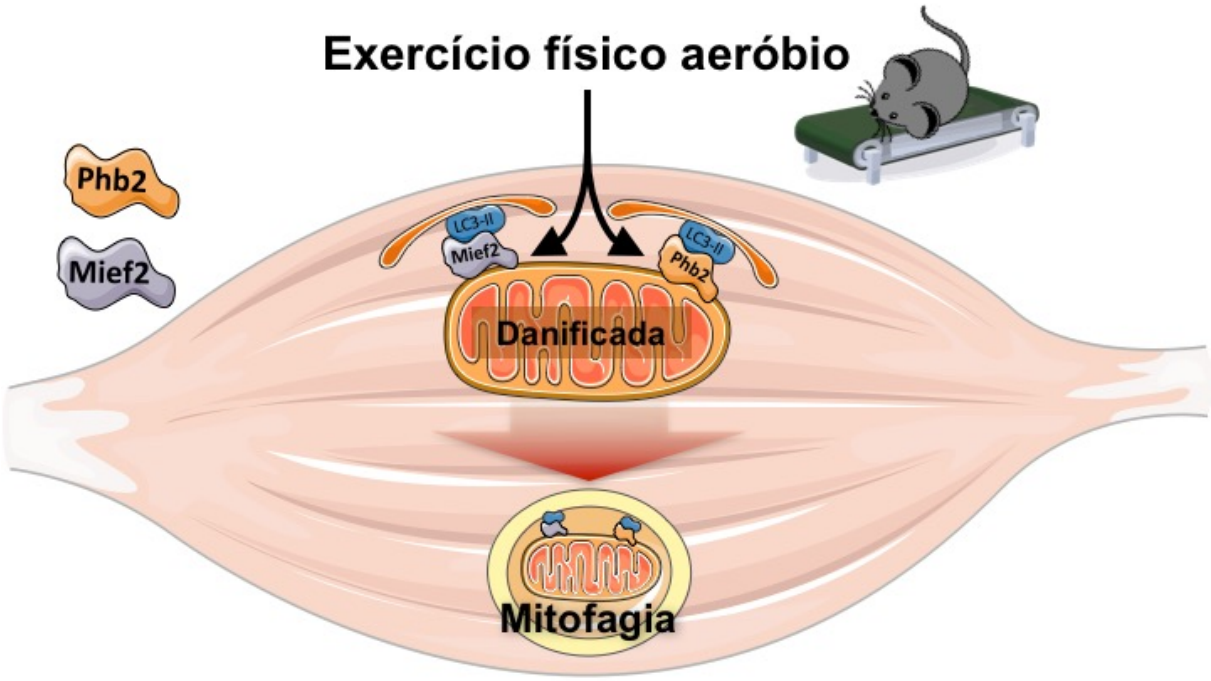

Figura 8 – Modelo proposto para possível função de Phb2 e Mief2 na mitofagia muscular induzida pelo exercício físico aeróbio.

3.3 Identificação de reguladores de transcrição gênica na adaptação mitocondrial induzida pelo exercício físico aeróbio

As mitocôndrias são compostas por proteínas codificadas tanto por genes nucleares como mitocondriais, assim, a expressão orquestrada de tais genes é necessária para o remodelamento e adaptação dessas organelas frente à diversos distúrbios homeostáticos (QUIRÓS et al., 2016). No contexto da adaptação mitocondrial induzida pelo EFA, PGC-1α continua a ser o principal mediador das respostas transcricionais impostas no núcleo e nas mitocôndrias. Uma sessão de EFA induz translocação de PGC-1α tanto para o núcleo (WRIGHT et al., 2007), como para a mitocôndria (SAFDAR et al., 2011); no núcleo, induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e glicose, na ETC, no TCA e outros; na mitocôndria, atua em conjunto de Tfam na expressão e replicação do mtDNA. No entanto, animais MKO-PGC-1α submetidos ao treinamento físico aeróbio ainda apresentam adaptação mitocondrial importante (GENG et al., 2010; ROWE et al., 2012), isso evidencia a existência de outras vias reguladas pelo EFA que melhoram a função mitocondrial.

Nesse sentido, decidimos procurar por reguladores de transcrição gênica que possam estar envolvidos na comunicação mitocôndria-núcleo e nas respostas adaptativas induzidas pelo EFA. Para tanto, cruzamos a lista de proteínas identificadas em nossa análise proteômica com

a MitoCarta2.0 de camundongos (CALVO et al., 2016). A MitoCarta2.0 consiste de 1158 proteínas que representam o proteoma mitocondrial de camundongos validado por múltiplas abordagens experimentais e computacionais (CALVO et al., 2016). Ao cruzar as listas, verificamos que 776 das 2639 proteínas presentes em nossa análise proteômica são reconhecidamente parte do proteoma mitocondrial (Figura 9A), sendo que dentre as diferencialmente expressas, 137 estão significativamente aumentadas após o EFA e apenas uma (Dnm1l, ou Drp1) está significativamente diminuída (Figura 9B). De maneira impressionante, a Figura 9A demonstra o evidente deslocamento para a direita da maioria das proteínas parte da MitoCarta2.0 (destacadas em vermelho ou verde), um nítido sinal de biogênese mitocondrial ainda durante o EFA. Considerando que este é um efeito imediato da sessão de EFA, não é possível afirmar se esse aumento já é consequência de maior expressão desses genes. No entanto, utilizando protocolo de EFA em camundongos muito similar ao nosso, Sako et al. (2016) demonstraram que uma sessão de EFA induz na musculatura esquelética mudanças na tradução de mRNA mais pronunciadas que àquelas encontradas no nível transcricional. Ainda, Wilkinson et al. (2008) demonstraram em humanos que a taxa de síntese proteica mitocondrial muscular está aumentada até pelo menos 4 horas após uma sessão de EFA. Assim, supomos que o enriquecimento de proteínas mitocondriais imediatamente após o EFA decorra de aumento na taxa de tradução de mRNA e síntese proteica.

Em seguida, utilizamos uma lista de reguladores de transcrição gênica, contendo fatores de transcrição, coativadores, corepressores, enzimas modificadoras de histonas e outras proteínas que apresentam algum indício de participação em respostas transcricionais (GUPTA et al., 2010). Ao buscarmos por reguladores de transcrição nos dados de proteômica mitocondrial encontramos 67 proteínas, das quais 17 estão significativamente diminuídas (Aip, Bzw2, Cops2, Cops3, Cops4, Eif3f, Eif3h, Fhl1, Kcmf1, Lims1, Ndrg1, Nrap, Otub1, Pdlim3, Rufy1, Stat3 e Stat5b) e apenas duas significativamente aumentadas (Tfam e Spryd4). Curiosamente, Tfam e Spryd4 foram os únicos reguladores de transcrição identificados que também fazem parte da MitoCarta2.0 (Figura 9B). Para este estudo, decidimos dirigir as análises para os reguladores transcricionais enriquecidos na mitocôndria durante o EFA. No entanto, é de grande interesse a investigação dessas 17 proteínas que apresentaram redução na fração mitocondrial após o EFA, uma vez que podem representar uma comunicação retrógrada da mitocôndria para o núcleo.

Tfam é um fator de transcrição amplamente investigado na literatura e já identificado como um componente essencial para a replicação e transcrição do mtDNA (HOOD, 2001). Além disso, já foi bem demonstrado que uma sessão de EFA induz considerável aumento da

expressão de Tfam (SAFDAR et al., 2011) e que contração muscular *per se* induz a aumento da importação de Tfam para a mitocôndria (GORDON et al., 2001). O fato de termos observado a proteína Tfam aumentada na fração mitocondrial muscular após uma sessão de EFA reforça que a estratégia escolhida neste estudo pode auxiliar na identificação de novos reguladores de transcrição.

Por outro lado, Spryd4 (*SPRY domain-containing protein 4*) é uma proteína de função desconhecida. Até então, apenas um trabalho explorou especificamente a Spryd4 (ZHONG et al., 2008), onde gene o codificante desta proteína foi clonado pela primeira vez, demonstrando ainda que é ubiquamente expresso em 18 tecidos humanos e que a proteína apresenta localização nuclear após superexpressão em células COS-7 (ZHONG et al., 2008). O gene *Spryd4* possui dois exons que codificam uma proteína de 207 aminoácidos (Figura 9C). Como o próprio nome demonstra, Spryd4 possui um domínio denominado B30.2/SPRY, o qual parece funcionar como um módulo para interação de proteínas (D'CRUZ et al., 2013). De fato, a presença de Spryd4 na lista de possíveis reguladores transcricionais proposta por Gupta et al (GUPTA et al., 2010) se deve à sua presença nuclear e potencial função como mediadora de interação entre proteínas. A localização mitocondrial dessa proteína se deve à existência de um peptídeo sinal para mitocôndria (PSM) nos 13 primeiros aminoácidos de sua porção N-terminal (identificado pelo servidor TargetP 1.1). Além disso, ao explorar os dados sobre a Spryd4 na MitoCarta2.0, nota-se provável localização na matriz das mitocôndrias em menos 14 tecidos de humanos e camundongos (CALVO et al., 2016).

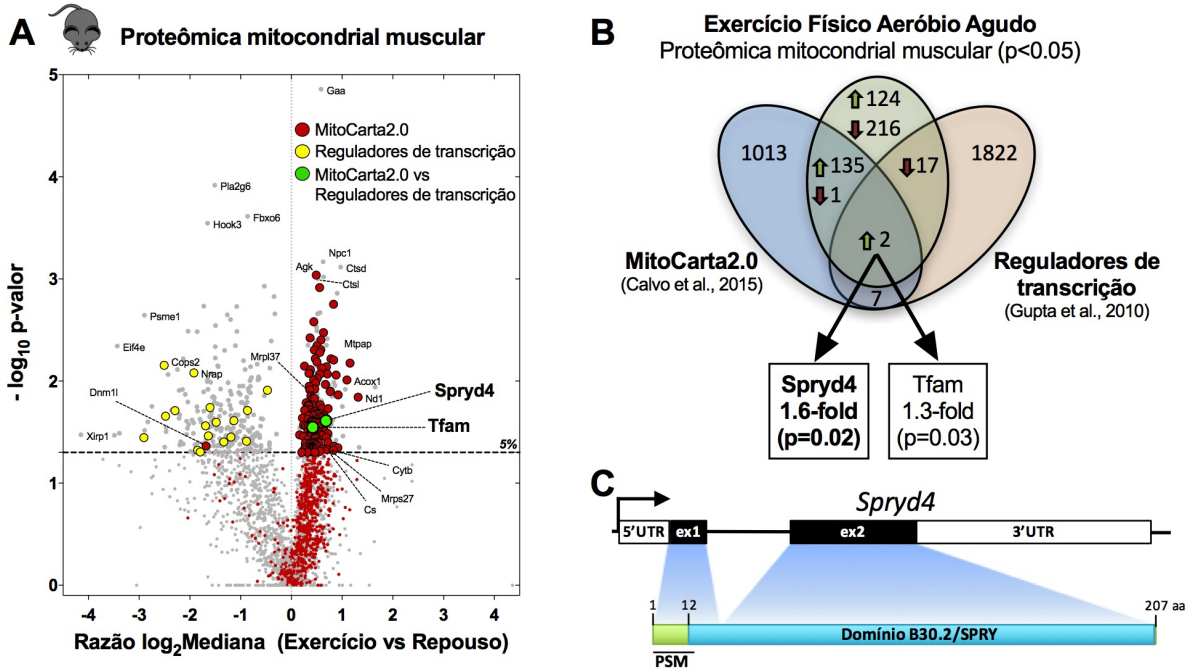

Figura 9 – Spryd4 está enriquecida na fração mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio (EFA). **(A)** *Volcano plot* apresentando os valores de $\log_2$ da mediana de mudança das proteínas encontradas na fração mitocondrial muscular após o EFA, registrados em função dos valores de -log10 de p-valor. Destaque para as proteínas presentes na MitoCarta2.0 e na lista de Reguladores de Transcrição. A linha pontilhada horizontal indica o limiar de significância estatística (5%, $p<0,05$, $-\log_{10}=1,3$). **(B)** Diagrama de Venn apresentando as proteínas em comum entre a proteômica mitocondrial muscular após o EFA (apenas com $p<0,05$), a MitoCarta2.0 e as listas de regulares de transcrição. As setas verdes indicam aumento de expressão e as vermelhas diminuição. **(C)** Esquema representativo do gene da Spryd4 e da proteína por ele codificada. PSM, peptídeo sinal para mitocôndria.

Considerando a escassez de informações sobre a função da Spryd4 e os indícios de localização mitocondrial e nuclear, ponderamos esta proteína como um interessante alvo a ser explorado no contexto da adaptação mitocondrial induzida pelo EFA.

Para ampliar a compreensão do contexto em que Spryd4 é expressa, utilizamos um banco de dados online desenvolvido para o estudo de genética de sistemas (www.genenetwork.org), onde é possível correlacionar em larga escala a expressão de milhares de genes em diversos tecidos provenientes de um extenso painel de linhagens de camundongos isogênicos (linhagens BXD) (ANDREUX et al., 2012). Essas linhagens foram geradas a partir do cruzamento de duas linhagens de camundongos progenitoras, C57BL/6J e DBA/2J, e do subsequente cruzamento consanguíneo entre as proles. Após inúmeras gerações de seleção artificial, cada linhagem representa um genótipo distinto dentro de uma linhagem isogênica. Em nossa análise, utilizamos como base a expressão gênica de *Spryd4* no músculo quadríceps de 42 diferentes linhagens de camundongos BXD (Figura 10A), correlacionando os níveis de expressão gênica de *Spryd4* com a expressão de todos os outros genes avaliados nesses

músculos. Após determinar pontos de corte para o coeficiente de Pearson (r>0,45) e para o nível de significância (p<0,001), submetemos os genes que apresentaram correlação positiva ou negativa com *Spryd4* a uma análise de ontologia gênica por meio da ferramenta DAVID (HUANG DA et al., 2009). Na tabela 2 estão as 10 anotações funcionais com maior nível de enriquecimento para os genes que se correlacionam positivamente com *Spryd4*. Na tabela 3 estão as anotações funcionais significantes (FDR<0,05) para os genes correlacionados negativamente com *Spryd4*. Com base nessa análise, fica evidente a associação direta da expressão de *Spryd4* com anotações funcionais relacionadas à função e estrutura de mitocôndrias.

Tabela 2 – Anotação funcional no DAVID para genes apresentando correlação positiva com a expressão gênica de *Spryd4* na musculatura esquelética de diferentes linhagens BXD.

Categoria	Termo	# de genes	Enriquecimento	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0045333~cellular respiration	10	9,6	1E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0006119~oxidative phosphorylation	9	9,1	9E-03
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion outer membrane	9	7,3	4E-02
GOTERM_CC_FAT	GO:0031968~organelle outer membrane	11	6,2	1E-02
KEGG_PATHWAY	mmu00190:Oxidative phosphorylation	14	6,1	3E-04
GOTERM_CC_FAT	GO:0019867~outer membrane	11	6,0	2E-02
KEGG_PATHWAY	mmu05012:Parkinson's disease	12	5,1	2E-02
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion inner membrane	16	4,9	1E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0031980~mitochondrial lumen	15	4,5	7E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0005759~mitochondrial matrix	15	4,5	7E-03

FDR, *False Discovery Rate*.

Tabela 3 – Anotação funcional no DAVID para genes apresentando correlação negativa com a expressão gênica de *Spryd4* na musculatura esquelética de diferentes linhagens BXD.

Categoria	Termo	# de genes	Enriquecimento	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	phosphoprotein	121	1,6	2E-06
SP_PIR_KEYWORDS	coiled coil	46	2,2	1E-03
SP_PIR_KEYWORDS	cytoplasm	64	1,7	1E-02
SP_PIR_KEYWORDS	isopeptide bond	14	4,1	5E-02

FDR, *False Discovery Rate*.

Percorrendo a lista de genes correlacionados com Spryd4, observamos algumas relações que merecem destaque (Figura 10A). Os níveis de mRNA de *Spryd4* se correlacionam positivamente com a expressão de Citocromo B (*CytB*) e Citocromo C oxidase subunidade 4 isoforma 1 (*Cox4i1*), componentes dos complexos mitocondriais III e IV e codificados nos genomas mitocondrial e nuclear, respectivamente. Correlação positiva também é observada com uma enzima chave no TCA, Citrato sintase (*Cs*), e com proteínas envolvidas no processo

de tradução e síntese de proteínas mitocondriais, *Tufm* (*Elongation factor Tu, mitochondrial*), *Mrps27* (*28S ribosomal protein S27, mitochondrial*) e *Mrpl38* (*39S ribosomal protein L38, mitochondrial*). Considerando os resultados obtidos por meio de banco de dados publicamente disponíveis, fica clara a relação entre os níveis de expressão de *Spryd4* e a expressão de genes relacionados à mitocôndria.

A seguir, investigamos o perfil de expressão de *Spryd4* em diferentes tecidos e tipos de músculos esqueléticos. Para isso, analisamos em camundongos a expressão relativa do mRNA de *Spryd4* no pulmão, tecido adiposo branco visceral epididimal (eWAT), tecido adiposo branco subcutâneo inguinal (iWAT), tecido adiposo marrom interescapular (BAT) e fígado, e nos músculos esqueléticos sóleo, gastrocnêmio, tibial anterior (TA) e extensor longo dos dedos (EDL) (Figura 10B). Observamos que o músculo EDL apresenta maior expressão de *Spryd4* em relação aos demais tecidos. Destacamos ainda que entre os músculos esqueléticos, parece haver uma associação negativa entre a capacidade oxidativa do músculo, aqui determinada pela expressão de *Myh7* (miosina de cadeia pesada do tipo I), e a expressão de *Spryd4*. Tal relação foi inesperada, uma vez que os resultados obtidos nas linhagens BXD indicam uma associação positiva entre o conteúdo mitocondrial e a expressão de *Spryd4*. Por outro lado, essa associação positiva parece existir em tecidos adiposos, uma vez que observamos maior expressão de *Spryd4* no BAT, depósito com elevado conteúdo mitocondrial (CANNON; NEDERGAARD, 2004), em relação a eWAT e iWAT. Todavia, não houve diferença estatística entre eWAT e iWAT, apesar de evidências apontarem que o último possui maior conteúdo mitocondrial em relação ao primeiro (DEVEAUD et al., 2004).

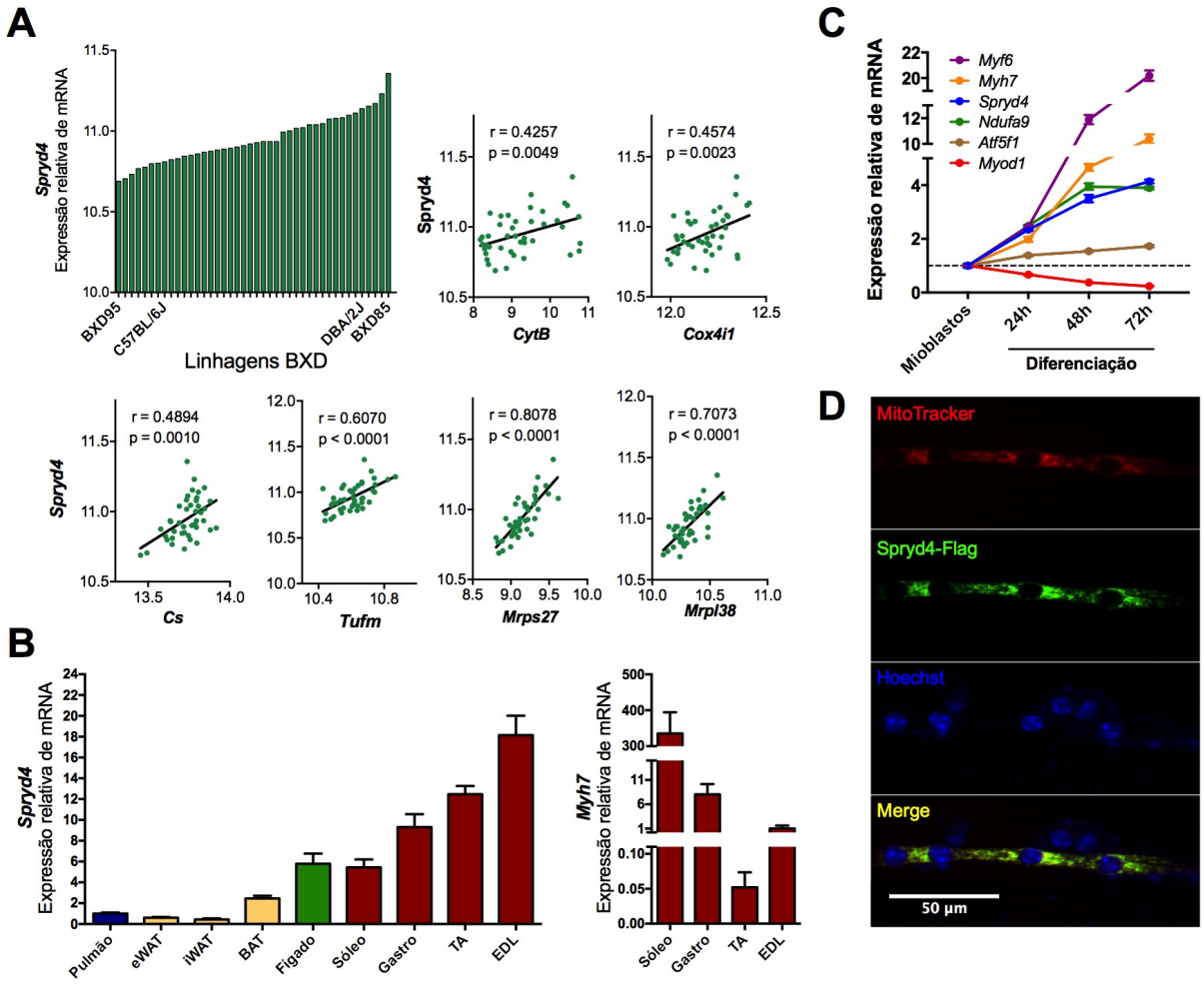

Figura 10 – Spryd4 apresenta associação positiva com diversos genes relacionados à mitocôndria. **(A)** Expressão de *Spryd4* no músculo quadríceps de 42 linhagens de camundongos BXD. Cada barra representa os níveis de mRNA em cada uma das linhagens, destacando as linhagens extremas (BXD95 e BXD85) e progenitoras (C57BL/6J e DBA/2J). Painéis de correlação: dados de microarray das 42 lianhagens foram utilizados para calcular as correlações entre os níveis musculares de mRNA de *Spryd4* e citocromo B (*CytB*), *Cox4i1*, citrato sintase (*Cs*), *elongation factor Tu, mitochondrial* (*Tufm*), *28S ribosomal protein S27 mitochondrial* (*Mrps27*), e *39S ribosomal protein L38 mitochondrial* (*Mrpl38*). O teste de Pearson foi utilizado para calcular as correlações. **(B)** Painel esquerdo: Expressão gênica de Spryd4 em diferentes tecidos de camundongos: pulmão; tecido adiposo branco visceral epididimal (eWAT); tecido adiposo branco subcutâneo inguinal (iWAT); tecido adiposo marrom interescapular (BAT) e fígado; e nos músculos esqueléticos sóleo; gastrocnêmio (Gastro); tibial anterior (TA); e extensor longo dos dedos (EDL). Painel direito: Expressão de *Myh7* (miosina de cadeia pesada do tipo I, contração lenta, oxidativa) em diferentes músculos. Foram utilizados os tecidos de 5 animais. **(C)** Expressão gênica de *Spryd4*, *Ndufa9*, *Atp5f1*, *Myh7*, *Myf6* e *Myod1* em mioblastos primários de camundongos e após 24, 48 e 72 horas de início da diferenciação em miotubos. **(D)** Localização subcelular de Spryd4 em miotubos primários de camundongos. Mitocôndrias em vermelho, MitoTracker Deep Red; Spryd4-Flag em verde; núcleos em azul, Hoechst; Merge, painel de colocalização. Dados apresentados em média e erro padrão da média.

O processo de diferenciação celular de mioblastos em miotubos promove extenso remodelamento da rede mitocondrial, marcado por elevada biogênese mitocondrial (LEARY et al., 1998; REMELS et al., 2010). Nesse sentido, utilizamos mioblastos primários de camundongos para avaliar a expressão de *Spryd4* durante o processo de diferenciação em miotubos. Verificamos um aumento progressivo da sua expressão paralelo ao aumento da expressão dos genes *Atf5f1* e *Ndufa9*, componentes da cadeia de transporte de elétrons (Figura 10C).

Como já mencionado, Spryd4 é anotada como uma proteína presente tanto no núcleo como na mitocôndria. Para testar tal anotação, transfectamos em miotubos primários de camundongos um plasmídeo que expressa Spryd4 recombinante com as *tags* Myc e Flag no C-terminal (pCMV-Spryd4-Myc-Flag). Após 48h de transfecção, as mitocôndrias foram marcadas com sonda fluorescente (MitoTracker Deep Red FM), as células foram fixadas e Spryd4 foi detectada por imunomarcação utilizando anticorpo para Flag. Os núcleos foram identificados por marcação com Hoechst. Observamos que, diferente do esperado, em miotubos primários de camundongos, a Spryd4 está localizada apenas nas mitocôndrias, sem aparente indício de presença nuclear (Figura 10D). Retornando ao trabalho de Zhong et al. (2008), o qual demonstrou presença nuclear de Spryd4, notamos que a *tag* Myc foi inserida no N-terminal de Spryd4, o que pode ter anulado o peptídeo sinal para mitocôndria localizado nessa região. De fato, a ausência de Spryd4 no núcleo diminui a possibilidade dessa proteína estar envolvida na comunicação mitocondrial-núcleo, como inicialmente esperado. No entanto, isso não exclui possível importância no processo de adaptação mitocondrial induzido pelo EFA, uma vez que pode atuar na regulação de processos metabólicos que acontecem na matriz mitocondrial, ou ainda no controle da transcrição de genes codificados no mtDNA.

Inúmeras condições fisiológicas e patológicas afetam a estrutura e função mitocondrial na musculatura esquelética. Assim, investigamos a expressão gênica muscular de *Spryd4* no músculos gastrocnêmio ou quadríceps de camundongos nas seguintes condições: 1) deleção muscular de PGC-1α (WT vs. MKO-PGC-1α); 2) envelhecimento (7 semanas vs. 24 meses de idade); 3) distrofia muscular (WT vs. *Beta-Sarcoglycan-null*); 4) sessão aguda de EFA (Repouso vs. Imediatamente após vs. 3h, 6h, 12h e 24h de recuperação); e 5) oito semanas de exposição à roda de atividade física espontânea (Sedentário vs. Ativo). Observamos que tanto no envelhecimento (Figura 11B) como em modelo de distrofia muscular (Figura 11C) ocorre redução da expressão gênica de *Spryd4*, ao passo que estes genes parecem não ser modulados em camundongos com deleção muscular de PGC-1α (Figura 11A) ou após uma sessão aguda

de EFA (Figura 11D). De maneira interessante, camundongos ativos apresentaram maior expressão gênica muscular de Spryd4 em relação à sedentários (Figuras 9E).

Para verificar se o aumento da expressão gênica muscular de *Spryd4* após período de treinamento físico aeróbio também acontece em humanos, utilizamos dados de expressão gênica em larga escala previamente depositados no *GEO Datasets* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds). Explorando oito *datasets* que realizaram período prolongado de treinamento físico aeróbio em diferentes populações de humanos (LANZA et al., 2008; ENGELI et al., 2012; LAMMERS et al., 2012; CATOIRE et al., 2014; HUFFMAN et al., 2014; LINDHOLM et al., 2014; LINDSKOG et al., 2015), verificamos que *SPRYD4* está mais expressa na musculatura esquelética em metade dos *datasets* analisados (Figura 11F). Apesar de cuidadosa comparação entre os estudos analisados, não conseguimos encontrar um padrão entre eles que pudesse explicar a diferença de resposta na expressão de *SPRYD4*.

Por fim, utilizamos os dados de proteômica gerados por Murgia et al. (2017) para analisar a expressão proteica de SPRYD4 em fibras musculares isoladas de humanos jovens e idosos (Figura 11G). Concordando com nossos dados de maior expressão de *Spryd4* no músculo EDL de camundongos, verificamos que fibras musculares do Tipo IIA apresentaram maior expressão proteica de SPRYD4 quando comparadas com fibras do Tipo I de humanos jovens. Ainda, a expressão de SPRYD4 reduziu com o envelhecimento apenas nas fibras do Tipo IIA, passando a expressar níveis similares às fibras do Tipo I.

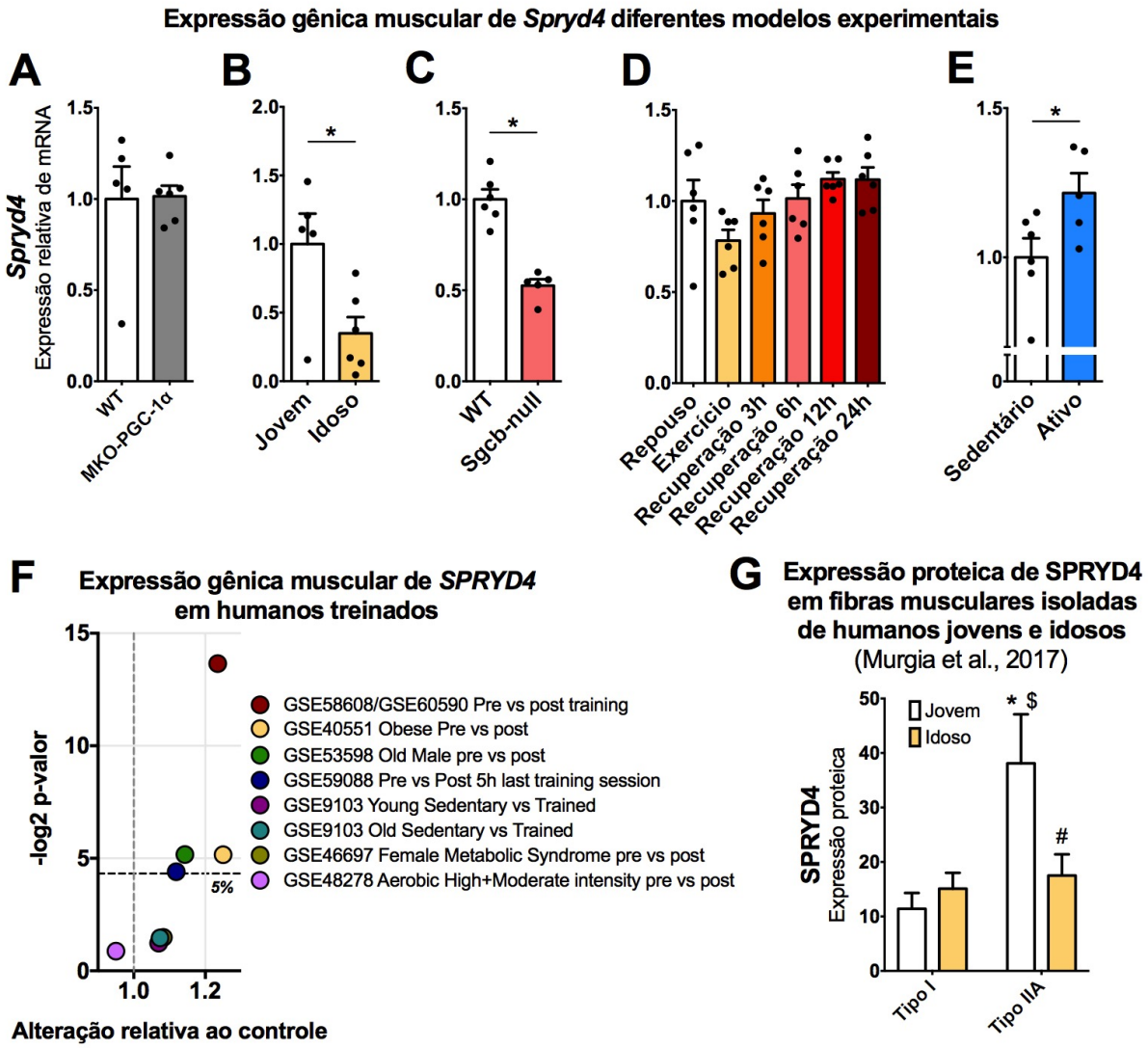

Figura 11 – Expressão gênica muscular de *Spryd4* em diferentes condições experimentais. **(A)** Expressão gênica de *Spryd4* no gastrocnêmio de camundongos controle (WT, *wild type*) e com deleção muscular de PGC-1α (MKO-PGC-1α); **(B)** Expressão gênica de *Spryd4* no gastrocnêmio de camundongos com 2 (Jovem) e 24 (Idoso) meses de idade. **(C)** Expressão gênica de *Spryd4* no quadríceps de camundongos com distrofia muscular (WT, Controle; Sgcb-null, deleção de beta-sarcoglicano). **(D)** Expressão gênica de *Spryd4* no quadríceps de camundongos em repouso, imediatamente após uma sessão de 80 min de EFA (Exercício) ou após recuperação de 3, 6, 12 e 24 horas da sessão de EFA. **(E)** Expressão gênica de *Spryd4* no músculo gastrocnêmio de camundongos em sedentários ou expostos por 8 semanas à rodas de atividade física espontânea (Ativo). Em A-E, dados apresentados em média e erro padrão da média. * $p<0.05$ entre os grupos. **(F)** Expressão gênica de *SPRYD4* no músculo esquelético de humanos após treinamento físico aeróbio. Dados publicados no GEO Datasets. 5%, $p<0,05$, -$\log_{10}=1,3$. **(G)** Expressão proteica de SPRYD4 em fibras musculares do Tipo I ou IIA isoladas de humanos jovens e idosos. Dados extraídos de análise proteômica realizada por Murgia et al. (2017). Dados apresentados em mediana e erro padrão da média. * $p<0.05$ *vs* Tipo I-Jovem; $ $p<0.05$ *vs* Tipo I-Idoso; # $p<0.05$ *vs* Tipo IIA-Jovem.

Estes resultados reforçam a hipótese de que Spryd4 está envolvida na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA, uma vez que condições de envelhecimento e distrofia

(KUZNETSOV et al., 1998) estão associadas à disfunção mitocondrial (OWUSU-ANSAH et al., 2013), e que a prática regular EFA melhora consideravelmente a função destas organelas (HOOD, 2001; HOOD et al., 2016). Além disso, a ausência de mudança de Spryd4 nos animais MKO-PGC-1α sugerem que sua expressão na musculatura esquelética não depende do coativador PGC-1α.

Na tentativa de traçar uma relação de causa e efeito entre *Spryd4* e o remodelamento e função mitocondrial, realizamos experimentos de perda de função deste gene em cultura primária de miotubos de camundongos. Para isso, transfectamos siRNA em miotubos primários complemente diferenciados para reduzir a expressão de *Spryd4*. Confirmando a eficácia do silenciamento, observamos uma redução de aproximadamente 95% na expressão de *Spryd4* após 48h da transfecção de siRNA para *Spryd4* (siSpryd4) quando comparado aos miotubos transfectados com siRNA controle (siScramble) (Figura 12A). Ao explorar o efeito do silenciamento de *Spryd4*, observamos redução da expressão de genes que compõem diversos complexos da cadeia de transporte de elétrons (Figura 12B), a saber: *Sdha* (Complexo II); *mt-Cytb* e *Cycs* (Complexo III); *Cox4i1* (Complexo IV); e *Atp5a1* e *Atp5f1* (Complexo V). Genes relacionados ao Complexo I foram os únicos que não apresentaram redução significativa na expressão, havendo apenas uma tendência à redução de *Ndufb8* (p=0,06). Contudo, ao avaliarmos a expressão proteica dos complexos mitocondriais em miotubos com Spryd4 silenciada não observamos diferenças significativas, mas apenas uma tendência à redução do Complexo III (Figura 12C).

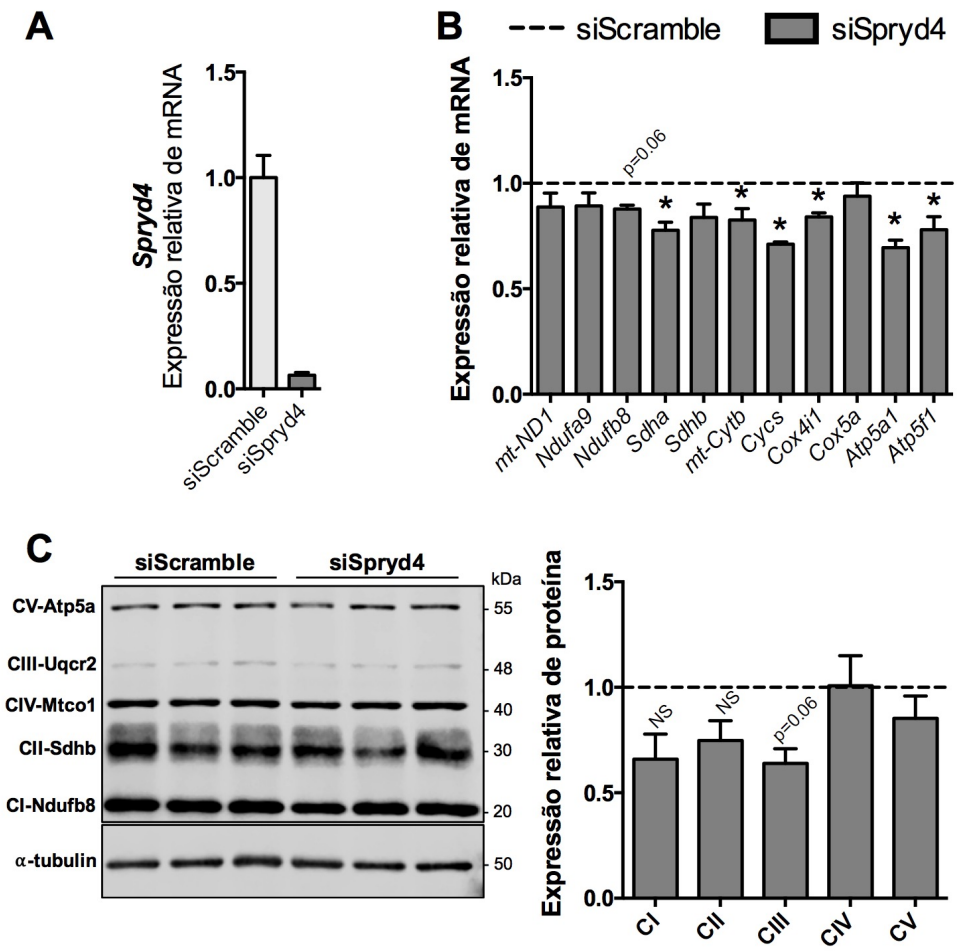

Figura 12 – Expressão de complexos mitocondriais após silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários. **(A)** Transfecção de siSpryd4 reduziu ≈95% a expressão de *Spryd4*. **(B)** Efeito do silenciamento de *Spryd4* na expressão de genes de complexos mitocondriais. **(C)** Efeito do silenciamento de *Spryd4* na expressão de proteica de complexos mitocondriais. Dados apresentados em média e erro padrão da média. *p<0.05 *vs* siScramble; NS, não significante.

Uma vez observada a redução da expressão de genes relacionados aos complexos mitocondriais sem concomitante redução da correspondente expressão proteica, supusemos um possível acúmulo de mitocôndrias disfuncionais por redução da via autofágica/mitofágica. De fato, a redução da expressão dos genes *Map1lc3a*, *Ulk1* e *Pink1* sugeriu uma deficiência na indução de mitofagia após silenciamento de *Spryd4* em miotubos diferenciados (Figura 11A). Por outro lado, não observamos mudanças na expressão de genes relacionados à dinâmica mitocondrial (Figura 11B). Concordando ainda com a hipótese de acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, observamos que o silenciamento de *Spryd4* promoveu redução da expressão dos genes *Tufm*, *Mrps27* e *Mrpl38*, envolvidos na maquinaria de síntese proteica mitocondrial (Figura 11C).

Ao investigarmos a resposta de genes relacionados ao metabolismo energético após silenciamento de *Spryd4* em miotubos diferenciados, notamos acentuada queda na expressão

de *Cd36* e *Cpt1b*, envolvidos no transporte de ácidos graxos, e de *Mlycd* e *Acadm*, enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos (Figura 11D). Tal resposta foi acompanhada pelo aumento da expressão de *Hk2* (Hexoquinase 2), primeira enzima da via glicolítica, com concomitante redução de *Ldha* (Lactato desidrogenase A), o que sugere um deslocamento do metabolismo energético priorizando a glicólise aeróbia (Figura 11E). Ainda, houve redução acentuada do gene *Cs*, primeira enzima do TCA. Não verificamos diferenças na expressão dos genes *Vegfa*, importante indutor de angiogênese, e *Mb* (Mioglobina), transportador de oxigênio no músculo (Figura 11F). Por fim, investigamos a expressão de fatores e coativadores de transcrição relacionados à função mitocondrial e aos metabolismos oxidativo e glicolítico. O silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários promoveu importante redução na expressão do receptor nuclear *Ppard* e dos coativadores de transcrição *PGC-1a1* e *PGC-1b*, responsáveis pela expressão de genes envolvidos em biogênese mitocondrial, metabolismo oxidativo e oxidação de ácidos graxos (Figura 11G). Não observamos mudança na expressão de *Hif1a*, fator de transcrição induzido por hipóxia e envolvido na expressão de genes do metabolismo glicolítico anaeróbio (TAYLOR, 2008), fato que suporta a hipótese de deslocamento das vias energéticas favorecendo a glicólise aeróbio após silenciamento de *Spryd4*.

Para melhor compreender as consequências do silenciamento de Spryd4 em miotubos, avaliamos a expressão de proteínas de sinalização celular (Figura 11H). De acordo com uma possível redução na oxidação de ácidos graxos, observamos redução da forma fosforilada e inativa de ACCβ (Ser219/Ser221), enzima que catalisa a formação de Malonil-CoA, que por sua vez inibe o transporte de acil-carnitina para o interior das mitocôndrias e a β-oxidação (CHENG et al., 2007). No entanto, não observamos alteração na fosforilação de AMPKα (Thr172), principal quinase e inativadora de ACCβ (PARK et al., 2002). Além disso, observamos tendência à redução na fosforilação da MAPK ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ao passo que a fosforilação de JNK (Thr183/Tyr185), outra MAPK, reduziu significativamente, ressaltando mudanças de sinalização celular que podem estar associadas à resistência à insulina (ZHOU et al., 2008; YANG et al., 2012). Ainda, observamos aumento significativo de CAMKII (Thr286), o que parece ser uma sinalização compensatória uma vez que esta quinase induz a expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial e captação de glicose (OJUKA et al., 2012).

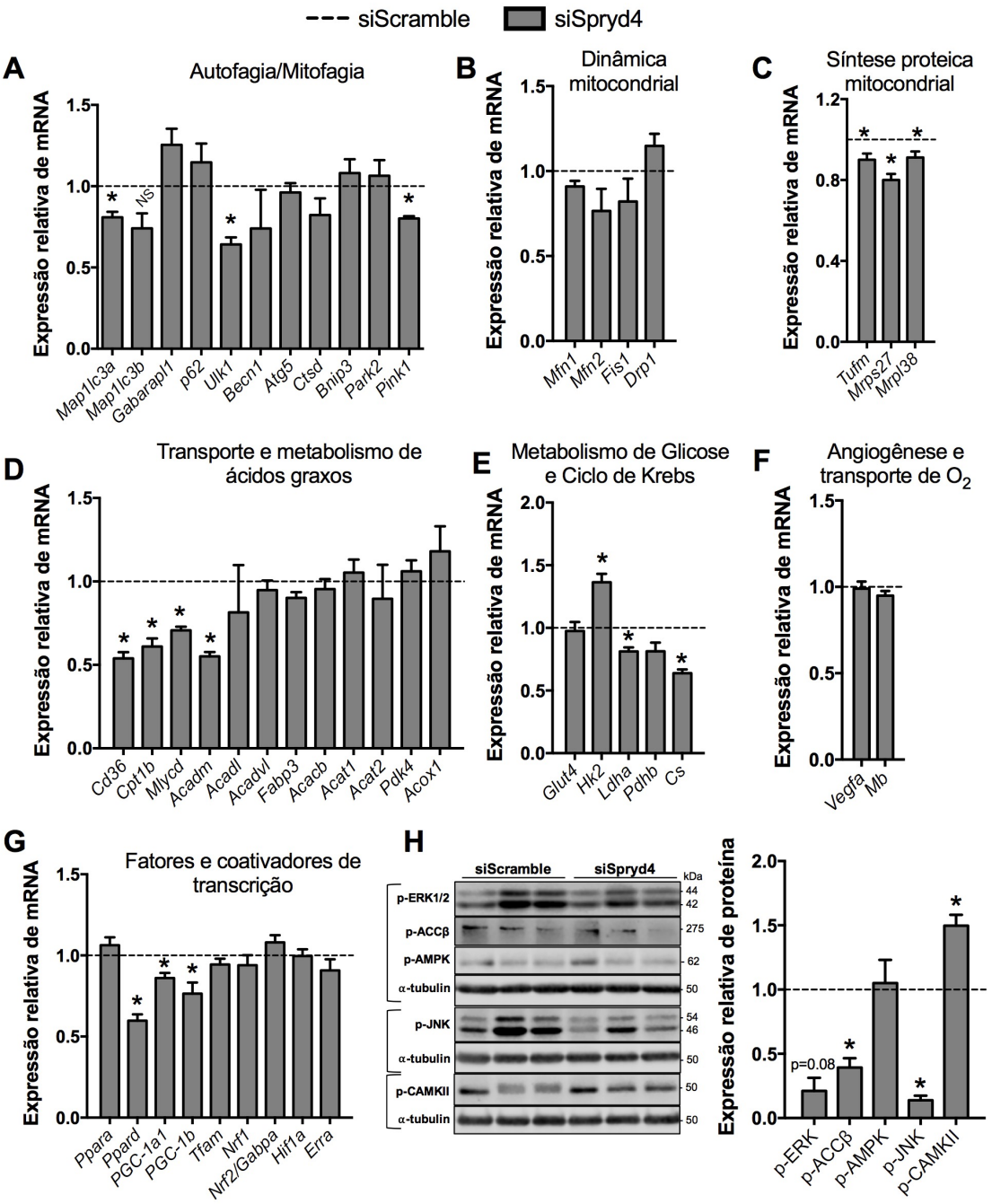

Figura 11 – Silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários promove reprogramação gênica e alterações em sinalização celular. **(A)** Efeito do silenciamento de *Spryd4* na expressão de genes envolvidos em **(A)** autofagia/mitofagia, **(B)**, dinâmica mitocondrial, **(C)** síntese proteica mitocondrial, **(D)** transporte e metabolismo de ácidos graxos, **(E)** metabolismo de glicose e ciclo de Krebs (TCA), **(F)** angiogênese e transporte de O_2, e **(G)** transcrição gênica. **(H)** Efeito do silenciamento de *Spryd4* em proteínas envolvidas em sinalização celular. Dados apresentados em média e erro padrão da média. *p<0.05 *vs* siScramble; NS, não significante.

Os resultados obtidos em miotubos primários após silenciamento de *Spryd4* indicam uma reprogramação gênica que pode promover disfunção mitocondrial e prejuízos no metabolismo oxidativo. Para confirmar tal efeito, realizamos ensaios funcionais nessas mesmas

células. Assim, avaliamos a taxa de consumo de oxigênio (OCR) de miotubos primários após silenciamento de *Spryd4* (XF24 Extracellular Flux Analyzer, Seahorse Bioscience), observando então diminuição da capacidade respiratória reserva, com tendência à redução da OCR máxima (Figura 12A). Não houve diferenças na OCR basal, relacionada ao vazamento de prótons, acoplada à produção de ATP ou não-mitocondrial (Figura 12A). Esse ensaio realiza análise concomitante da taxa de acidificação extracelular (ECAR), o que permitiu identificar uma tendência à redução do ECAR após adição de FCCP, sugerindo menor produção de CO_2 de resultante de menor atividade do TCA (Figura 12B). Ainda, corroborando os dados de OCR e ECAR e confirmando os resultados de expressão gênica, o silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários reduziu a atividade máxima da citrato sintase (Figura 12C) e o conteúdo de ATP intracelular (Figura 12D).

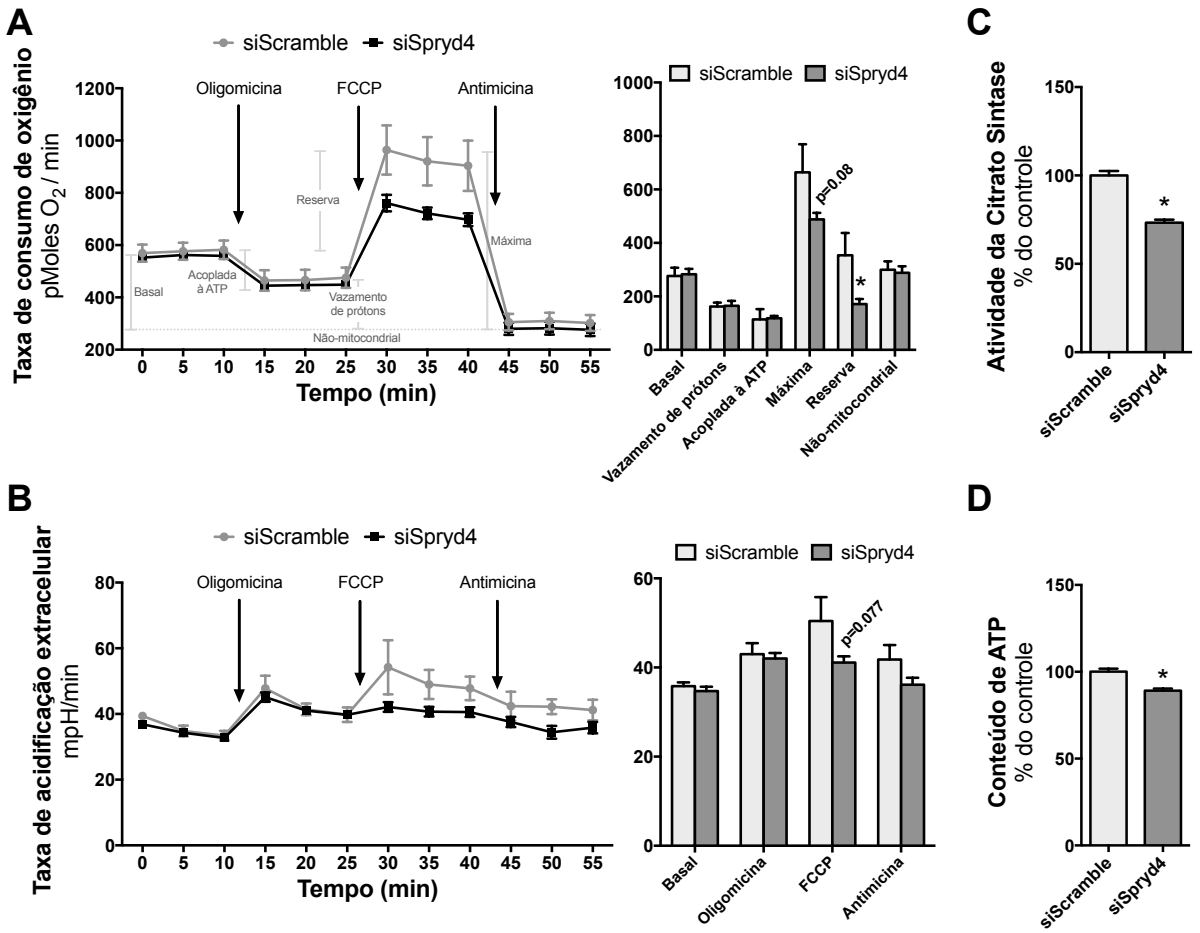

Figura 12 – Spryd4 está envolvida na manutenção da função mitocondrial. **(A)** Taxa de consumo de oxigênio (OCR) basal, relacionada ao vazamento de prótons, acoplada à produção de ATP, máxima, reserva e não-mitocondrial após silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários. **(A)** Taxa de acidificação extracelular (ECAR) após adição de Oligomicina, FCCP e Antimicina A após silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários. **(C)** Atividade máxima da enzima citrato sintase e **(D)** conteúdo de ATP intracelular em miotubos primários após silenciamento de *Spryd4*. Oligomicina, inibidor do complexo V mitocondrial (ATP sintase).

FCCP, desacoplador mitocondrial. Antimicina A, inibidor do complexo III mitocondrial. Dados apresentados em média e erro padrão da média. *p<0.05 *vs* siScramble.

Em conjunto, esses resultados confirmam que a Spryd4 é uma proteína necessária para manutenção da função mitocondrial e sugerindo ainda possível papel em vias envolvidas no transporte e oxidação de ácidos graxos. No entanto, são necessários experimentos adicionais para comprovar o papel da Spryd4 no metabolismo de ácidos graxos, como por exemplo análise de consumo de oxigênio utilizando palmitato como substrato. Além disso, a análise funcional da capacidade glicolítica na ausência de Spryd4 em miotubos também auxiliaria na compreensão do contexto metabólico em que essa proteína está inserida.

Inúmeras evidências demonstram que a disfunção mitocondrial, se não causa, está diretamente associada a quadros de atrofia muscular (ROMANELLO; SANDRI, 2015). Corroborando esses achados, observamos uma redução de ≈17% no diâmetro de miotubos após silenciamento de *Spryd4*, o que sugere um potencial papel dessa proteína no trofismo muscular (Figura 13A). Para explorar os mecanismos envolvidos, avaliamos a expressão de genes sabidamente envolvidos na estrutura, trofismo e na diferenciação muscular após silenciamento de *Spryd4* em miotubos (Figura 13B). Pudemos então observar aumento considerável na expressão do gene da Miostatina (*Mstn*), regulador negativo da massa muscular (MCPHERRON et al., 1997). Apesar de aumento significativo da expressão de Folistatina (*Fst*), antagonista da Miostatina (LEE; MCPHERRON, 2001), observamos aumento da expressão gênica do fator de transcrição *Smad3*, o qual é ativado pela via da Miostatina, induz expressão de genes pró-atróficos e inibe a via de síntese proteica Akt/mTOR (SARTORI et al., 2009; GOODMAN et al., 2013). Se sabe ainda que a Miostatina inibe a diferenciação de mioblastos em miotubos (TRENDELENBURG et al., 2009), fato corroborado por nossos resultados dado que observamos aumento da expressão de *Myod1*, o qual apresenta redução durante o processo de diferenciação nas células analisadas (ver Figura 10C para cinética de *Myod1* durante a diferenciação de miotubos), e redução do fator miogênico 6 (*Myf6*, também conhecido como *Mrf4*), fator de transcrição diretamente relacionado à diferenciação muscular (BRAUN; ARNOLD, 1995) (ver Figura 10C para cinética de *Myf6* durante a diferenciação de miotubos). No entanto, observamos inesperado aumento de *Myh7*, sem alterações em *Tnni1* (Isoforma 1 de Troponina I expressa em músculos de contração lenta) e *Tnni2* (Isoforma 2 de Troponina II expressa em músculos de contração rápida) após silenciamento de *Spryd4* em miotubos primários. Ao encontro do aumento da expressão de *Mstn* e *Smad3*, observamos redução na fosforilação de mTOR após silenciamento de Spryd4 em miotubos, sugerindo que

a atrofia encontrada nos miotubos pode ser decorrente da diminuição de síntese proteica (Figura 13C) (GLASS, 2010).

Uma vez observada a alteração de genes envolvidos na diferenciação muscular, decidimos explorar um possível papel da Spryd4 nesse processo. Para isso, realizamos o silenciamento de Spryd4 concomitante ao início da diferenciação dos mioblastos em miotubos (Figura 13D). Apesar da evidente atrofia observada com 48 e 72h de diferenciação, os mioblastos com silenciamento de *Spryd4* mantiveram a capacidade de se diferenciar em miotubos. De forma notável, considerável parte dos miotubos silenciados para *Spryd4* morreram após 96h de diferenciação. Por fim, para investigar as respostas transcricionais associadas, avaliamos a expressão de genes após 72h de diferenciação e silenciamento de *Spryd4* (Figura 13E). Como observado anteriormente, o silenciamento de *Spryd4* promoveu aumento da expressão de *Myod1*, redução do fator miogênico 5 (*Myf5*) e uma redução ainda mais acentuada de *Myf6*. Analisamos também a expressão dos genes *Myomixer* (*Gm7325*) e *Myomaker* (*Tmem8c*), envolvidos na fusão de mioblastos em diferenciação (MILLAY et al., 2013; BI et al., 2017), onde observamos aumento da expressão de *Myomixer* com concomitante redução de *Myomaker*. O micropeptídeo Myomixer ativa a função fusogênica da proteína de membrana Myomaker, existindo ação sinérgica entre as mesmas. Nesse sentido, o aumento de *Myomixer* pode ser interpretado como uma resposta compensatória à redução de *Myomaker* após silenciamento de *Spryd4* em mioblastos em diferenciação. Esses dados apoiam a hipótese de que Spryd4 pode apresentar papel na diferenciação muscular. No entanto, é importante ressaltar a possibilidade de isso decorrer de um distúrbio metabólico nesses mioblastos em diferenciação (LEARY et al., 1998; REMELS et al., 2010), suposição corroborada pela reduzida expressão de *Cs* induzida pela ausência de Spryd4 nesses mioblastos em diferenciação.

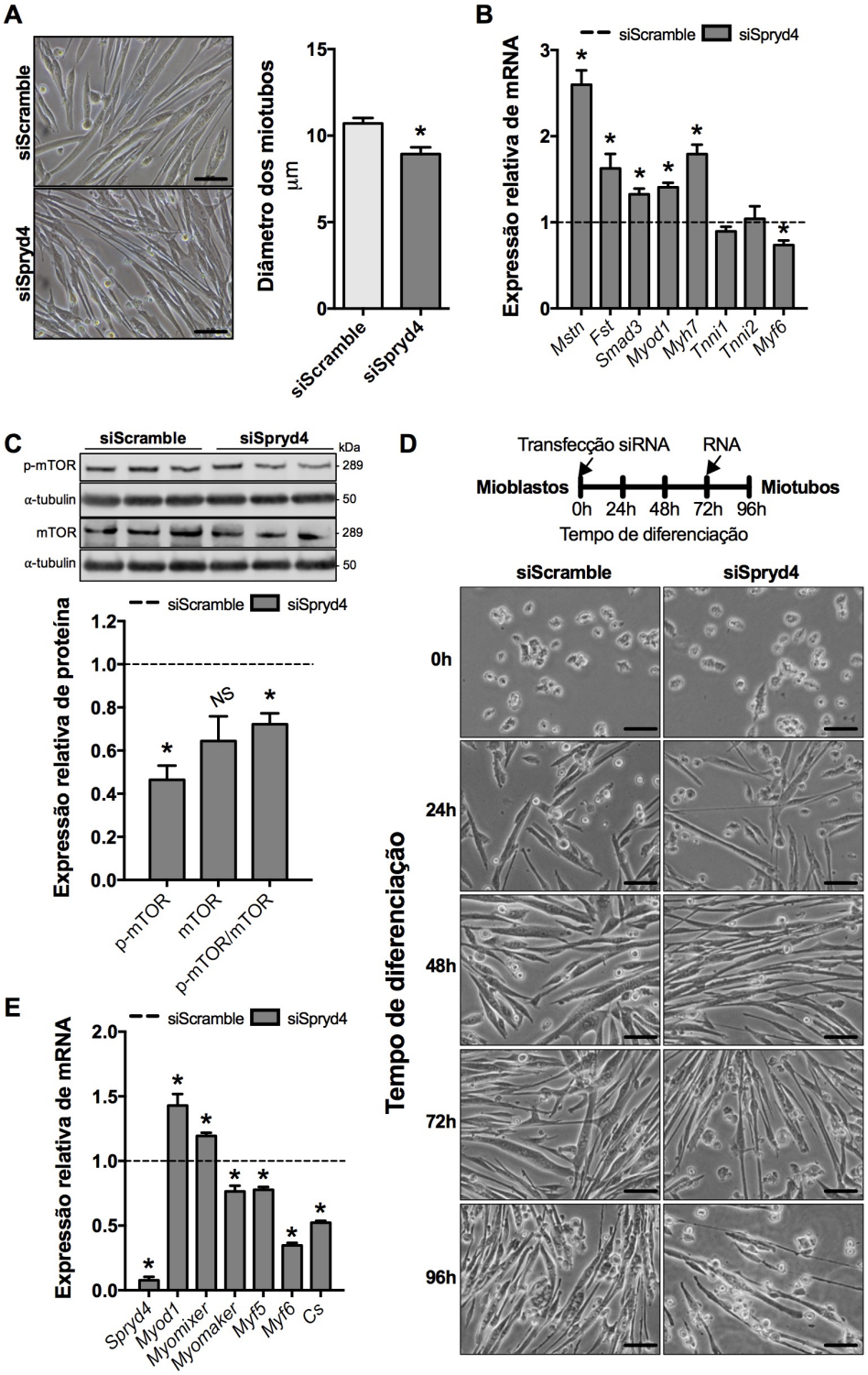

Figura 13 – Silenciamento de *Spryd4* promove atrofia e sinais de diminuição de diferenciação em miotubos primários. **(A)** Diâmetro de miotubos após silenciamento de *Spryd4*. **(B)** Expressão de genes relacionados ao trofismo e estrutura muscular **(B)** e expressão proteica de mTOR **(C)** após silenciamento de *Spryd4* em miotubos. **(D)** Mioblastos foram transfectados com siSpryd4 concomitantemente ao início da diferenciação em miotubos. Imagens representativas ao longo de 96 horas de diferenciação. **(E)** Expressão de genes relacionados à diferenciação e fusão de mioblastos após 72 horas de diferenciação e mesmo tempo de silenciamento de *Spryd4*. Dados apresentados em média e erro padrão da média. * $p<0.05$ *vs* siScramble; NS, não significante.

Apresentados os resultados da Figura 13, podemos considerar que a investigação do papel da Spryd4 no contexto de regeneração muscular parece um interessante tópico de pesquisa, visto que a modulação dessa proteína poderia auxiliar no metabolismo energético de células progenitoras, facilitando sua proliferação, diferenciação e incorporação nas fibras musculares danificadas.

3.3.1 O que descobrimos sobre a Spryd4?

Nesta segunda abordagem, nosso objetivo foi identificar possíveis reguladores de transcrição gênica envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA. Para isso, sobrepusemos nossos dados do proteoma mitocondrial muscular após EFA em camundongos com a MitoCarta2.0 (CALVO et al., 2016), compêndio de proteínas mitocondriais experimentalmente validadas, e com uma lista de proteínas com função validada ou predita na regulação de transcrição gênica (GUPTA et al., 2010). Dessa maneira, nosso intuito foi identificar proteínas mitocondriais que poderiam atuar na reprogramação gênica necessária para a adaptação mitocondrial induzida pelo EFA na musculatura esquelética. Essa análise destacou as proteínas Tfam, fator de transcrição essencial para replicação e expressão do mtDNA e modulado pelo EFA, e Spryd4. Consideramos a proteína Spryd4 como um interessante alvo a ser investigado, visto que: 1) seu conteúdo proteico aumenta na fração mitocondrial muscular imediatamente após o EFA; 2) apresenta validada localização mitocondrial, com provável presença na matriz mitocondrial; 3) possui possível localização nuclear; 4) pode apresentar papel regulatório em outras proteínas, uma vez que sua estrutura é composta basicamente por um único domínio, B30.2/SPRY, relacionado na literatura como um módulo para interação de proteínas; e 5) sua função é desconhecida.

Verificamos por análise de bioinformática e expressão gênica de *Spryd4* ao longo da diferenciação de mioblastos em miotubos que esse gene apresenta importante associação positiva com a expressão de genes essenciais para a função mitocondrial. Ainda, a expressão desse gene no EDL de camundongos, músculo esquelético com predominância de fibras do Tipo II, ultrapassa em mais de 3 vezes a sua expressão no músculo Sóleo, este com predominância de fibras do Tipo I. Contrariando dados da literatura, observamos que Spryd4, pelo menos em miotubos primários, apresenta localização exclusivamente mitocondrial, sem indícios de presença nuclear. Quanto a diferentes contextos fisiológicos e patológicos, a expressão gênica muscular de *Spryd4* diminui com o envelhecimento (tanto em camundongos como em fibras muscular tipo II de humanos) e distrofia muscular, não altera por até 24 horas

após uma sessão de EFA, mas aumenta em camundongos ativos e também parece aumentar em humanos após período de treinamento físico.

Experimentos com miotubos primários de camundongos relevaram que o silenciamento de *Spryd4* promove redução na expressão de genes da ETC, sem modificar a expressão proteica dos mesmos. Ainda, esse silenciamento induziu importante reprogramação transcricional, com destaque para redução na expressão de genes relacionados à autofagia, mitofagia, síntese proteica mitocondrial, transporte e oxidação de ácidos graxos e TCA. Esses resultados podem ser parcialmente explicados pela concomitante redução na expressão gênica do receptor nuclear *Ppard* e dos coativadores de transcrição *PGC-1α1* e *PGC-1β*. Como consequência, o silenciamento da expressão de *Spryd4* em miotubos primários acarretou em disfunção mitocondrial caracterizada por redução da capacidade de consumo de oxigênio reserva, menor atividade da enzima citrato sintase e menor conteúdo de ATP. Por fim, observamos atrofia de miotubos primários após silenciamento de *Spryd4*, resposta associada à sinalização pró-atrófica e anti-miogênica.

Considerado o desconhecimento inicial da função da Spryd4, o presente estudo apresentou dados que sugerem o envolvimento dessa proteína na manutenção da função mitocondrial muscular. Não há dúvidas de que outros experimentos são necessários para desvendar os mecanismos de atuação dessa proteína, especialmente no contexto do EFA. Cabe mencionar que realizamos testes com anticorpo comercial para Spryd4, o qual se demonstrou inespecífico para essa proteína (ThermoFischer PA5-21174). Essa é uma importante limitação do estudo, visto a necessidade de validação dos resultados obtidos na proteômica mitocondrial após o EFA. Ainda, consideramos que a imunoprecipitação de Spryd4 seguida de análise de espectrometria de massas auxiliará na identificação dos parceiros dessa proteína, e com isso, na elucidação do seu mecanismo de ação. Ressaltamos também que experimentos de perda de função *in vivo*, utilizando vetores virais, eletroporação ou animais modificados geneticamente, esclareceriam a importância da Spryd4 na manutenção da função mitocondrial muscular, tanto no repouso como no EFA. Por outro lado, estudos de ganho de função de Spryd4 podem dar suporte para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para condições patológicas que apresentem disfunção mitocondrial.

Figura 14 – Modelo proposto para papel da Spryd4 na melhora da função mitocondrial muscular induzida pelo exercício físico aeróbio.

4 CONCLUSÃO

Até onde temos conhecimento, esse foi o primeiro estudo a realizar análise proteômica da fração mitocondrial muscular após uma sessão de EFA. Demonstramos que essa abordagem exploratória é uma interessante estratégia para a descoberta de novos alvos envolvidos na modulação aguda e/ou crônica da função mitocondrial, auxiliando assim na caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos nos benefícios à saúde induzidos pelo EFA.

Num primeiro estudo, utilizamos os resultados de proteômica para procurar por proteínas envolvidas na ativação da mitofagia durante o EFA. A partir desse estudo, propomos que as proteínas Phb2 e Mief2 podem acumular em mitocôndrias danificadas durante o EFA e colaborar para o recrutamento de LC3 e da maquinaria autofágica para a organela, auxiliando no controle de qualidade e adaptação mitocondrial induzidos pelo EFA.

Em segundo estudo, tivemos como objetivo identificar nos resultados de proteômica, possíveis reguladores de transcrição gênica envolvidos na adaptação mitocondrial induzida pelo EFA. Dessa maneira, identificamos que a proteína Spryd4, cuja função não havia sido estudada até então, parece aumentar na fração mitocondrial muscular durante o EFA, onde pode exercer importante papel na função mitocondrial e no metabolismo de substratos energéticos.

Assim, concluímos que os alvos aqui identificados podem dar início a novas linhas de pesquisa que irão auxiliar na compreensão de novos mecanismos relacionados ao aumento da capacidade oxidativa induzida pelo EFA. Isso ampliará o conhecimento das bases celulares e moleculares da fisiologia do exercício, dando suporte científico para a recomendação da prática regular de exercício físicos para a saúde. Por além disso, novos mecanismos, quando desvendados, podem auxiliar no desenvolvimento de intervenções farmacológicas, com o intuito de mimetizar e/ou maximizar alguns dos efeitos benéficos do EFA, principalmente em doenças crônico degenerativas onde a prática de EFA é proscrita ou ainda não pode ser recomendada.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Modelos animais

Todos os animais utilizados foram mantidos em gaiolas plásticas (3-5 por gaiola) com temperatura controlada entre 22 e 25ºC, ciclo claro-escuro (12/12 horas) e água e comida foram *ad libitum*. Para os protocolos de exercício físico aeróbio em esteira rolante foram camundongos C57BL/6J (8-12 semanas de idade). Para o protocolo de envelhecimento foram utilizados camundongos C57BL/6J com 7 semanas de idade (Jovem) e 24 meses de idade (Idoso). Os animais submetidos ao protocolo de atividade física espontânea (C57BL/6J com 9 semanas de idade) foram mantidos em gaiolas individuais na presença ou não de rodas de atividade física por 8 semanas. Somente animais que correram mais que 4km/noite foram utilizados. Como modelo de distrofia muscular, foram utilizados camundongos *knockout* para o gene *Sgcb* (*sarcoglycan beta*) e controles C57BL/6J (6 meses idade), previamente caracterizados (GIBERTINI et al., 2014). Os animais utilizados são provenientes dos biotérios da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) ou do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Karolinska Institutet (Estocolmo, Suécia). Os animais foram mortos por anestesia volátil (isoflurano) seguida de deslocamento cervical, e os tecidos de interesse foram adequadamente coletados e processados imediatamente ou congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80ºC, dependendo das análises às quais foram submetidos. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EEFE-USP (Protocolo 2013/04) ou Comitê de Ética em Pesquisa do Karolinska Institutet (Estocolmo, Suécia).

5.2 Teste incremental máximo em esteira rolante

Todos os animais foram adaptados à esteira rolante por 5 dias consecutivos, 10 min/dia, em velocidades variadas. Após adaptação, os animais foram submetidos a um teste incremental máximo com velocidade inicial da esteira rolante de 6 m/min e com incrementos de 3 m/min a cada 3 min. O teste foi interrompido quando o animal demonstrou sinais claros de exaustão, ou seja, incapacidade de manter a corrida. Foi anotada a velocidade máxima (Vmáx) atingida e a distância total percorrida, a qual denota à capacidade máxima de corrida do animal.

5.3 Protocolo de exercício físico aeróbio

As sessões de EFA foram executadas a 60% da Vmáx atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, por 80 minutos. A intensidade de 60% da Vmáx foi selecionada por corresponder a máxima fase estável de lactato, previamente determinada em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2007), exigindo assim o máximo da fosforilação oxidativa.

5.4 Isolamento de mitocôndrias

Os músculos de uma das patas traseiras (±500 mg) foram imediatamente retirados e homogeneizados para a separação das frações citosólica e mitocondrial conforme metodologia proposta por Dimauro et al (2012).

5.5 Expressão proteica

A expressão das proteínas de interesse foi avaliada por meio da técnica de *imunoblotting* no lisado total e/ou nas frações citosólica e mitocondrial de músculos esqueléticos, e no lisado de miotubos primários. Exceto para as frações citosólica e mitocondrial (tampões sugeridos por Dimauro et al (2012), as proteínas foram extraídas utilizando o seguinte tampão: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX, 15% Glycerol). A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford (Bio-Rad). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra e separadas em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários e secundários específicos para cada proteína de interesse. Anticorpos primários utilizados: LC3 (Cell Signaling, #4108); p62 (Cell Signaling, #5114); Bnip3 (Cell Signaling, #3769); α-tubulina (Santa Cruz, sc-32293); GAPDH (Thermo Scientific, MA5-15738) VDAC (Abcam, ab14734); Complexo I (Abcam, ab14713); Poly-ubiquitilated (Enzo Life Sciences, PW8805); Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (Abcam; ab110413); Phospho- ERK1/2(p44/42)$^{Thr202/Tyr204}$ (Cell Signaling, #4377); Phospho-JNK/SAPK$^{Thr183/Tyr185}$ (Cell Signaling, #9251); Phospho-mTOR^{Ser2448} (Cell Signaling, #2971); mTOR (Cell Signaling, #2972); Phospho-CaMKII^{Thr286} (Cell Signaling, #3361); Phospho-AMPKa^{Thr172} (Cell Signaling, #2531); p-ACCβ (Ser219/Ser221 (Santa Cruz, sc30446). A imuno-detecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência

(*Enhancer Chemi-Luminescence*, Amersham Biosciences). As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa ImageJ (NIH).

5.6 Proteômica mitocondrial

Para análise proteômica utilizamos uma abordagem de quantificação livre de marcadores (*Label free quantification*), submetendo frações mitocondriais extraídas da musculatura esquelética de camundongos em repouso e imediatamente após uma sessão de EFA (n=4 por grupo). A proteômica por meio de *Label free quantification* se baseia na premissa de que o sinal observado para um peptídeo se correlaciona muito bem com a abundância desse mesmo peptídeo na célula. Dessa forma, a partir da intensidade (pico) do sinal de reconhecimento de um determinado peptídeo é possível inferir a quantidade da proteína na qual sua sequência está inserida. Cabe ressaltar que para a aplicação dessa técnica é necessário avaliar inicialmente se os picos analisados de diferentes amostras apresentam um padrão reprodutivo de reconhecimento para uma série de proteínas em cada laboratório de pesquisa. De fato, esses experimentos foram conduzidos em colaboração com o *Proteomics and Metabolomics Core Facility (PROMEC)*, da *Norwegian University of Science and Technology* (NTNU, Noruega), onde essa técnica já foi previamente padronizada e apresenta bom padrão de reconhecimento.

As proteínas foram precipitadas da solução por protocolo de metanol/clorofórmio/água e em seguida secas ao ar. Após reconstituição em 50mM de bicarbonato de amônio, as proteínas foram reduzidas com DTT a 70ºC por 20 minutos, e então resfriadas para temperatura ambiente e alquiladas usando iodoacetoamida em temperatura ambiente por 30 minutos protegido da luz. Finalmente, as proteínas foram digeridas usando tripsina a 37ºC *overnight*. Os peptídeos foram secos em uma centrífuga SpeedVac (Thermo Scientific) e então reconstituídos em 0,1% ácido fórmico. Os testes iniciais de MS revelaram a presença de detergentes, apesar da precipitação de proteínas ter sido realizada. Assim, as amostras foram passadas por colunas para remoção de detergentes (Pierce) e então dessalinizadas usando C18 StageTips. Os peptídeos foram analisados numa plataforma LC-MS/MS consistindo de um sistema Easy-nLC 1000 UHPLC (Thermo Scientific) interligado a um espectrômetro de massa híbrido LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) por meio de um ionizador eletrospray (ESI, Thermo Scientific). Peptídeos foram injetados dentro de uma coluna C18 (Acclaim PepMap100, 75 µm i.d. x 2 cm, C18, 5 µm, 100 Å, Thermo Scientific) e posteriormente separados numa coluna analítica C18 (Acclaim PepMap100, 75 µm i. d. x 50 cm, C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Scientific) utilizando um tampão

multiestágio em gradiente com duração de 240 minutos (5 min 2%-7% B, 200 min 7%-25% B, 15 min 25%-32% B, 10 min 32%-100% B, 10 min a 100% B; onde B é 0.1% ácido fórmico em CH3CN) com fluxo de 250 nl/min. Os peptídeos foram analisados em modo de íon positivo sob aquisição dependente de dados (DDA) utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do eletrospray 1.8 kV, fragmentação por dissociação induzida por colisão com energia de colisão normalizada em 35. Cada escaneamento da MS (m/z 400-1600, 1 m/z de largura de isolamento, perfil) foi adquirido em uma resolução de 120.000 FWHM no analisador Orbitrap, seguido de escaneamentos MS/MS rápidos (2 m/z de largura de isolamento, cetróide) disparados pelos 20 íons mais intensos, com uma exclusão dinâmica de 60 s e analisados no Linear Ion trap.

Os arquivos com os dados brutos gerados pelo espectrômetro de massas serão disponibilizados pelo ProteomeXChange com o identificador PXD003739 (VIZCAINO et al., 2016). Esses dados foram analisados utilizando MaxQuant v1.5 (COX; MANN, 2008) mapeando os espectros sobre o genoma de camundongos anotado contendo isoformas baixado do UniProt em setembro de 2015 (www.uniprot.org). Foram utilizados os seguintes parâmetros de busca: enzima especificada como tripsina com permissão de no máximo duas clivagens ausentes; carbamidometilação de Cisteína como fixo enquanto a oxidação de Metionina e deamidação de Arparagina e Glutamina como modificação pós-traducional dinâmica; tolerância do precursor de massa foi definida em 20 ppm e tolerância fragmento de massa em 0,5 Da. A taxa de falsa detecção (FDR) foi definida em 0,01, portanto, peptídeos somente com alta confiança foram utilizados para identificação de proteína final. Um algoritmo para *Label free quantification* (COX et al., 2014) foi utilizado para estimar a abundância das proteínas na amostra, aplicando uma função *one minute window match-between-run*. Os valores calculados foram transformados em Log_2 e as réplicas foram combinadas em um valor de mediana representativo. Esses valores foram utilizados para comparar os grupos amostrais utilizando teste *t-Student* para amostras não pareadas ($p<0,05$).

5.7 Expressão gênica

A expressão dos genes de interesse foi avaliada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando TRIzol (Thermo Scientific). As concentrações e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich). A transcrição reversa do RNA (síntese de cDNA) foi realizada utilizando High-Capacity RNA-to-cDNA^{TM} *Kit* (Thermo Scientific)

seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR (Viia7 Real-Time PCR system, Applied Biosystems) utilizando primers específicos e *Power SYBR® Green Master Mix* (Thermo Scientific). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) como descrito pelo produtor do sistema. Os primers específicos de cada gene foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Como gene normalizador foi utilizado o Hprt, o qual apresentou estabilidade em diversas condições experimentais testadas. As sequências dos primers utilizados constam na Tabela 4.

Tabela 4 – Lista de Primers.

Gene	Forward	Reverse
mHprt	CAGTCCCAGCGTCGTGATT	GCAAGTCTTTCAGTCCTGTCCAT
mMap1lc3a	GACCGCTGTAAGGAGGTGC	CTTGACCAACTCGCTCATGTT
mMap1lc3b	CACTGCTCTGTCTTGTGTAGGTTG	TCGTTGTGCCTTTATTAGTGCATC
mGabarapl1	GGACCACCCCTTCGAGTATC	CCTCTTATCCAGATCAGGGAC
mp62/Sqstm1	CCTCAGCCCTCTAGGCATTG	CTGTGCCTGTGCTGGAACTTT
mBecn1	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	TCCTCTCCTGAGTTAGCCTCT
mAtg3	TCACAACACAGGTATTACAG	CTTCCTCGTCTTCTTCATC
mAtg4d	AGTTGCTCAGAAGTCAGCCG	GTACAGGCACCAGGATGACC
mAtg5	ACTTGCTTTACTCTCTATCAG	CATCTTCTTGTCTCATAACCT
mAtg16l1	CCTTCTGGATTCTATCACTAAT	TGGGACTCTCACATCTTTA
mBnip3	TTCCACTAGCACCTTCTGATGA	GAACACCGCATTTACAGAACAA
mNix	CTTGGGGCTCGGCATCTATA	CACAGGCCACACGAATTTCC
mPark2	TCTTCCAGTGTAACCACCGTC	GGCAGGGAGTAGCCAAGTT
mPink1	ATGCTGCCCCCACACTACTA	AGGGTACAGGGGTAGTTCTTCA
mAtg13	CGTACCCGTCAGTGGAAGAC	GAGTTACCCCGCCTTCCTTC
mCtsl	TCCGTCCTTCGCTTCATAGG	GTGGACTGTTCTCACGCTCAAG
mCtsd	TCTACCTGAAGCTAGGAGGCA	TTCCACCCTGCGATACCTTG
mCtsz	GACCAGGCCGTTATCAACCA	CCTTTCTCACCCCAGGGTTC
mCtsc	TTCCGGGCATTTTACCCTCA	CATCATGGACCCACCCAGTC
mWipi1	CACAGGATGGAGGAGAAT	GATGGAGGTAAGGAAGGT
mWipi2	TCTGCTCACTAACCACAA	TCTCCATACTGCCATCAA
mDrp1	AACACCCCGACTTTGCTGAT	GTCCCGTGATCCAGCTGAAG
mFis1	TGTGGCCCAGTAGAGACCTT	CAAAATTCTTCAGATCCTCCACAGA
mMfn1	GCATGGGAAGAAATTTGGCTGAT	GTAGTGGCTTCAAGTTTTCGATGA
mMfn2	CAGGAGCAGCGGGTTTATTG	CTGTGGACACCTGCCTTTCC
mUlk1	AGCCCAGTTTCCAGGTGATC	CCCACTACACAGCAGGCTATC
mTfeb	GCTCCAACCCCGAGAAAGAG	TAGACAGGGGCAGCGTGTTA
mFoxo1	ATGTGTTGCCCAACCAAAGC	ATGTAGCCTGCTCACTAACTCTT

mFoxo3	CTGGGGGAACCTGTCCTATG	TCATTCTGAACGCGCATGAAG
mCebpb	ACTTGATGCAATCCGGATCAAAC	CAGTTACACGTGTGTTGCGT
mAtf4	TGGCGTATTAGAGGCAGCAG	TGAAGAGCGCCATGGCTTAG
mJun	ACCGAGAATTCCGTGACGAC	TGAAAAGTCGCGGTCACTCA
mStat3	CAATACCATTGACCTGCCGAT	GAGCGACTCAAACTGCCCT
mAtf5	GGGCACGGCTAGAAGGAAAT	GGTGGAGGACCTCATCTTATTCC
mChop/Ddit3	CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT
mSrebf2	AGCTGGGCGATGGATGAGAG	AAACTGTAGCATCTCGTCGATGT
mZkscan3	TGCGTTCGCGGTAGTCTTTT	TCTCTAGCCATCCCGAACCA
mPhb2	CGTGGAAGGCGGTCATAGAG	GGGGATCCTGAAGTGAAGGC
mMief2	GCTCGATTGGTGCTAGGTGT	CCTGTCGATGAGCCGCTTTA
mSpryd4	CCGGAGAGGCATCAGTTTCA	CGGAAGCGCTCCAAATTCAG
mTufm	TGGAGGCCCAGGTTTATATCC	CCTTCCCTGGAGGCAAGATG
mMrps27	CCGTCCACCCAGTTTCTCTC	CTTCCCATGTGAGCTCCGTC
mMrpl38	CATCAACTTGGACGGACACC	TCCTGTCCTTCAGCCACTCT
mCd36	CTCCTAGTAGGCGTGGGTCT	CACATTTCAGAAGGCAGCAACT
mCpt1b	GCACACCAGGCAGTAGCTTT	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
mMlycd	TGCTGTCTGAGTGGTTCTCC	CCTCACACTCGCTGATCTTCT
mAcadm	GAAGCCACGAAGTATGCCCT	CCTTCATCGCCATTTCTGCG
mAcadl	GAATGTGTGCAACTCCACGG	GTACCACCGTAGATCGGCTG
mAcadvl	CTCAGTGAAGAACAGGCACAA	CTTGGCAGGGTCATTCACTT
mFabp3	ACCTGGAAGCTAGTGGACAG	TGATGGTAGTAGGCTTGGTCAT
mAcacb	CACCCAACTCTGAAGGGGAC	CCAGGGTGCCATGATTTCCT
mAcat1	ATGCCAGCACACTGAACGA	AATCAATGGGGTCTACGGCAG
mAcat2	GGAGTAGGACCAATTCCAGCC	TTAGCTATTGCCGCAGACACC
mPdk4	AGGGAGGTCGAGCTGTTCTC	GGAGTGTTCACTAAGCGGTCA
mAcox1	TGAGCTTCATGCCCTCACAG	TGCTGTGAGAATAGCCGTGC
mGlut4_Slc2a4	GTGACTGGAACACTGGTCCTA	CCAGCCACGTTGCATTGTAG
mLdha	ATCGTGCACTAGCGGTCTCAA	AACAAGGGCAAGCTCATCCG
mHk2	TGGCTCCTGGAGTCTTCGAT	GGTCAACCTTCTGCACTTGG
mPdhb	GGTGCAGTTGACAGTTCGTG	TCTGAGATGGGGGTGTCGAT
mCs	TGGGAGCCAAGAACTCATCCT	CCATGTTGCTGCTTGAAGGTC
mVegfa	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGCT
mMyoglobin	AACATGCTGCCGAGATCCA	TTTCTGAGATAAACTCCAGGTACTTGAC
mPpard	GCCTCGGGCTTCCACTAC	AGATCCGATCGCACTTCTCA
mPpara	CCTGAACATCGAGTGTCGAA	ACGGCAGTACTGGCATTTGT
mPGC-1a1	GGACATGTGCAGCCAAGACTCT	CACTTCAATCCACCCAGAAAGCT
mPGC-1b	TCTGACGTGGACGAGCTTTC	GTGCCATCCACCTTGACACA
mTfam	GAGCGTGCTAAAAGCACTGG	ACTTCGGAATACAGACAAGACTGA
mNrf1	AGCACGGAGTGACCCAAAC	TGTACGTGGCTACATGGACCT
mNrf2/Gabpa	AGCGCATCTCGTTGAAGAAG	TCCTGCTCTTTTCTGTAGCCT
mHif1a	ATGGCCCAGTGAGAAAAGGG	AGTGAAGCACCTTCCACGTT
mERRa	GGGGAGCATCGAGTACAGC	AGACGCACACCCTCCTTGA

m mt-ND1	TTACTTCTGCCAGCCTGACC	CCGGCTGCGTATTCTACGTT
mNdufa9	GTCCGCTTTCGGGTTGTTAGA	CCTCCTTTCCCGTGAGGTA
mNdufb8	TGAACTGGGGTGAACCGATAC	AGCCACAAAGCCGAAGAGAT
mSdha	GGAACACTCCAAAAACAGACCT	CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA
mSdhb	AATTTGCCATTTACCGATGGGA	AGCATCCAACACCATAGGTCC
m mt-Cytb	GGCTACGTCCTTCCATGAGG	AGCGAAGAATCGGGTCAAGG
mCycs	ACAAGAAGACTCAAATGTGTTTCAGTTT	TGCACTGTCAAGAATAGACAGTTGC
mCox4i1	TCGAGCACATGGGAGTGTTG	CCACATCAGGCAAGGGGTAG
mCox5a	CTGGGAATTGCGTAAAGGGATG	AACCGTCTACATGCTCGCAA
mAtp5a1	CATTTTGTGCCAGTCGTCCG	TTTTTGGAGACCAGTCCCGC
mAtp5f1	AGTTCCTTTACCCTAAGACTGGT	TTCATGCTCGACTGCTTTACTT
mMstn	CTGTAACCTTCCCAGGACCA	TCTTTTGGGTGCGATAATCC
mFst	CTCTTCCTTGCTCAGTTCTGTCTT	GCTGCTACTCTGCCAGTTCAT
mSmad3	GGCTGTAGGTCCAAGTTATTGTG	GAGAAACCAGTGACCACCAGAT
mMyHC-I Myh7	CAACCTGTCCAAGTTCCGCA	TACTCCTCATTCAGGCCCTTG
mMyod1	GCATCTGAGTCGCCACTGTA	AGTGAATGAGGCCTTCGAGA
mTnni1	CACTCTGCAGTCTGTGGTGAG	CCTCTCAACTTCCGGCATGG
mTnni2	CGGAGACAGCACCTGAAGAG	GTTTGCAGAGTTCCTGCACTT
mMyf5	GCAAAAAGAACAGGCAGAGG	AGGAAAAGAAGCCCTGAAGC
mMyf6	ATCAGCTACATTGAGCGTCTACA	CCTGGAATGATCCGAAACACTTG
mTmem8c/Myomaker	CCTGCTGTCTCTCCCAAG	AGAACCAGTGGGTCCCTAA
mGm7325/Myomixer	GTTAGAACTGGTGAGCAGGAG	CCATCGGGAGCAATGGAA

5.8 Cultura de células musculares

Mioblastos primários foram isolados de camundongos C57BL/6J, como previamente descrito (MEGENEY et al., 1996), e mantidos em cultura em meio F-10/DMEM (50% F-10, 50% DMEM high glucose; Invitrogen) suplementado com 20% FBS (Sigma-Aldrich), 1% Penicilina/Streptomicina e 2,5 ng/mL bFGF (Gibco). Para induzir a diferenciação em miotubos, foi trocado o meio de cultura para DMEM suplementado com 5% soro de cavalo (Gibco) e 1% Penicilina/Streptomicina (Gibco) após as células atingirem 90% de confluência. As células C2C12 (ATCC) foram mantidas em DMEM suplementado com 10% FBS (Sigma-Aldrich) e 1% Penicilina/Streptomicina (Gibco).

5.9 Silenciamento gênico por transfecção de siRNA

Exceto quando especificado o contrário, as transfecções de siRNA foram realizadas após 48 horas de diferenciação (miotubos primários), ou 48 horas antes da análise (C2C12), utilizando 10nM siRNA (Silencer® Select: Negative Control No.1, Spryd4 Mouse siRNA

No.1; Phb2 Mouse siRNA No.1; Mief2 Mouse siRNA No.1; Ambion) e Lipofectamine RNAiMax (Thermo Scientific), seguindo instruções dos fabricantes. Com exceção do experimento de curso temporal de diferenciação, todos os miotubos primários foram coletados após 96h de diferenciação.

5.10 Expressão estável de mCherry-GFP-LC3 em células C2C12

Foi gerada linhagem de mioblastos C2C12 que expressam de forma estável o constructo mCherry-GFP-LC3 a partir de transdução com vetor retroviral produzido em células HEK293T utilizando o plasmídeo pBABE-puro-mCherry-GFP-LC3 (Addgene #22418). Após transdução, as células C2C12 foram selecionadas por duas semanas com puromicina e separadas por citometria de fluxo (FACSAria III Cell Sorter). A citometria de fluxo foi realizada no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP / FLUIR).

5.11 Análise do fluxo autofágico em células C2C12 mCherry-GFP-LC3

A análise do fluxo autofágico foi realizada em mioblastos C2C12 que expressam de forma estável o constructo mCherry-GFP-LC3 (N'DIAYE et al., 2009). Para isso, 45 imagens foram adquiridas aleatoriamente por condição experimental em células vivas utilizando um microscópio de fluorescência acoplado a uma incubadora de células (INCell Analyzer 2200 system, GE) do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP). Antes de iniciar a coleta das imagens, as células foram tratadas em meio de cultura com Hoechst diluído 1:1000 para visualização dos núcleos. Assim, as imagens foram adquiridas nos canais TexasRed (para visualizar mCherry), FITC (para visualizar GFP) e DAPI (para visualizar os núcleos. A contagem do número de células, dos pontos vermelhos (mCherry), verdes (GFP) e colocalizados/amarelos (mCherry e GFP), foi realizada automaticamente no software ImageJ (NIH) utilizando a macro “Green and Red Puncta Colocalization” depositada no Wiki ImageJ (http://imagejdocu.tudor.lu) e criada por Ruben K. Dagda (University of Nevada School of Medicine, Pharmacology Department), Daniel Shiwarski (Carneggie Mellon University) e Charleen Chu (University of Pittsburgh). Essa macro foi previamente validada por Pampliega et al. (2013). Os valores apresentados correspondem ao número de autofagossomos ou autolisossomos por célula.

5.12 Localização subcelular de Spryd4 em miotubos primários

Para determinar a localização subcelular de Spryd4, diferenciamos mioblastos primários de camundongos em miotubos por 48 horas, quando os transfectamos com 1µg do plasmídeo pCMV6-Spryd4-Myc-Flag (MR202189, Origene) utilizando Lipofectamina 2000 (Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante. Após 48 horas de transfecção e 96 horas de diferenciação, as células foram incubadas com 250nM de MitoTracker Deep Red FM (M22426, Thermo Scientific) por 30 minutos à 37ºC. Logo em seguida, as células foram fixadas com formalina 10% por 5 minutos em temperatura ambiente, após lavagem com PBS as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em gelo por 15 minutos e bloqueadas com soro de cabra 5% (G9023, Sigma-Aldrich) por 1 hora em temperatura ambiente. Para imunomarcação de Spryd4, as células foram então incubadas *overnight* com leve agitação em geladeira em anticorpo primário Anti-Flag M2 mouse (F1804, Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em Triton X-100 0.1% e soro de cabra 5%. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas por 1h em geladeira com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (A11001, Thermo Scientific) diluído 1:200 e Hoechst (33258, Thermo Scientific) diluído 1:4000 em Triton X-100 0.1% e soro de cabra 5%. As imagens foram imediatamente capturadas com aumento de 400x e objetiva de 40x. Considerada a baixa eficiência de transfecção de plasmídeos em miotubos primários, adquirimos imagens de células que apresentavam imunomarcação positiva para Flag/Spryd4. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (Leica Qwin, Leica Microsystems).

5.13 Função mitocondrial de miotubos primários

Mioblastos primários foram cultivados em placas de 24 poços ($6x10^5$ células por poço) (Seahorse Bioscence) e diferenciados e transfectados como descrito no Tópico 5.11. Após 96h de diferenciação, a taxa de consumo de oxigênio (OCR; pMoles O_2/min) e a taxa de acidificação extracelular (ECAR mpH/min) avaliado por meio do *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscence). Para isso, imediatamente antes dos experimentos as células foram trocadas para meio DMEM contendo 5mM glicose e 1mM piruvato. Após 3 medidas basais, as células foram tratadas sequencialmente com 1uM Oligomicina para inibir a ATP sintase, 0,3uM FCCP para desacoplar as células e 2uM Antimicina A para inibir o Complexo III mitocondrial, realizando 3 medidas em cada uma das condições. Os cálculos para análise da OCR foram

realizados da seguinte maneira: 1) respiração basal = (Média das medidas basais) - (respiração não-mitocondrial); 2) respiração relacionada ao vazamento de prótons: (Valor mínimo após adição de Oligomicina) - (respiração não-mitocondrial); 3) respiração acoplada à produção de ATP: (respiração basal) – (respiração ligada ao vazamento de prótons); 4) respiração mitocondrial máxima: (Valor máximo após adição de FCCP) - (respiração não-mitocondrial); 5) respiração mitocondrial de reserva: (respiração mitocondrial máxima) - (respiração basal); e 6) respiração não-mitocondrial: (Média das medidas basais após adição de Antimicina A).

5.14 Determinação do diâmetro de miotubos primários

Foram adquiridas imagens com aumento de 400x e objetiva de 40x de miotubos primários após silenciamento de Spryd4, onde foram retiradas 10 fotos aleatórias por condição e o diâmetro de pelo menos 60 miotubos por condição foi analisado. Para determinação do diâmetro de miotubos, foi considerado o diâmetro médio de três regiões ao longo de um mesmo miotubo. A aquisição e análise das imagens foi realizada por observador cego para as condições experimentais (PRJ). O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio óptico e conectado a um sistema fotográfico (Leica Qwin, Leica Microsystems).

5.15 Linhagens BXD

Esses dados são provenientes de *microarrays* (EPFL/LISP BXD CD Muscle Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST (Dec11) RMA Database; GSE60151) realizados em *pool* de músculos quadríceps de aproximadamente cinco animais por linhagem (PIRINEN et al., 2014).

5.16 *GEO datasets*

Para análise da expressão gênica de SPRYD4 em humanos, foi realizada busca na plataforma *Gene Expression Omnibus (GEO) Datasets* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds), por estudos que realizaram análise de *microrrays* ou de sequenciamento de RNA antes e após período de treinamento físico aeróbio, ou na comparação de indivíduos sedentários e treinados. Foram análisados os *datasets* GSE58608/GSE60590 (LINDHOLM et al., 2014; LINDSKOG et al., 2015), GSE40551 (ENGELI et al., 2012), GSE53598 (CATOIRE et al., 2014), GSE9103 (LANZA et al., 2008), GSE46697 (LAMMERS et al., 2012) e GSE48278 (HUFFMAN et al., 2014). Exceto para GSE58608/GSE60590, onde foram utilizadas as listas disponibilizadas

pelos autores, analisamos os *datasets* por meio do GEOR2, ferramenta embutida na plataforma *GEO Datasets*. Foram utilizados os valores de significância não-corrigidos para comparações múltiplas.

5.17 Análise estatística

Conforme o desenho experimental, foi aplicado teste *t-Student* bicaudal para amostras não-pareadas ou análise de variância (ANOVA) para um ou dois caminhos. No caso de interação significante na ANOVA, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey. Para as análises de correlação foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância adotado foi $p<0,05$.

REFERÊNCIAS

AKIEL, M. et al. Emerging role of insulin-like growth factor-binding protein 7 in hepatocellular carcinoma. **J Hepatocell Carcinoma,** v. 1, p. 9-19, 2014.

ANDREUX, P. A.; HOUTKOOPER, R. H.; AUWERX, J. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. **Nat Rev Drug Discov,** v. 12, n. 6, p. 465-83, 2013.

ANDREUX, P. A. et al. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. **Cell,** v. 150, n. 6, p. 1287-99, 2012.

ARANY, Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. **Curr Opin Genet Dev,** v. 18, n. 5, p. 426-34, 2008.

BAAR, K. et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. **FASEB J,** v. 16, n. 14, p. 1879-86, 2002.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem,** v. 75, p. 19-37, 2006.

BECHET, D. et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 37, n. 10, p. 2098-114, 2005.

BHUJABAL, Z. et al. FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. **EMBO Rep,** v. 18, n. 6, p. 947-961, 2017.

BI, P. et al. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. **Science,** v. 356, n. 6335, p. 323-327, 2017.

BICKEL, C. S. et al. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol (1985),** v. 98, n. 2, p. 482-8, 2005.

BIRGISDOTTIR, A. B.; LAMARK, T.; JOHANSEN, T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. **J Cell Sci,** v. 126, n. Pt 15, p. 3237-47, 2013.

BOOTH, F. W. et al. Endurance Exercise and the Regulation of Skeletal Muscle Metabolism. **Prog Mol Biol Transl Sci,** v. 135, p. 129-51, 2015.

BORISOV, A. B. et al. Essential role of obscurin in cardiac myofibrillogenesis and hypertrophic response: evidence from small interfering RNA-mediated gene silencing. **Histochem Cell Biol,** v. 125, n. 3, p. 227-38, 2006.

BOSTROM, P. et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature,** v. 481, n. 7382, p. 463-8, 2012.

BOSTROM, S. et al. Activities of rat muscle enzymes after acute exercise. **Acta Physiol Scand,** v. 90, n. 3, p. 544-54, 1974.

BRAUN, T.; ARNOLD, H. H. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. **EMBO J,** v. 14, n. 6, p. 1176-86, 1995.

CALVO, S. E.; CLAUSER, K. R.; MOOTHA, V. K. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. **Nucleic Acids Res,** v. 44, n. D1, p. D1251-7, 2016.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev,** v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CARTONI, R. et al. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. **J Physiol,** v. 567, n. Pt 1, p. 349-58, 2005.

CATOIRE, M. et al. Identification of human exercise-induced myokines using secretome analysis. **Physiol Genomics,** v. 46, n. 7, p. 256-67, 2014.

CERVENKA, I.; AGUDELO, L. Z.; RUAS, J. L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. **Science,** v. 357, n. 6349, 2017.

CHEN, Y.; DORN, G. W., 2ND. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. **Science,** v. 340, n. 6131, p. 471-5, 2013.

CHENG, D. et al. Expression, purification, and characterization of human and rat acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) isozymes. **Protein Expr Purif,** v. 51, n. 1, p. 11-21, 2007.

CHIN, E. R. et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. **Genes Dev,** v. 12, n. 16, p. 2499-509, 1998.

CHOI, A. M.; RYTER, S. W.; LEVINE, B. Autophagy in human health and disease. **N Engl J Med,** v. 368, n. 7, p. 651-62, 2013.

COATES, P. J. et al. The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. **Curr Biol,** v. 7, n. 8, p. 607-10, 1997.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr,** v. 81, n. 2, p. 341-54, 2005.

CORDAIN, L. et al. Physical activity, energy expenditure and fitness: an evolutionary perspective. **Int J Sports Med,** v. 19, n. 5, p. 328-35, 1998.

CORDAIN, L. et al. Plant-animal subsistence ratios and macronutrient energy estimations in worldwide hunter-gatherer diets. **Am J Clin Nutr,** v. 71, n. 3, p. 682-92, 2000.

COX, J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. **Mol Cell Proteomics,** v. 13, n. 9, p. 2513-26, 2014.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol,** v. 26, n. 12, p. 1367-72, 2008.

D'CRUZ, A. A. et al. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity. **Protein Sci,** v. 22, n. 1, p. 1-10, 2013.

DEVEAUD, C. et al. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. **Mol Cell Biochem,** v. 267, n. 1-2, p. 157-66, 2004.

DIMAURO, I. et al. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **BMC Res Notes,** v. 5, p. 513, 2012.

DING, H. et al. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta,** v. 1800, n. 3, p. 250-6, 2010.

DOHM, G. L.; TAPSCOTT, E. B.; KASPEREK, G. J. Protein degradation during endurance exercise and recovery. **Med Sci Sports Exerc,** v. 19, n. 5 Suppl, p. S166-71, 1987.

DOSZTANYI, Z.; MESZAROS, B.; SIMON, I. ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. **Bioinformatics,** v. 25, n. 20, p. 2745-6, 2009.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab,** v. 17, n. 2, p. 162-84, 2013.

EGAN, D. F. et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. **Science,** v. 331, n. 6016, p. 456-61, 2011.

EKELUND, U. et al. Physical activity and all-cause mortality across levels of overall and abdominal adiposity in European men and women: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study (EPIC). **Am J Clin Nutr,** v. 101, n. 3, p. 613-21, 2015.

ENGELI, S. et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. **J Clin Invest,** v. 122, n. 12, p. 4675-9, 2012.

EVANS, M. J.; SCARPULLA, R. C. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. **Genes Dev,** v. 4, n. 6, p. 1023-34, 1990.

FENG, Y.; YAO, Z.; KLIONSKY, D. J. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. **Trends Cell Biol,** v. 25, n. 6, p. 354-63, 2015.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 34, n. 8, p. 760-5, 2007.

FITZSIMONS, D. P. et al. Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. **J Appl Physiol (1985),** v. 68, n. 5, p. 1950-5, 1990.

FIUZA-LUCES, C. et al. Exercise is the real polypill. **Physiology (Bethesda),** v. 28, n. 5, p. 330-58, 2013.

FRITZEN, A. M. et al. Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation. **J Physiol,** v. 594, n. 3, p. 745-61, 2016.

GAITANOS, G. C. et al. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. **J Appl Physiol (1985),** v. 75, n. 2, p. 712-9, 1993.

GARNIER, A. et al. Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. **FASEB J,** v. 19, n. 1, p. 43-52, 2005.

GBD OBESITY et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **N Engl J Med,** v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

GENG, T. et al. PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 298, n. 3, p. C572-9, 2010.

GHISLAT, G. et al. Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca2+/calmodulin-dependent kinase kinase-beta (CaMKK-beta). **J Biol Chem,** v. 287, n. 46, p. 38625-36, 2012.

GIBERTINI, S. et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. **Cell Tissue Res,** v. 356, n. 2, p. 427-43, 2014.

GLASS, D. J. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Curr Top Microbiol Immunol,** v. 346, p. 267-78, 2010.

GOODMAN, C. A. et al. Smad3 induces atrogin-1, inhibits mTOR and protein synthesis, and promotes muscle atrophy in vivo. **Mol Endocrinol,** v. 27, n. 11, p. 1946-57, 2013.

GOODPASTER, B. H.; SPARKS, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. **Cell Metab,** v. 25, n. 5, p. 1027-1036, 2017.

GORDON, J. W. et al. Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985),** v. 90, n. 1, p. 389-96, 2001.

GREEN, H. J. et al. Metabolic adaptations to training precede changes in muscle mitochondrial capacity. **J Appl Physiol (1985),** v. 72, n. 2, p. 484-91, 1992.

GRUMATI, P. et al. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. **Autophagy,** v. 7, n. 12, p. 1415-23, 2011.

GUPTA, R. K. et al. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. **Nature,** v. 464, n. 7288, p. 619-23, 2010.

HALLAL, P. C. et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. **Lancet,** v. 380, n. 9838, p. 247-57, 2012.

HALLING, J. F. et al. PGC-1alpha promotes exercise-induced autophagy in mouse skeletal muscle. **Physiol Rep,** v. 4, n. 3, 2016.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell,** v. 159, n. 4, p. 738-49, 2014.

HE, C. et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. **Nature,** v. 481, n. 7382, p. 511-5, 2012.

HEINONEN, I. et al. Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans. **Physiology (Bethesda),** v. 29, n. 6, p. 421-36, 2014.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **J Biol Chem,** v. 242, n. 9, p. 2278-82, 1967.

HOOD, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985),** v. 90, n. 3, p. 1137-57, 2001.

HOOD, D. A. et al. Unravelling the mechanisms regulating muscle mitochondrial biogenesis. **Biochem J,** v. 473, n. 15, p. 2295-314, 2016.

HUANG DA, W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc,** v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

HUFFMAN, K. M. et al. Metabolite signatures of exercise training in human skeletal muscle relate to mitochondrial remodelling and cardiometabolic fitness. **Diabetologia,** v. 57, n. 11, p. 2282-95, 2014.

JAHREISS, L.; MENZIES, F. M.; RUBINSZTEIN, D. C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. **Traffic,** v. 9, n. 4, p. 574-87, 2008.

JAMART, C. et al. Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. **Eur J Appl Physiol,** v. 112, n. 8, p. 3173-7, 2012a.

JAMART, C. et al. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. **J Appl Physiol (1985),** v. 112, n. 9, p. 1529-37, 2012b.

JAMART, C. et al. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 305, n. 8, p. E964-74, 2013.

JANNIG, P. R. et al. Autophagy signaling in skeletal muscle of infarcted rats. **PLoS One,** v. 9, n. 1, p. e85820, 2014.

JOHANSEN, T.; LAMARK, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. **Autophagy,** v. 7, n. 3, p. 279-96, 2011.

JU, J. S. et al. Autophagy plays a role in skeletal muscle mitochondrial biogenesis in an endurance exercise-trained condition. **J Physiol Sci,** v. 66, n. 5, p. 417-30, 2016.

KALVARI, I. et al. iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. **Autophagy,** v. 10, n. 5, p. 913-25, 2014.

KIM, Y. A.; KIM, Y. S.; SONG, W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. **J Physiol Biochem,** v. 68, n. 2, p. 229-35, 2012.

KIRKIN, V. et al. A role for ubiquitin in selective autophagy. **Mol Cell,** v. 34, n. 3, p. 259-69, 2009.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy,** v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiol Genomics,** v. 5, n. 1, p. 45-52, 2001.

KOCH, L. G. et al. Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. **Circ Res,** v. 109, n. 10, p. 1162-72, 2011.

KODAMA, S. et al. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. **JAMA,** v. 301, n. 19, p. 2024-35, 2009.

KUZNETSOV, A. V. et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. **Mol Cell Biochem,** v. 183, n. 1-2, p. 87-96, 1998.

LAMB, G. D.; CELLINI, M. A.; STEPHENSON, D. G. Different Ca2+ releasing action of caffeine and depolarisation in skeletal muscle fibres of the rat. **J Physiol,** v. 531, n. Pt 3, p. 715-28, 2001.

LAMMERS, G. et al. Expression of genes involved in fatty acid transport and insulin signaling is altered by physical inactivity and exercise training in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 303, n. 10, p. E1245-51, 2012.

LANZA, I. R. et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. **Diabetes,** v. 57, n. 11, p. 2933-42, 2008.

LAWLER, J. M. et al. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. **Am J Physiol,** v. 265, n. 6 Pt 2, p. R1344-50, 1993.

LAZAROU, M. et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. **Nature,** v. 524, n. 7565, p. 309-314, 2015.

LEARY, S. C. et al. Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis. **Biochim Biophys Acta,** v. 1365, n. 3, p. 522-30, 1998.

LEE, I. M. et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **Lancet,** v. 380, n. 9838, p. 219-29, 2012.

LEE, J. E. et al. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. **Nature,** v. 540, n. 7631, p. 139-143, 2016.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, n. 16, p. 9306-11, 2001.

LENHARE, L. et al. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. **Exp Gerontol,** v. 97, p. 17-21, 2017.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metab,** v. 17, n. 4, p. 491-506, 2013.

LINDHOLM, M. E. et al. An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. **Epigenetics,** v. 9, n. 12, p. 1557-69, 2014.

LINDSKOG, C. et al. The human cardiac and skeletal muscle proteomes defined by transcriptomics and antibody-based profiling. **BMC Genomics,** v. 16, p. 475, 2015.

LIRA, V. A. et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. **FASEB J**, 2013.

LIU, T. et al. The mitochondrial elongation factors MIEF1 and MIEF2 exert partially distinct functions in mitochondrial dynamics. **Exp Cell Res,** v. 319, n. 18, p. 2893-904, 2013.

LIU, X. et al. AMPK binds to Sestrins and mediates the effect of exercise to increase insulin-sensitivity through autophagy. **Metabolism,** v. 64, n. 6, p. 658-65, 2015.

LOKIREDDY, S. et al. The ubiquitin ligase Mul1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. **Cell Metab,** v. 16, n. 5, p. 613-24, 2012.

LONG, Y. C.; ZIERATH, J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **J Clin Invest,** v. 116, n. 7, p. 1776-83, 2006.

LOVERSO, F. et al. Autophagy is not required to sustain exercise and PRKAA1/AMPK activity but is important to prevent mitochondrial damage during physical activity. **Autophagy,** v. 10, n. 11, 2014.

MAO, K. et al. The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. **Dev Cell,** v. 26, n. 1, p. 9-18, 2013.

MARTINEZ-REDONDO, V.; PETTERSSON, A. T.; RUAS, J. L. The hitchhiker's guide to PGC-1alpha isoform structure and biological functions. **Diabetologia,** v. 58, n. 9, p. 1969-77, 2015.

MASIERO, E. et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. **Cell Metab,** v. 10, n. 6, p. 507-15, 2009.

MCGEE, S. L. et al. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. **J Physiol,** v. 587, n. Pt 24, p. 5951-8, 2009.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature,** v. 387, n. 6628, p. 83-90, 1997.

MEGENEY, L. A. et al. bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts. **Dev Genet,** v. 19, n. 2, p. 139-45, 1996.

MERKWIRTH, C. et al. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. **Genes Dev,** v. 22, n. 4, p. 476-88, 2008.

MILLAY, D. P. et al. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. **Nature,** v. 499, n. 7458, p. 301-5, 2013.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. **Cell,** v. 140, n. 3, p. 313-26, 2010.

MOFARRAHI, M. et al. Autophagy and skeletal muscles in sepsis. **Plos One,** v. 7, n. 10, p. e47265, 2012.

MORTENSEN, S. P. et al. Inhibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing factors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg. **J Physiol,** v. 581, n. Pt 2, p. 853-61, 2007.

MU, J. et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. **Mol Cell,** v. 7, n. 5, p. 1085-94, 2001.

MURAKAWA, T. et al. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. **Nat Commun,** v. 6, p. 7527, 2015.

MURGIA, M. et al. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. **Cell Rep,** v. 19, n. 11, p. 2396-2409, 2017.

MURRAY, C. J. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet,** v. 380, n. 9859, p. 2197-223, 2012.

MYERS, J. et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **N Engl J Med,** v. 346, n. 11, p. 793-801, 2002.

N'DIAYE, E. N. et al. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. **EMBO Rep,** v. 10, n. 2, p. 173-9, 2009.

NARENDRA, D. P. et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. **PLoS Biol,** v. 8, n. 1, p. e1000298, 2010.

NIJTMANS, L. G. et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. **EMBO J,** v. 19, n. 11, p. 2444-51, 2000.

NOVAK, I. et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. **EMBO Rep,** v. 11, n. 1, p. 45-51, 2010.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell,** v. 148, n. 6, p. 1145-59, 2012.

OJUKA, E. O.; GOYARAM, V.; SMITH, J. A. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 303, n. 3, p. E322-31, 2012.

OTERA, H. et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. **J Cell Biol,** v. 191, n. 6, p. 1141-58, 2010.

OWUSU-ANSAH, E.; SONG, W.; PERRIMON, N. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. **Cell,** v. 155, n. 3, p. 699-712, 2013.

PAGANO, A. F. et al. Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise. **Med Sci Sports Exerc,** v. 46, n. 7, p. 1314-25, 2014.

PALMER, C. S. et al. Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. **J Biol Chem,** v. 288, n. 38, p. 27584-93, 2013.

PALMER, C. S. et al. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. **EMBO Rep,** v. 12, n. 6, p. 565-73, 2011.

PAMPLIEGA, O. et al. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. **Nature,** v. 502, n. 7470, p. 194-200, 2013.

PANKIV, S. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **J Biol Chem,** v. 282, n. 33, p. 24131-45, 2007.

PARK, S. H. et al. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. **J Appl Physiol (1985),** v. 92, n. 6, p. 2475-82, 2002.

PARONE, P. A. et al. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. **PLoS One,** v. 3, n. 9, p. e3257, 2008.

PENNA, F. et al. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. **Am J Pathol,** v. 182, n. 4, p. 1367-78, 2013.

PERRY, C. G. et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **J Physiol,** v. 588, n. Pt 23, p. 4795-810, 2010.

PILEGAARD, H. et al. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 279, n. 4, p. E806-14, 2000.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. **J Physiol,** v. 546, n. Pt 3, p. 851-8, 2003.

PIRINEN, E. et al. Pharmacological Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases improves fitness and mitochondrial function in skeletal muscle. **Cell Metab,** v. 19, n. 6, p. 1034-41, 2014.

POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol,** v. 95, n. 1, p. 1-9, 2010.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev,** v. 88, n. 4, p. 1243-76, 2008.

PRIOR, B. M.; YANG, H. T.; TERJUNG, R. L. What makes vessels grow with exercise training? **J Appl Physiol (1985),** v. 97, n. 3, p. 1119-28, 2004.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell,** v. 92, n. 6, p. 829-39, 1998.

QUIRÓS, P. M.; MOTTIS, A.; AUWERX, J. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 17, n. 4, p. 213-26, 2016.

REIS, R. S. et al. Scaling up physical activity interventions worldwide: stepping up to larger and smarter approaches to get people moving. **Lancet,** v. 388, n. 10051, p. 1337-48, 2016.

REMELS, A. H. et al. Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis. **Mol Cell Endocrinol,** v. 315, n. 1-2, p. 113-20, 2010.

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 287, n. 3, p. R502-16, 2004.

ROMANELLO, V. et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. **EMBO J,** v. 29, n. 10, p. 1774-85, 2010.

ROMANELLO, V.; SANDRI, M. Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. **Front Physiol,** v. 6, p. 422, 2015.

ROSE, A. J.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. **J Physiol,** v. 574, n. Pt 3, p. 889-903, 2006.

ROWE, G. C. et al. PGC-1alpha is dispensable for exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **PLoS One,** v. 7, n. 7, p. e41817, 2012.

RUAS, J. L. et al. A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. **Cell,** v. 151, n. 6, p. 1319-31, 2012.

RUIZ, J. R. et al. Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. **BMJ,** v. 337, p. a439, 2008.

SAFDAR, A. et al. Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. **J Biol Chem,** v. 286, n. 12, p. 10605-17, 2011.

SAKO, H.; YADA, K.; SUZUKI, K. Genome-Wide Analysis of Acute Endurance Exercise-Induced Translational Regulation in Mouse Skeletal Muscle. **PLoS One,** v. 11, n. 2, p. e0148311, 2016.

SALEEM, A.; CARTER, H. N.; HOOD, D. A. p53 is necessary for the adaptive changes in cellular milieu subsequent to an acute bout of endurance exercise. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 306, n. 3, p. C241-9, 2014.

SALTIN, B. et al. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. **Ann N Y Acad Sci,** v. 301, p. 3-29, 1977.

SANCHEZ, A. M. et al. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. **J Cell Biochem,** v. 113, n. 2, p. 695-710, 2012.

SARTORI, R. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 296, n. 6, p. C1248-57, 2009.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. **Gene,** v. 286, n. 1, p. 81-9, 2002.

SCHWALM, C.; DELDICQUE, L.; FRANCAUX, M. Lack of Activation of Mitophagy during Endurance Exercise in Human. **Med Sci Sports Exerc,** v. 49, n. 8, p. 1552-1561, 2017.

SCHWALM, C. et al. Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. **FASEB J,** v. 29, n. 8, p. 3515-26, 2015.

SHAID, S. et al. Ubiquitination and selective autophagy. **Cell Death Differ,** v. 20, n. 1, p. 21-30, 2013.

SHEN, Q. et al. Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. **Mol Biol Cell,** v. 25, n. 1, p. 145-59, 2014.

SHIBA-FUKUSHIMA, K. et al. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. **Sci Rep,** v. 2, p. 1002, 2012.

SMILES, W. J. et al. Acute low-intensity cycling with blood-flow restriction has no effect on metabolic signaling in human skeletal muscle compared to traditional exercise. **Eur J Appl Physiol,** v. 117, n. 2, p. 345-358, 2017.

STEENSBERG, A. et al. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 283, n. 6, p. E1272-8, 2002.

STERKY, F. H. et al. Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108, n. 31, p. 12937-42, 2011.

TALANIAN, J. L. et al. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 299, n. 2, p. E180-8, 2010.

TAYLOR, C. T. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. **Biochem J,** v. 409, n. 1, p. 19-26, 2008.

THEISS, A. L.; SITARAMAN, S. V. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. **Biochim Biophys Acta,** v. 1813, n. 6, p. 1137-43, 2011.

THOMAS, R. L.; KUBLI, D. A.; GUSTAFSSON, A. B. Bnip3-mediated defects in oxidative phosphorylation promote mitophagy. **Autophagy,** v. 7, n. 7, p. 775-7, 2011.

TRENDELENBURG, A. U. et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 296, n. 6, p. C1258-70, 2009.

TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **EMBO J,** v. 27, n. 2, p. 433-46, 2008.

TWIG, G.; SHIRIHAI, O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. **Antioxid Redox Signal,** v. 14, n. 10, p. 1939-51, 2011.

VAINSHTEIN, A. et al. Role of PGC-1alpha during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 308, n. 9, p. C710-9, 2015.

VIRBASIUS, J. V.; VIRBASIUS, C. A.; SCARPULLA, R. C. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. **Genes Dev,** v. 7, n. 3, p. 380-92, 1993.

VIZCAINO, J. A. et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. **Nucleic Acids Res,** v. 44, n. D1, p. D447-56, 2016.

VOLTARELLI, V. A. **Contribuição dos receptores β2-adrenérgicos na função e dinâmica mitocondriais da musculatura esquelética em resposta ao exercício físico aeróbico**. 2016. 139 (Doutorado). Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

WEI, Y. et al. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. **Cell,** v. 168, n. 1-2, p. 224-238 e10, 2017.

WHO. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Geneva: World Health Organization, 2009.

WILD, P.; MCEWAN, D. G.; DIKIC, I. The LC3 interactome at a glance. **J Cell Sci,** v. 127, n. Pt 1, p. 3-9, 2014.

WILKINSON, S. B. et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. **J Physiol,** v. 586, n. 15, p. 3701-17, 2008.

WISLOFF, U. et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science,** v. 307, n. 5708, p. 418-20, 2005.

WRIGHT, D. C. et al. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. **J Biol Chem,** v. 282, n. 1, p. 194-9, 2007.

YAMANO, K. et al. Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy. **Elife,** v. 3, p. e01612, 2014.

YAMASHITA, S. I. et al. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. **J Cell Biol,** v. 215, n. 5, p. 649-665, 2016.

YAN, Z.; LIRA, V. A.; GREENE, N. P. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. **Exerc Sport Sci Rev,** v. 40, n. 3, p. 159-64, 2012.

YANG, C. et al. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. **Biosci Rep,** v. 32, n. 5, p. 465-78, 2012.

YANG, Y. et al. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985),** v. 98, n. 5, p. 1745-52, 2005.

YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science,** v. 337, n. 6098, p. 1062-5, 2012.

YOUNG, P.; EHLER, E.; GAUTEL, M. Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. **J Cell Biol,** v. 154, n. 1, p. 123-36, 2001.

YU, M. et al. Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. **J Physiol,** v. 546, n. Pt 2, p. 327-35, 2003.

YU, R. et al. MIEF1/2 function as adaptors to recruit Drp1 to mitochondria and regulate the association of Drp1 with Mff. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 880, 2017.

ZHONG, Z. et al. Cloning and characterization of a novel human SPRYD4 gene encoding a putative SPRY domain-containing protein. **DNA Seq,** v. 19, n. 1, p. 68-72, 2008.

ZHOU, Q. G. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 24, n. 6, p. 459-64, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 – Lista de proteínas identificadas na fração mitocondrial muscular após uma sessão de exercício físico aeróbio em camundongos.

Uniprot	Gene	Log2MedDiff Ex vs R	p-value	LIR motif		MitoCarta2.0	Gupta List
				Predicted	Validated		
P70699	Gaa	0.587	0.00001				
Q7TPX2	Pla2g6	-1.511	0.0001				
Q9QZN4	Fbxo6	-0.862	0.0002				
Q8BUK6	Hook3	-1.650	0.0003				
Q3U2B2	Npc1	0.627	0.001				
Q3UCD9	Ctsd	0.971	0.001				
Q9ESW4	Agk	0.489	0.001			Sim	
Q78P93	Asah1	0.633	0.001				
Q543M3	Ctsl	0.522	0.001				
Q3UPD5	Prps1	-0.532	0.001				
Q9D009	Lipt2	0.556	0.001			Sim	
P98156	Vldlr	0.546	0.001				
Q9EPE9	Atp13a1	0.903	0.001				
E9QLJ0	Cmya5	-0.341	0.001				
Q3TEL0	Ppt1	0.837	0.002				
B2RXT3	Ogdhl	0.831	0.002			Sim	
Q2XSQ4	Plin3	-1.727	0.002				
P61961	Ufm1	-1.075	0.002				
Q3TG12	Farsb	0.566	0.002				
Q5RKP3	Rpl13	0.518	0.002				
O09165	Casq1	0.520	0.002				
Q61768	Kif5b	-0.324	0.002				
A4FUJ3	Kera	-1.262	0.002				
G3UXZ5	Psme1	-2.896	0.002				
Q91Z04	Arhgap1	-1.199	0.002				
Q8R2Q4	Gfm2	0.442	0.003			Sim	
Q3TB03	Gga1	-1.495	0.003				
Q3UPG8	Cacna1s	0.496	0.003				
B9EHY2	Zmpste24	0.500	0.003				
Q3UY32	Snapin	0.504	0.003				
E9Q6Q2	Wnk2	-2.034	0.003				
Q542E3	Cpa3	-1.074	0.003				
Q3TK92	Arih2	-1.855	0.003				
Q9DCU6	Mrpl4	0.633	0.003			Sim	
Q8CBY0	Gatc	0.368	0.004			Sim	
Q8K040	BC048546	0.418	0.004				
Q3UFI4	Rpl6	0.707	0.004				
G5E8R3	Pcx	0.585	0.004			Sim	
O70194	Eif3d	-0.397	0.004				
O35114	Scarb2	0.486	0.004				
Q3UND3	Fkbp2	0.692	0.004				
Q6PA06	Atl2	0.328	0.004				
Q3U5H6	Eif2s3x	-1.103	0.004				
Q9CWG8	Ndufaf7	0.503	0.005			Sim	
A0A0G2JFB4	Eif4e	-3.429	0.005				
Q3UHD6	Snx27	-1.498	0.005				
Q3U2Z6	Tpp1	0.577	0.005				
Q91YP2	Nln	0.580	0.005			Sim	
A2RT28	Mars2	0.453	0.005			Sim	
Q9DBN0	Apoa4	-1.316	0.005				
B2CY77	Rpsa	0.486	0.005				
Q6ZWN5	Rps9	0.508	0.005				
Q9DAT5	Trmu	0.562	0.005			Sim	
E9PVC6	Eif4g1	-1.499	0.006				
Q9D051	Pdhb	0.470	0.006			Sim	
Q9D0Y8	Mrpl52	0.779	0.006			Sim	
F8WIP5	Mylk4	-2.131	0.006				
Q99KK9	Hars2	0.833	0.006			Sim	
B1ARA3	Rpl26	0.491	0.006				
Q6WVG3	Kctd12	-0.943	0.006				
Q9DB73	Cyb5r1	0.503	0.006			Sim	
Q8BN57	E130311K13Rik	1.157	0.007			Sim	
P70335	Rock1	-0.675	0.007				
P61202	Cops2	-2.506	0.007				Sim
Q61833	Rpn2	0.503	0.007				
Q61081	Cdc37	-1.451	0.007				
S4R2K0	Pdf	0.259	0.007			Sim	
Q8CGY6	Unc45b	-1.442	0.007				
Q3TYL4	Dnajb5	-0.803	0.007				
Q8C6E3	Cat	0.693	0.007			Sim	

B7ZNM9	Top1mt	0.597	0.007			Sim	
Q4TVN0	Tbc1d15	-0.423	0.007		Sim		
Q9DBZ5	Eif3k	-0.910	0.008				
Q8C4D4	Cfap97	-2.246	0.008				
Q99LP6	Grpel1	0.375	0.008			Sim	
Q3UFV9	Dnajc3	0.367	0.008				
O09161	Casq2	0.709	0.008				
Q3TDQ1	Stt3b	0.486	0.008				
E9Q641	Nrap	-1.919	0.008				Sim
G3X9F4	Tmem143	0.360	0.008			Sim	
Q8R3K3	Ptcd2	0.347	0.008			Sim	
B1Q450	HBB1	-1.574	0.008				
Q7TNG8	Ldhd	0.707	0.009			Sim	
A2AIL4	Ndufaf6	0.563	0.009			Sim	
Q921M7	Fam49b	-2.430	0.009				
Q9D0D3	Mtpap	0.881	0.009			Sim	
O08997	Atox1	-0.646	0.009				
Q6S388	Plec	-0.786	0.009				
Q9CWD8	Nubpl	0.513	0.009			Sim	
Q3TDH5	Fam129a	-0.636	0.010				
Q9CY29	Psmd4	-1.651	0.010				
Q8VE88	Fam114a2	-0.659	0.010				
Q8BW35	Acox1	1.095	0.010			Sim	
Q9CZN8	Qrsl1	0.439	0.010			Sim	
W6PPA1	Ank3	-0.814	0.010				
T2HRB1	Itga4	-1.656	0.010				
A8DUK4	Hbbt1	-1.589	0.010				
Q9CZX7	Tmem55a	0.839	0.010				
Q9CQW1	Ykt6	-1.246	0.010				
Q9DBG1	Cyp27a1	0.478	0.010			Sim	
Q9DAM4	Csl	0.670	0.011			Sim	
Q564E8	Rpl4	0.718	0.011				
Q3UW40	Rpl24	0.746	0.011				
Q9CWI9	Rps23	0.861	0.011				
O88492	Plin4	-0.953	0.011				
Q9D2N4	Dtna	-1.020	0.011				
B9EKE9	Ddx3x	-0.807	0.011				
Q9D2G2	Dlst	0.348	0.011			Sim	
Q543W5	Kcnj2	1.652	0.011				
A2AKH7	Lrrc57	-0.853	0.012				
Q6NT99	Dusp23	-1.394	0.012				
Q8BIG7	Comtd1	0.461	0.012			Sim	
Q9DAV9	Tmem38b	1.063	0.012				
A8DUQ1	Hbbt1	-1.644	0.012				
Q5SWN9	Map2k3	-2.146	0.012				
O88587	Comt	0.361	0.012			Sim	
Q4ZJB3	Lims1	-0.471	0.012				Sim
A2RSB1	Nap1l4	-2.212	0.012				
Q52KC1	Eif4a2	-1.204	0.013				
Q6P8I6	Cox11	0.767	0.013			Sim	
Q3U8F5	Psmd12	-0.836	0.013				
Q8VCE6	Nt5m	0.766	0.013			Sim	
A0A0G2JG59	Nexn	-1.730	0.013				
P27773	Pdia3	0.347	0.013				
Q9CY28	Gtpbp8	0.806	0.013				
Q6ZWX6	Eif2s1	-1.037	0.013				
Q3U484	Ddx3y	-0.808	0.013				
Q07797	Lgals3bp	0.509	0.013				
Z4YJF5	Myom1	-1.183	0.013				
Q9WVH9	Fbln5	-1.007	0.013				
P18654	Rps6ka3	-2.090	0.013				
Q9D799	Mtfmt	0.921	0.014			Sim	
Q545F8	Rps4x	0.498	0.014				
Q3TGW2	Eepd1	0.393	0.014				
P61804	Dad1	0.420	0.014				
Q8BLY2	Tarsl2	-0.533	0.014				
Q921S7	Mrpl37	0.383	0.014			Sim	
F7B2D1	Sypl2	0.802	0.014				
Q543Z5	Map2k6	-1.538	0.014				
Q921R2	Rps13	0.477	0.014				
Q3TNL9	mt-Nd1	1.316	0.014				
Q4FZL1	Eif4a1	-1.556	0.014				
Q3UJK6	Sirt2	-0.878	0.014				
E9PUM4	Tln2	-1.518	0.015				
E9PWY9	Farsa	0.524	0.015				
P47199	Cryz	0.427	0.015			Sim	
Q9CQV5	Mrps24	0.456	0.015			Sim	
Q5M9M0	Rpl13a	0.456	0.015				
P63028	Tpt1	-1.243	0.015				
E9Q683	Cacna2d2	0.593	0.016				
K3W4M2	Ryr1	0.355	0.016				

Q9CY64	Blvra	-2.040	0.016				
A0A0A6YWN9	Usp19	-0.872	0.016				
G5E8R1	Tpm1	-1.519	0.016				
E0CZ78	Ppp3cb	-0.970	0.016				
Q3TUA1	Hnrnpk	-0.988	0.016				
Q8BTJ4	Enpp4	0.405	0.016				
Q14CH7	Aars2	0.292	0.016			Sim	
F6U7V1	Ryr2	0.350	0.017				
Q7TSH2	Phkb	-1.457	0.017				
Q62086	Pon2	0.395	0.017				
Q9JJL8	Sars2	0.401	0.017			Sim	
Q71LX8	Hsp90ab1	-1.391	0.017				
Q8BYM8	Cars2	0.569	0.017			Sim	
Q6XLQ8	Calu	0.548	0.017				
Q8K4F5	Abhd11	0.346	0.017			Sim	
P19182	Ifrd1	0.549	0.017				
A1L332	Atp8a1	0.289	0.017				
Q3TKP3	Atxn10	-1.211	0.017				
A6H611	Mipep	0.331	0.017			Sim	
Q8BRK8	Prkaa2	-0.906	0.017				
B2RUS7	Abcc8	0.571	0.017				
Q3UMR5	Mcu	0.339	0.018			Sim	
Q91YS7	Map2k2	-2.748	0.018				
Q9CZU7	Lamp2	1.004	0.018				
P97346	Nxn	-1.862	0.018				
Q3V2G1	Apoa1	-1.584	0.018				
Q5M9L9	Rps8	0.301	0.018				
Q545R3	Ndrg1	-1.604	0.018				Sim
D6RDC7	Wdr61	0.409	0.018				
Q9WTP6	Ak2	0.602	0.019			Sim	
Q9DC85	Rpl35a	0.725	0.019			Sim	
B7ZCV4	Coq4	0.323	0.019			Sim	
Q6P1B9	Bin1	-1.187	0.019				
Q9QYJ0	Dnaja2	-1.395	0.019				
Q8R3X4	Timm44	0.378	0.019			Sim	
Q3UM23	Rnh1	-2.361	0.019				
Q14C51	Ptcd3	0.262	0.019			Sim	
A0A0A6YW87	Cnih4	0.686	0.019				
Q4VAF0	Acyp1	0.635	0.019				
Q6IRT4	Eif3f	-0.865	0.019				Sim
Q80UY2	Kcmf1	-2.293	0.019				Sim
Q542X7	Cct2	-1.850	0.020				
Q8K3A0	Hscb	0.456	0.020			Sim	
Q8QZS9	Psmc6	-1.725	0.020				
Q61475	Cd55	0.346	0.020				
Q5M9P3	Rps19	0.258	0.020				
Q8R384	Myh11	-0.851	0.020				
Q8BJY1	Psmd5	-1.572	0.020				
A2RT05	Lass1	0.374	0.020				
Q3TL20	Rps2	0.549	0.020				
Q8CC21	Ttc19	0.416	0.020			Sim	
Q9CQ22	Lamtor1	0.511	0.020				
Q63810	Ppp3r1	-1.316	0.020				
Q3TBW2	Mrpl10	0.540	0.021			Sim	
Q3TCD4	Eci2	0.570	0.021			Sim	
Q5SSK3	Tefm	0.495	0.021			Sim	
Q80Y52	Hsp90aa1	-1.580	0.021				
Q9DBL7	Coasy	0.410	0.021			Sim	
Q3TCN2	Plbd2	0.280	0.021				
Q3TET5	Pmpcb	0.522	0.021			Sim	
A0A087WQS2	Bzw1	-1.104	0.021				
Q78ZM0	Snx3	-0.742	0.021				
Q9D1G3	Hhatl	0.708	0.021				
P63330	Ppp2ca	-2.200	0.021				
P11531	Dmd	-1.050	0.021				
Q5YLW3	Rps3	0.413	0.022				
O08529	Capn2	-1.198	0.022				
B7ZMP1	Xpnpep3	0.423	0.022			Sim	
Q9D6S7	Mrrf	0.642	0.022			Sim	
Q9CQF8	Mrpl57	0.335	0.022				
Q3UQL2	Cops3	-2.479	0.022				Sim
Q76MZ3	Ppp2r1a	-1.416	0.022				
Q9Z2X1	Hnrnpf	-0.859	0.022				
B2RXZ9	Mylk2	-1.613	0.022				
B9EKS7	Pgs1	0.570	0.022			Sim	
Q3TVS6	Ctsb	0.633	0.023				
Q6Y5D8	Arhgap10	0.622	0.023				
Q3ULU4	Nudt6	0.619	0.023			Sim	
Q8K2M0	Mrpl38	0.217	0.023			Sim	
A1L2Z3	Emc1	0.386	0.023				
Q5ND42	Pitpna	-2.213	0.023				

Q9Z1Z0	Uso1	-1.536	0.023				
Q8VDD5	Myh9	-0.598	0.023				
A0A0A6YX73	Prkar2a	-0.564	0.024				
Q9D7J9	Echdc3	0.331	0.024				
G3X914	Cul5	-1.149	0.024				
Q3UK05	Map2k1	-1.801	0.024				
Q8BKU2	Psmc4	-1.126	0.024				
Q8BFP9	Pdk1	0.488	0.024			Sim	
A0A0A0MQD3	Cacng6	0.781	0.024				
Q3TL79	Ahsa1	-1.957	0.024				
Q3UXD9	Pecr	0.818	0.024				
Q8CBA7	Phka1	-1.537	0.024				
Q3V2C6	Des	-0.986	0.024				
A2AEX8	Fhl1	-1.132	0.024				Sim
A2AI89	Phka1	-1.539	0.024				
P54731	Faf1	-0.929	0.024				
Q80ZS3	Mrps26	0.396	0.025			Sim	
Q91WK1	**Spryd4**	**0.683**	**0.025**			**Sim**	**Sim**
A0A0G2JDI9	Abcd3	0.456	0.025			Sim	
Q3U4H0	Mapre1	-2.064	0.025				
Q3TRG2	Zak	-1.574	0.025				
Q3UN47	Endog	0.386	0.025			Sim	
Q9D0L7	Armc10	0.508	0.025			Sim	
Q91YJ5	Mtif2	0.420	0.025			Sim	
Q6P9Q4	Fhod1	-2.827	0.025				
P80316	Cct5	-1.781	0.025				
Q8BP40	Acp6	0.474	0.025			Sim	
O70209	Pdlim3	-1.482	0.025				Sim
Q3TXV7	Hexa	0.537	0.025				
Q9D094	Hars	0.492	0.025				
Q9ER41	Tor1b	0.627	0.025				
Q8C5H8	Nadk2	0.459	0.026			Sim	
Q9DC41	Hspa5	0.350	0.026				
B1B1A8	Mylk	-1.925	0.026				
Q3ULN8	Ppp2r5a	-1.176	0.026				
Q3UHW2	Hsd17b4	0.597	0.026			Sim	
Q99JR6	Nmnat3	0.543	0.026			Sim	
Q3U4W8	Usp5	-2.024	0.027				
Q0VBA4	Rpl22l1	0.789	0.027				
Q3UGS9	Clpb	0.320	0.027			Sim	
Q8K370	Acad10	0.263	0.027			Sim	
Q4VBC9	Ndufb11	0.240	0.027			Sim	
Q3UVD6	Snta1	-0.990	0.027				
Q9CZP5	Bcs1l	0.308	0.027			Sim	
Q9EP69	Sacm1l	0.407	0.027				
Q3TRM2	Bzw2	-1.691	0.027				Sim
Q4FJM5	Rhob	0.216	0.028				
P07934	Phkg1	-1.559	0.028				
Q99KV1	Dnajb11	0.468	0.028				
I7HLV2	Rpl10	0.723	0.028				
G3UXG7	Csnk2b	-0.607	0.028				
Q9CY16	Mrps28	0.282	0.028			Sim	
J7NUP1	Irgm1	0.311	0.028				
Q569Y6	Ube2v1	-1.629	0.028				
Q3UZ58	Fdxr	0.332	0.028			Sim	
Q8R3X7	Pck2	0.532	0.028			Sim	
Q8BRD3	Nucb1	0.565	0.028				
Q8VCR3	Tmem242	0.418	0.028				
Q3UQT9	Smyd1	-1.669	0.028				
Q5D098	Psmb7	-0.940	0.028				
Q9CY10		-1.612	0.028				
Q80Y25	Capn1	-1.252	0.028				
Q3TSW9	Tfam	0.420	0.028			Sim	Sim
Q9D7F5	Ube2d3	-2.470	0.028				
A0A087WR97	Tardbp	-1.143	0.029				
P97443	Smyd1	-1.631	0.029				
D3YUN3	Tnni1	-0.768	0.029				
Q9JLN9	Mtor	0.162	0.029				
Q9CYT6	Cap2	-1.454	0.029				
Q8BLG5	Poglut1	0.540	0.029				
Q9CX34	Sugt1	-2.047	0.029				
A2A6I5	Tnnt3	-1.377	0.029				
Q6PFC8	Slc12a5	0.662	0.029				
Q564G1	Tpm1	-1.272	0.029				
Q8CC36	Cdnf	0.439	0.029				
Q8VC94	Rpl11	0.480	0.029				
Q571A2	Cul2	-1.209	0.030				
Q4VBX4	Ube2v2	-1.478	0.030				
Q3TAS6	Emc10	0.388	0.030				
Q9R0X4	Acot9	0.489	0.030			Sim	
Q6PB52	Lrpap1	0.531	0.030				

Q3TU25	Ddx17	-0.853	0.030				
Q3TY98	Atp6v0a1	0.590	0.030				
Q9JMA1	Usp14	-2.893	0.030				
Q922A2	Anxa7	-1.387	0.031				
Q3U9B7	Ctsc	0.422	0.031				
Q9D0B5	Tstd3	0.658	0.031			Sim	
Q58EU3	Rps2	0.614	0.031				
Q3U1S6	Csde1	-1.018	0.031				
Q8CI70	Lrrc20	-2.469	0.031				
Q3U131	Igfbp7	0.638	0.031	Sim			
Q8BHC4	Dcakd	0.326	0.031			Sim	
Q5M9N8	Rpl7	0.429	0.031				
Q00897	Serpina1d	-0.820	0.031				
P56213	Gfer	0.435	0.032			Sim	
Q3UQS9	Myom2	-1.177	0.032				
Q545S0	Tst	0.540	0.032			Sim	
Q6XMP4	Aars	-1.071	0.032				
Q6IRU2	Tpm4	-0.676	0.032				
Q497K3	Snrpf	-0.672	0.032				
Q4FE56	Usp9x	-3.387	0.033				
Q99KC8	Vwa5a	-1.932	0.033				
Q8K0D5	Gfm1	0.379	0.033			Sim	
P08003	Pdia4	0.215	0.033				
Q9CQQ0	Smim8	0.644	0.033				
Q91VA6	Poldip2	0.718	0.033			Sim	
Q9WTP7	Ak3	0.389	0.033			Sim	
Q5FWJ3	Vim	-0.293	0.033				
Q8R2R6	Mtg1	0.582	0.033			Sim	
A2A542	Cacnb1	0.496	0.033				
Q69Z43	Nek9	-2.066	0.033				
Q9CQ19	Myl9	-0.725	0.033				
Q3TGU7	Pa2g4	0.537	0.033				
O70373	Xirp1	-4.147	0.034				
Q5F2C5	Acsl6	0.162	0.034			Sim	
Q91ZJ5	Ugp2	-1.584	0.034				
Q3TLE2	Fermt2	-1.169	0.034				
E9QQ93	Xirp1	-3.486	0.034				
Q8R1B4	Eif3c	-0.626	0.034				
Q8VE95	C030006K11Rik	0.609	0.034			Sim	
Q52KG9	Cct6a	-1.538	0.034				
Q545Y3	Tpm1	-1.291	0.034				
Q8VCT4	Ces1d	0.621	0.034				
O08915	Aip	-1.636	0.034				Sim
Q9JMC3	Dnaja4	-1.119	0.034				
Q8CC88	Vwa8	0.381	0.034			Sim	
Q8BHN8	Elmod2	0.772	0.035				
Q99J29	Scpep1	1.016	0.035				
Q8BTS0	Ddx5	-0.716	0.035				
Q3UGC8	Pcca	0.467	0.035			Sim	
Q9D967	Mdp1	-0.770	0.035				
F6TJX7	Obscn	0.237	0.035	Sim		Sim	
Q3TRH8	Capzb	-0.915	0.035				
Q8BGX2	1810026J23Rik	0.317	0.035				
Q8JZZ5	Pitpnb	-1.078	0.035				
Q8BIJ7	Rufy1	-1.190	0.035				Sim
B2RTC8	Slc25a31	0.491	0.035			Sim	
Q99JT1	Gatb	0.565	0.035			Sim	
D3Z285	Nfu1	0.688	0.036			Sim	
A0A0A6YXL6	Lrba	-1.215	0.036				
Q5NCS9	**Mief2**	**0.374**	**0.036**	**Sim**		**Sim**	
Q64727	Vcl	-1.062	0.036				
P13020	Gsn	-0.624	0.036				
Q6GU23	Stat3	-2.905	0.036				Sim
Q9CTY5	Micu3	0.313	0.036			Sim	
Q06138	Cab39	-1.152	0.036				
Q8BFZ3	Actbl2	-1.178	0.036				
Q8CAK1	Iba57	0.477	0.036			Sim	
Q9D832	Dnajb4	-0.772	0.037				
A2A6K0	Tnni2	-1.411	0.037				
D3Z3Z3	Cacnb3	0.490	0.037				
Q4KL81	Actg1	-0.828	0.037				
Q544D4	Sgcd	-0.947	0.037				
Q8C7C3	Tpm3	-1.155	0.037				
Q8VH34	Lamp1	0.552	0.037				
B9EHN0	Uba1	-1.681	0.037				
Q99JY0	Hadhb	0.324	0.038			Sim	
Q9CY93	Rpl31	0.692	0.038				
P70698	Ctps1	-0.767	0.038				
Q4VAG4	Rpl22	0.756	0.038				
Q545I6	Ctsz	0.879	0.038				
G3X9V0	Psme2	-1.108	0.038				

A0A509	Myot	-1.232	0.038				
Q9DBG5	Plin3	-0.827	0.039				
P16045	Lgals1	-1.548	0.039				
Q8BTX5	Eif3h	-0.884	0.039				Sim
Q9WV06	Ankrd2	-2.181	0.039				
A1ILG8	Vps13c	-1.239	0.039				
Q9R112	Sqrdl	0.495	0.039			Sim	
A4FUS1	Rps16	0.463	0.039				
D3YWF6	Otub1	-1.331	0.040				Sim
Q8R5A0	Smyd2	-0.854	0.040				
Q9CPW2	Fdx1l	0.718	0.040			Sim	
Q8QZS1	Hibch	0.536	0.040			Sim	
Q58E64	Eef1a1	-0.431	0.040				
Q5KU03	Gsk3b	-1.840	0.040				
Q99N15	Hsd17b10	0.373	0.040			Sim	
Q921V3	Nfs1	0.455	0.040			Sim	
P36552	Cpox	0.431	0.040			Sim	
A2A6I8	Tnnt3	-1.399	0.041				
Q9D0G0	Mrps30	0.391	0.041			Sim	
Q9CQM9	Glrx3	-1.741	0.041				
Q8VCX5	Micu1	0.275	0.041			Sim	
Q6ZQ84	mKIAA0617	-1.352	0.041				
Q8VBV7	Cops8	-0.748	0.041				
B2RRX2	Ppp3ca	-1.165	0.041				
Q3UFQ4	Ube2d1	-2.132	0.041				
Q3UE06	Nploc4	-1.365	0.041				
Q9JHS3	Lamtor2	0.687	0.042				
Q9D6R2	Idh3a	0.355	0.042			Sim	
E9QP49	Ehbp1l1	-0.831	0.042				
Q8VBT1	Txlnb	-1.014	0.042				
E9PUE8	Abcc9	0.524	0.042				
Q3U0I3	Cct3	-1.379	0.042				
Q91X72	Hpx	0.244	0.042				
Q3TG75	Oat	0.477	0.042			Sim	
Q3UC73	Ppic	0.445	0.042				
Q6ZPX7	mKIAA1101	-1.899	0.042				
Q9QZE5	Copg1	-2.201	0.042				
Q8R5C5	Actr1b	-0.430	0.042				
P49813	Tmod1	-0.597	0.043				
F8WIE5	Hectd1	-1.527	0.043				
A2AGN7	Psmc3	-1.467	0.043				
Q9DB27	Mcts1	-0.693	0.043				
Q543X6	Map2k4	-1.358	0.043				
Q8K1M6	Dnm1l	-1.681	0.043			Sim	
Q07417	Acads	0.354	0.043			Sim	
Q58E65	Metap2	-1.417	0.043				
Q3T9X3	Dnm2	-1.211	0.043				
E9PXM6	Slc29a1	0.319	0.043				
P62075	Timm13	0.845	0.044			Sim	
A2RTT4	Ube2n	-1.616	0.044				
Q9D6Z0	Alkbh7	0.399	0.044			Sim	
Q9DC29	Abcb6	0.511	0.044			Sim	
Q9WVJ3	Cpq	0.562	0.044				
Q3TZ89	Sec31b	0.604	0.044				
D3YX34	Dctn1	-0.600	0.044				
Q3UN55	Cpt2	0.399	0.044			Sim	
P50396	Gdi1	-2.497	0.044				
Q78KL9	Rexo2	0.415	0.044			Sim	
Q8BYA0	Tbcd	-1.248	0.044				
F6RQN3	Atp2a1	1.338	0.045				
Q3V235	**Phb2**	**0.271**	**0.045**		**Sim**	**Sim**	
Q3TDN8	Bphl	0.916	0.045			Sim	
Q8JZN5	Acad9	0.364	0.045			Sim	
Q8K411	Pitrm1	0.412	0.045			Sim	
G3UW70	Lamtor5	0.602	0.046				
Q3U2A8	Vars2	0.417	0.046			Sim	
P68134	Acta1	-0.867	0.046				
Q5XJF6	Rpl10a	0.485	0.046			Sim	
B9EK92	Rasip1	-0.794	0.046				
A2A7A7	H6pd	0.683	0.046				
Q8BK72	Mrps27	0.627	0.046			Sim	
Q14DS6	Lars2	0.330	0.046			Sim	
Q3TQY2	Dctn4	-0.432	0.046				
Q9CXK3	Actc1	-0.915	0.046				
Q8C5M4	Pdcd6	-0.905	0.047				
E9Q179	Grsf1	0.394	0.047			Sim	
Q9CZU6	Cs	0.699	0.047			Sim	
Q3UVB1	Mb	-0.603	0.047				
Q3T9U1	Mob1b	-1.738	0.047				
Q8CCX9	Mrpl39	0.251	0.047			Sim	
Q3UMP2	Hmgcl	0.451	0.047			Sim	

Q5PPQ7	Coro1c	-0.846	0.047				
B1AQF4	Dusp3	-0.967	0.047				
Q3V2T7	mt-Cytb	0.831	0.048				
P50516	Atp6v1a	0.619	0.048				
Q14AI7	Cops4	-1.849	0.048				Sim
P21107	Tpm3	-1.056	0.048				
Q14B21	Mrpl9	0.380	0.048			Sim	
Q3TGR2	Fgb	-0.505	0.048				
Q5XKE0	Mybpc2	-1.482	0.048				
Q5SRX1	Tom1l2	-1.057	0.048				
Q5SUC3	Canx	0.245	0.049				
Q6PAM0	Prkab2	-0.712	0.049				
Q8BTQ1	Elavl1	-0.629	0.049				
P32020	Scp2	0.568	0.049			Sim	
Q8CI12	Smtnl2	-1.990	0.049				
G5E8Q5	Dcun1d2	-1.626	0.049				
Q3UL22	Cct8	-1.839	0.049				
Q60960	Kpna1	-1.217	0.049				
J7PDL1	Ifggd1	0.608	0.049				
D6REF7	Sgpl1	0.522	0.049				
Q3UN19	Tmod4	-1.498	0.049				
Q3UHW9	Cfl2	-1.313	0.049				
Q91YC8	Ddb1	-0.681	0.049				
Q9CQF0	Mrpl11	0.213	0.049			Sim	
Q8K215	Lyrm4	0.451	0.049			Sim	
P42232	Stat5b	-1.794	0.050				
P38647	Hspa9	0.354	0.050			Sim	
Q80TM2	Tln1	-1.919	0.050				
D3Z7X0	Acad12	0.314	0.050			Sim	
Q9DCM0	Ethe1	0.463	0.050			Sim	
P67778	Phb	0.205	0.050			Sim	
Q63ZW9	Copa	-1.389	0.050				
A2AQ53	Fbn1	-0.895	0.050				
Q9QZ83	Actg1	-0.643	0.050				
Q8BPW9	Dnpep	0.562	0.050				
Q9CZW4	Acsl3	0.199	0.050				
A2AMM0	Murc	-0.674	0.050				
O88990	Actn3	-1.117	0.050				
D3YW48	Capns1	-0.758	0.051				
Q9R0Y5	Ak1	-1.589	0.051				
Q91WM2	Cecr5	0.709	0.051			Sim	
Q58EU6	Rpl5	0.556	0.051				
D6RJ50	Parl	0.386	0.051			Sim	
A2APY7	Ndufaf5	0.333	0.051			Sim	
A2AUR7	Rsu1	-0.909	0.051				
Q91YP0	L2hgdh	0.308	0.051			Sim	
Q8BTU5	Psma1	-0.748	0.051				
Q8VCM5	Mul1	0.354	0.052			Sim	
Q9JLZ3	Auh	0.353	0.052			Sim	
Q3TP13	Slc27a1	0.294	0.052				
Q8VHX6	Flnc	-1.522	0.052				
Q3UIJ3	Actc1	-0.882	0.052				
Q9D338	Mrpl19	0.350	0.053			Sim	
B7FAV1	Flna	-0.750	0.053				
Q561M1	Acp1	-1.936	0.053				
Q99MN9	Pccb	0.399	0.053			Sim	
D3YWG2	Chid1	0.271	0.053				
Q3TFE8	Kpnb1	-1.263	0.053				
P13707	Gpd1	-1.062	0.053				
Q9ERK4	Cse1l	-1.932	0.053				Sim
Q9JKS4	Ldb3	-0.953	0.053				Sim
Q99PC9	Ppp2r5d	-1.443	0.053				
A2CEK3	Pgm2	-1.700	0.053				
Q80Y09	Pdcd6ip	-1.348	0.054				
P57759	Erp29	0.254	0.054				
Q62048	Pea15	-0.350	0.054				
Q75WC0	Polg	0.478	0.054			Sim	
Q61655	Ddx19a	-1.274	0.054				
P85094	Isoc2a	0.526	0.054			Sim	
Q8C7C4	Hmgb1	-0.494	0.054				Sim
Q9JIK9	Mrps34	0.184	0.054			Sim	
P61082	Ube2m	-0.938	0.054				
Q4FJX9	Sod2	0.646	0.055			Sim	
Q8VDI7	Ubac1	-1.371	0.055				
P60335	Pcbp1	-1.290	0.055				
Q9ES74	Nek7	-1.196	0.055				
Q8K013	Gtpbp10	0.317	0.055			Sim	
Q99M71	Epdr1	0.508	0.055				
Q6PDI5	Ecm29	-2.114	0.055				
O55222	Ilk	-1.030	0.055				
Q3UEM8	Hspa5	0.307	0.056				

Q9JKS4	Ldb3	-0.965	0.056				Sim
A2AUC9	Klhl41	-0.845	0.056				
E9PYJ9	Ldb3	-0.954	0.056				Sim
Q3U6V3	Hspa5	0.286	0.056				
Q3UCB5	Bckdk	0.426	0.056			Sim	
Q3UUX9	Gdi2	-1.282	0.056				
F5BFH0	Clec2d	0.118	0.056				
P46460	Nsf	0.234	0.056				
B2RSC8	Nedd4	-0.669	0.057				
P62843	Rps15	0.602	0.057				
Q5SW88	Rab1	0.141	0.057				
Q542H7	Fabp4	-0.581	0.057				
Q6ZWZ4	Rpl36	0.643	0.057				
Q9D1R6	Tpm2	-1.184	0.057				
Q8K239	Tsfm	0.469	0.057			Sim	
Q6IM74	Rtn2	0.355	0.057				
Q3TW74	Mthfd1	-1.007	0.058			Sim	
Q61102	Abcb7	0.429	0.058			Sim	
Q69ZP3	Pnkd	0.293	0.058				
Q9DCV4	Rmdn1	0.735	0.058			Sim	
Q6ZQ38	Cand1	-3.712	0.058				
A8Y5T6	Pars2	0.448	0.059			Sim	
Q9D1M0	Sec13	-0.750	0.059				
Q9JJV2	Pfn2	-1.635	0.059				
Q3U8H8	Nutf2	-2.687	0.059				
Q8K2Y7	Mrpl47	0.454	0.059			Sim	
P99024	Tubb5	-1.612	0.059				
Q6ZWQ6	Ube2k	-1.109	0.060				
Q3U926	Ptpmt1	0.326	0.060			Sim	
Q9JKS4	Ldb3	-0.916	0.060				Sim
Q68FL6	Mars	-0.674	0.060				
Q8R2K3	Ssbp1	1.295	0.060			Sim	
Q542I9	Psmc1	-0.747	0.060				
G3X922	Dnajc13	-0.366	0.060				
Q9D6F9	Tubb4a	-1.761	0.060				
Q3UQ84	Tars2	0.373	0.060			Sim	
Q545F0	Mif	-1.065	0.060				
Q0VGP9	Capn3	-1.504	0.061				
K3W4R2	Myh14	-1.355	0.061				
Q9CWU3	Ppp2r2a	-1.191	0.061				
Q6P549	Inppl1	-1.841	0.061				
Q3UE40	Gna13	0.232	0.061				
P42208	Sept2	-0.417	0.062				
Q548B0	Wbscr16	0.435	0.062			Sim	
Q9D7N3	Mrps9	0.424	0.062			Sim	
Q8BIW1	Prune	-1.732	0.062				
Q922Z3	Trap1	0.564	0.062			Sim	
Q3UCC6	Sucla2	0.720	0.062			Sim	
Q9QZ23	Nfu1	0.441	0.062			Sim	
Q8C0E1	Ppp2r4	-1.231	0.062				
P14115	Rpl27a	0.538	0.062				
Q99KR1	Psmc5	-1.361	0.062				
Q5RJV4	Pgm2	-1.635	0.062				
Q4FJZ6	Gclm	-1.020	0.062				
Q3UK08	Tsg101	-1.519	0.063				
Q3TPM3	Cul1	-1.190	0.063				
Q3TWG9	Serpinh1	0.265	0.063				
Q6P6L5	Mybpc1	-1.381	0.063				
D3YU50	Mybpc1	-1.381	0.064				
Q99N96	Mrpl1	0.462	0.064			Sim	
P68372	Tubb4b	-1.724	0.064				
E9PX24	Lyrm9	1.086	0.064				
Q6ZQ73	Cand2	-1.749	0.064				
Q91VT4	Cbr4	0.566	0.064			Sim	
Q3TDX2	Vps4a	-0.932	0.065				
E9Q9K5	Trdn	0.709	0.065				
Q8K411	Pitrm1	0.396	0.065			Sim	
Q561N5	Rps18	0.526	0.065			Sim	
Q4VA93	Prkca	0.530	0.065				
Q91V79	Fitm1	0.768	0.065				
Q9D0L4	Adck1	0.346	0.065			Sim	
O08532	Cacna2d1	0.449	0.066				
Q6PDS4	Fxn	0.706	0.066			Sim	
E9Q4Z2	Acacb	-1.431	0.066			Sim	
Q9JLR1	Sec61a2	0.687	0.066				
Q9WUM5	Suclg1	0.303	0.066			Sim	
P50543	S100a11	-0.459	0.066				
P62631	Eef1a2	-0.381	0.066				
Q8K4Z3	Apoa1bp	0.730	0.066			Sim	
D3Z6B9	Aldh1l2	0.372	0.066			Sim	
F6VXK7	Myo15	2.375	0.066				

A2AN08	Ubr4	-2.218	0.066				
Q62087	Pon3	0.326	0.066				
Q3T9Z2	Grhpr	0.289	0.066			Sim	
Q3TDU1	Arcn1	-0.978	0.067				
Q99JB2	Stoml2	0.273	0.067			Sim	
Q5SUR3	Skp1a	-0.597	0.067				
P20444	Prkca	0.560	0.067				
Q8VHE6	Dnah5	0.355	0.067				
Q4FJX1	Kpna4	-3.393	0.067				
Q9CWK0	Rpl14	0.368	0.067				
Q9D1C8	Vps28	-0.561	0.068				
Q91VZ1	Snx2	-0.513	0.068				
Q8BFY6	Pef1	-1.513	0.068				
Q8BGU0	Cyp4f39	0.791	0.068				
Q8R0W0	Eppk1	-0.519	0.068				
Q6GTX3	Apoe	-0.838	0.068				
O54984	Asna1	-0.494	0.068				
Q3THE2	Myl12b	-0.680	0.068				
Q9EPL8	Ipo7	-1.048	0.068				
Q69ZG4	Gpam	0.217	0.069			Sim	
Q543C5	Ogn	-1.359	0.069				
Q9JI91	Actn2	-0.904	0.069				
F6RK81	Ergic3	0.458	0.069				
Q3TJF2	Ola1	-2.664	0.069				
Q9ET22	Dpp7	0.371	0.069				
A2AE03	Eif3i	-0.553	0.070				
Q7TMM9	Tubb2a	-1.693	0.070				
B9EIE8	Lyrm7	0.507	0.070			Sim	
Q6NXX7	Abce1	-1.443	0.070				
Q78HW2	Tmem186	0.615	0.070			Sim	
Q5M8N4	Sdr39u1	0.435	0.070			Sim	
E9QPQ8	Mrpl48	0.457	0.071			Sim	
Q3TVW6	Lmcd1	-1.466	0.071				Sim
F8WIV2	Serpinb6a	-0.739	0.071				
Q9JK37	Myoz1	-0.926	0.071				
Q3TXS7	Psmd1	-2.106	0.071				
P21981	Tgm2	-0.618	0.072				
A0A0A6YXD3	Ndufs2	0.393	0.072			Sim	
P97807	Fh	0.446	0.072				
Q80ZZ0	Ehd1	-0.875	0.072				
A0A0G2JGL8	Dhx30	0.286	0.072			Sim	
Q6P5E4	Uggt1	0.282	0.072				
Q8BKZ9	Pdhx	0.351	0.072			Sim	
Q7TND9	Dbt	0.445	0.072			Sim	
Q3U6L3	Glrx	-1.407	0.072				
D3Z7P3	Gls	0.595	0.072			Sim	
Q8K3J2	Bax	-0.169	0.072			Sim	
Q3B7Z2	Osbp	-0.740	0.072				
P62274	Rps29	0.437	0.073				
Q8JZU0	Nudt13	0.458	0.073			Sim	
Q8R1G5	Mthfsl	0.522	0.073				
Q7TMG8	Gbas	0.448	0.073			Sim	
E9Q2Q9	Sh3bgr	-1.123	0.073				
Q3UHB1	Nt5dc3	0.478	0.073			Sim	
O35864	Cops5	-0.828	0.073				Sim
Q3UBA6	Hspa8	-0.290	0.073				
G0YZM8	Mybpc1	-1.332	0.074				
Q9ERU9	Ranbp2	-0.486	0.074				
G3UXK5	Bicd1	0.206	0.074				
Q9JHU4	Dync1h1	-0.320	0.074				
Q3TE95	Rcn2	0.292	0.074			Sim	
Q5SX39	Myh4	-1.270	0.074				
D3Z7P3	Gls	0.603	0.075			Sim	
P47857	Pfkm	-0.769	0.075				
Q564F4	Cct4	-1.430	0.076				
Q8CJ53	Trip10	-0.946	0.076				
Q9WVA4	Tagln2	-0.578	0.076				
Z4YKC4	Eif4g3	-2.399	0.076				
Q9CQN7	Mrpl41	0.289	0.076			Sim	
Q9CWQ7	Ufd1l	-1.297	0.076				
Q2V056	Chchd10	0.560	0.076			Sim	
D3YXS8	Tomm40l	0.474	0.076			Sim	
Q3TDA7	Pacsin2	-0.610	0.076				
Q505A8	Rpl39	1.079	0.076				
Q9DCY1	Ppib	0.410	0.076				
Q9D1I6	Mrpl14	0.470	0.076			Sim	
E9Q1K3	Add1	-0.485	0.077				
Q924L1	Letmd1	0.522	0.077			Sim	
Q542I7	Lamtor3	0.776	0.077				
A2AE45	Sypl2	0.903	0.077				
Q8C1D0	Spcs3	0.387	0.077				

Q6NS79	Diap1	-3.160	0.077				
Q8R4N0	Clybl	0.472	0.078			Sim	
A2A547	Rpl19	0.652	0.078				
Q505D7	Opa3	0.305	0.078			Sim	
P97478	Coq7	0.722	0.078			Sim	
Q8BPC7	App	-0.624	0.078				
O08749	Dld	0.313	0.078			Sim	
Q811L7	Hnrnph1	-1.005	0.078				
P37804	Tagln	-0.540	0.078				
Q8BFR5	Tufm	0.639	0.078			Sim	
Q5SUW0	Grb10	-0.817	0.079				
D3YWB8	Rps6kb2	-0.744	0.079				
E0CXB1	Psma6	-0.878	0.079				
Q3U9Y8	Psmd2	-0.817	0.079				
Q543M7	Kpna3	-1.756	0.079				
Q3U2G2	Hspa4	-1.729	0.079				
Q5FW91	Tuba3a	-1.176	0.079				
P68368	Tuba4a	-1.373	0.079				
Q5XPI3	Rnf123	-1.671	0.080				
Q8CGK3	Lonp1	0.526	0.080			Sim	
Q8CI22	Akr1b10	0.594	0.080			Sim	
Q8K0W7	Nars2	0.566	0.080			Sim	
Q561N4	Ube2l3	-1.078	0.080				
Q3TJG6	Ptges3	-1.044	0.080				
P50427	Sts	0.278	0.080				
Q53ZN9	Slc4a1	-0.641	0.080				
Q3UQM8	Coq3	0.395	0.081			Sim	
E9QNT8	Ank1	-0.615	0.081				
Q921M8	Usp4	-1.003	0.081				
Q9D1D4	Tmed10	0.344	0.081				
P62342	Selt	0.242	0.081				
Q9DBL1	Acadsb	0.463	0.081			Sim	
A6H644	Ppp1r12b	-0.714	0.081				
Q3UBP0	Adssl1	-1.359	0.081				
Q3U186	Rars2	0.457	0.082			Sim	
Q3TMZ1	Pycr2	0.847	0.082			Sim	
Q99PT1	Arhgdia	-1.027	0.082				
P51175	Ppox	0.353	0.082			Sim	
P35385	Hspb7	-1.014	0.082			Sim	
Q5M8R8	Rplp0	0.593	0.082				
Q9ERD7	Tubb3	-1.519	0.082			Sim	
Q684Q6	Mpp1	-0.339	0.082				
Q9D7A0	Smtn	-0.988	0.083				
Q9D273	Mmab	0.386	0.083			Sim	
Q9CXJ1	Ears2	0.338	0.083			Sim	
Q9DBH5	Lman2	0.121	0.084				
Q91YQ8	Amacr	0.272	0.084			Sim	
Q91YK1	Slc25a13	0.340	0.084			Sim	
Q9DB20	Atp5o	0.160	0.084			Sim	
G3UWR2	Gigyf2	-0.817	0.084				
Q9CWE0	Mtfr1l	0.452	0.085			Sim	
Q6ZWQ9	Myl12a	-0.683	0.085				
Q78J03	Msrb2	0.873	0.085			Sim	
Q8BKC5	Ipo5	-2.722	0.085				
P48410	Abcd1	0.838	0.085			Sim	
A1E285	Oxct1	0.650	0.085			Sim	
Q924D0	Rtn4ip1	0.367	0.085			Sim	
Q99LC3	Ndufa10	0.165	0.085			Sim	
D6RH49	Rps27l	0.425	0.086				
Q9CWU6	Uqcc1	0.268	0.086			Sim	
Q8R5L1	C1qbp	0.438	0.086			Sim	
G3UXX3	Spr	-0.908	0.086			Sim	
P09542	Myl3	-1.089	0.086				
Q8BFY9	Tnpo1	-1.007	0.086				
Q3UGY4	Sptb	-0.563	0.086				
P50428	Arsa	0.638	0.087				
Q9D023	Mpc2	0.392	0.087			Sim	
E9PWZ3	Rpl3l	0.958	0.087				
Q99L13	Hibadh	0.476	0.087			Sim	
B2RWW8	Myh8	-1.266	0.087				
Q99KI0	Aco2	0.434	0.087			Sim	
B2RQV1	Naa25	-0.470	0.087				
Q9DCB8	Isca2	0.303	0.088			Sim	
Q4PJX1	Odr4	0.257	0.088				
B2M1R7	Pcbp2	-1.442	0.088				
Q3TM70	Ehd4	-1.208	0.088				
Q61990	Pcbp2	-1.420	0.088				
Q9WTL7	Lypla2	-2.756	0.089				
P48678	Lmna	-0.857	0.089				
Q8BMF3	Me3	0.689	0.089			Sim	
Q8CHS7	Dhrs7c	0.315	0.089				

Q9QYG0	Ndrg2	-1.055	0.090				Sim
Q149D1	Thnsl1	0.726	0.090			Sim	
Q5M9J2	Hint2	0.357	0.090			Sim	
Q8BK08	Tmem11	0.290	0.090			Sim	
Q3TJZ6	Fam98a	0.476	0.090				
P59266	Fitm2	1.836	0.090				
P63101	Ywhaz	-1.006	0.090				
Q5BLJ9	Rpl27	0.499	0.090				
Q8R104	Sirt3	0.250	0.090			Sim	
Q4FK88	Anxa1	-1.090	0.091				
P97384	Anxa11	-0.966	0.091				
Q3UWP8	Calr	0.263	0.091		Sim		
O08807	Prdx4	-1.217	0.091			Sim	
Q3TVJ8	Ssr4	0.131	0.091				
Q642K0	Myl6	-0.650	0.091				
P68369	Tuba1a	-1.055	0.091				
Q8VDK1	Nit1	0.783	0.092			Sim	
D3Z315	Cope	-0.656	0.092				
Q80T68	Myh10	-1.070	0.092				
Q9CR98	Fam136a	1.291	0.092			Sim	
Q2TBE6	Pi4k2a	0.340	0.092				
Q3UVJ2	Cap1	-0.650	0.092				
A2AT93	Plcb4	-0.669	0.093				
Q8BGT5	Gpt2	0.536	0.093			Sim	
Q5PR09	Rpl32	0.956	0.093				
Q3TPZ5	Dctn2	-0.356	0.093				
Q52L50	Rap1b	0.084	0.093				
Q4VA32	Acot13	0.444	0.094			Sim	
V9GWU5	Tpd52l2	-0.690	0.094				
P61164	Actr1a	-0.273	0.094				
E9Q421	Pigk	0.275	0.094				
B1AU25	Aifm1	0.265	0.094			Sim	
B1ATP7	Elac2	0.494	0.094			Sim	
H7BX88	Crat	0.351	0.095			Sim	
Q8CEE7	Rdh13	0.384	0.095			Sim	
P05213	Tuba1b	-1.078	0.095				
Q5RKP0	Vat1	0.234	0.095				
A6H663	Bag3	-1.127	0.096				
Q7TMI0	Psmd11	-1.299	0.096				
E9Q9X1	Dst	2.377	0.096				
A1BN54	Actn1	-0.548	0.096				
J3KMM5	Atp2a2	0.161	0.096				
Q8CHT0	Aldh4a1	0.313	0.096			Sim	
G3UWM5	Arhgap21	0.375	0.096				
Q3UBB2	Vps36	-0.757	0.096				
Q99LC5	Etfa	0.390	0.097			Sim	
Q5U430	Ubr3	-2.000	0.097				
P35700	Prdx1	-1.061	0.097				
Q99JI4	Psmd6	-0.962	0.097				
Q3TQB2	Foxred1	0.608	0.097			Sim	
Q58EA6	Rps25	0.441	0.097				
Q8K0Z7	Taco1	0.458	0.097			Sim	
Q3UMM1	Tubb6	-1.662	0.098				
Q61171	Prdx2	-1.130	0.098			Sim	
Q70IV5	Synm	-0.503	0.098				
B2RXX9	Myh7	-1.119	0.098				
Q8BH58	Tiprl	-1.460	0.098				
Q9CXU4	Timm23	0.286	0.098			Sim	
A2AQB2	Neb	-0.741	0.098				
Q9JIF7	Copb1	-1.418	0.099				
P04214	Trbv1	-0.188	0.099				
Q9Z2I8	Suclg2	0.479	0.099			Sim	
Q8K3H0	Appl1	-1.229	0.099				
Q9D154	Serpinb1a	-1.578	0.099				
Q3UT40	Mospd1	0.457	0.099				
B2RT97	Psmd13	-1.414	0.100				
D3Z0Q6	Gys1	-0.423	0.100				
P51830	Adcy9	0.419	0.100				
Q9WV35	Apobec2	-1.212	0.100				
Q9DC70	Ndufs7	0.316	0.100			Sim	
Q545Q2	Surf4	0.638	0.101				
Q9D6K8	Fundc2	0.708	0.101			Sim	
Q3UIM5	Cpt1b	0.190	0.101			Sim	
D3YYM6	Rps5	0.316	0.101				
Q8C7H1	Mmaa	0.553	0.101			Sim	
E9Q4M4	Chchd6	0.240	0.101			Sim	
Q3UDB1	Cct7	-1.226	0.101			Sim	
A2ATS4	Slc43a1	-1.004	0.101				
Q8BT51	COA4	0.839	0.101			Sim	
Q80XL6	Acad11	0.374	0.101			Sim	
Q3U4K3	Ndufv3	0.704	0.101			Sim	

A0JLV3	Hist1h2bj	-0.702	0.102				
E9PW03	Gpaa1	0.447	0.102				
D3Z041	Acsl1	0.246	0.102			Sim	
P62869	Tceb2	-0.623	0.102				
Q3U5C0	Tbc1d17	0.313	0.102				
Q6P8M1	Tatdn1	0.679	0.102				
Q9D113	Dnlz	0.210	0.103			Sim	
B2RWX0	Myh1	-1.167	0.103				
P51885	Lum	-1.011	0.103				
G3UW82	Myh2	-1.184	0.103				
Q78XF5	Ostc	0.683	0.103				
Q9EQE2	Ppm1a	-0.933	0.103				
A0A0G2JFH2	Map4	0.392	0.103				
Q62159	Rhoc	0.121	0.103				
D3YXG9	Lca5l	-1.440	0.103				
Q9DC69	Ndufa9	0.331	0.103			Sim	
E9Q1W3	Neb	-0.697	0.103				
Q9ER35	Fn3k	-0.447	0.104				
Q3KQQ1	Nsfl1c	-0.928	0.104				
D3Z487	Eif2b2	-0.793	0.104				Sim
Q7JCZ1	mt-Co2	0.430	0.104				
Q9ET80	Jph1	0.263	0.104				
Q9WV55	Vapa	0.196	0.104				
Q7TQ48	Srl	0.135	0.105				
P29621	Serpina3c	-0.753	0.105				
Q9QX59	Ube2g2	-0.138	0.105				
Q8QZY1	Eif3l	-1.267	0.105				
Q9JJZ2	Tuba8	-1.317	0.106				
Q9CYK1	Wars2	0.583	0.106			Sim	
P12787	Cox5a	0.228	0.106			Sim	
Q3V1D3	Ampd1	-1.672	0.106				
Q91VR5	Ddx1	0.180	0.106				
Q99KR7	Ppif	0.279	0.106			Sim	
Q8VGF3	Olfr1216	-0.683	0.106				
Q2UZW7	Mapre3	-1.615	0.106				
A3KML3	Ywhaq	-0.744	0.107				
Q3UYP2	Pcyox1	0.234	0.107				
P26443	Glud1	0.385	0.108			Sim	
Q5EBQ6	Rpl9	0.709	0.108				
Q9JHI5	Ivd	0.370	0.108			Sim	
Q8CHH7	Gcn1l1	-0.491	0.108				
Q9DCN2	Cyb5r3	0.315	0.109			Sim	
G3X983	Tcaim	0.249	0.109			Sim	
Q3TJI8	Hsd11b1	0.830	0.109				
Q6A0E8	Tlr1	-1.706	0.109				
Q3TQX8	Atg16l1	0.357	0.110				
Q569W4	Acss1	0.527	0.110			Sim	
Q3SXD3	Hddc2	0.626	0.110				
Q3U8F7	Npc2	0.743	0.110				
Q497N1	Rps26	0.423	0.110				
Q3ULT2	Actn4	-0.523	0.111				
Q9CXJ4	Abcb8	0.196	0.111			Sim	
P52479	Usp10	-0.301	0.111				
J3QMX0	Rpp14	0.360	0.111				
Q9R0A0	Pex14	0.582	0.111				
Q3UPK6	Psma5	-0.710	0.111				
E9Q7G1	Tmed7	0.280	0.111				
A8Y5Q1	Pdp1	0.533	0.111			Sim	
Q5M9K1	Ttr	0.778	0.112				
Q91VM9	Ppa2	0.377	0.112			Sim	
I3ITR1	AK157302	0.445	0.112			Sim	
B2RS41	Aldh5a1	0.534	0.112			Sim	
B7ZP22	Hnrnpa2b1	-0.617	0.112				
Q544Y8	Grn	0.254	0.112				
F8WJI3	Ccdc58	0.622	0.112			Sim	
P48771	Cox7a2	-0.344	0.113			Sim	
P70122	Sbds	0.672	0.113				
Q3TNY9	Bgn	-0.625	0.114				
Q6DVA0	Lemd2	0.119	0.114				
P11983	Tcp1	-2.295	0.114				Sim
Q8VBT9	Aspscr1	-1.376	0.114				
Q545G1	Mylpf	-1.053	0.114				
Q4VAE3	Tmem65	-0.330	0.114			Sim	
Q922E6	Fastkd2	1.001	0.114			Sim	
Q3TDI7	3110040N11Rik	0.692	0.115				
Q3THJ0	Rpl18a	0.673	0.115				
Q60597	Ogdh	0.574	0.115			Sim	
E9PV24	Fga	-0.652	0.115				
P63038	Hspd1	0.601	0.115			Sim	
Q60597	Ogdh	0.598	0.115			Sim	
Q9DC61	Pmpca	0.336	0.115			Sim	

Q60I30	Itpa	-2.529	0.115				
P13541	Myh3	-1.178	0.115				
Q61425	Hadh	0.615	0.115			Sim	
P62830	Rpl23	0.736	0.116				
Q99M07	Coa5	0.908	0.116			Sim	
Q3UWS9	Prdx5	0.297	0.116			Sim	
Q9ET78	Jph2	0.477	0.116				
Q9DCW4	Etfb	0.377	0.116			Sim	
B2RWB7	9630033F20Rik	-1.086	0.117				
Q9WVL0	Gstz1	0.722	0.117			Sim	
Q8CFH3	Lpin1	-0.765	0.117				
Q5DQJ3	Capza2	-0.404	0.117				
Q9CPY1	Mrpl51	0.340	0.118			Sim	
Q545F4	Hspb1	-0.917	0.118				
Q80ZJ2	Impa1	-0.639	0.118				
A0A087WQE6	Tceb1	-0.469	0.118				
Q545H3	Timm17b	0.345	0.118			Sim	
Q3TRB7	Pigu	0.757	0.118				
D3Z7E5	Gsk3a	-1.182	0.118				
Q9D8W7	Ociad2	0.605	0.118				
Q8C7M8	Casq1	0.831	0.119				
Q8BK46	Psmd3	-0.593	0.119				
Q497D7	Rpl30	0.714	0.119				
Q80YD1	Supv3l1	0.310	0.120			Sim	
Q544B1	Aldh2	0.373	0.120			Sim	
Q9DCS3	Mecr	0.517	0.120			Sim	
Q9CQV7	Dnajc19	0.353	0.120			Sim	
Q9CXR1	Dhrs7	0.633	0.121				
Q6NXY7	Dok5	0.283	0.121				
Q80XJ6	Slc25a19	0.377	0.121			Sim	
Q6P5U7	Nwd2	1.078	0.121				
Q5I0W5	Sdf2	0.217	0.122				
Q3URE1	Acsf3	0.637	0.122			Sim	
Q3U9C4	Mrpl44	0.507	0.122			Sim	
V9GXP4	1110008L16Rik	0.609	0.122			Sim	
Q3TBF1	Padi2	-1.431	0.122				
Q9D7J4	Cox20	-0.350	0.123			Sim	
F7CRG8	Mark2	-0.946	0.123				
Q9CXW2	Mrps22	0.105	0.123			Sim	
D3Z125	Tpd52	-0.931	0.123				
Q8C2S9	Mvp	-0.881	0.123				
Q0PD65	Rab2a	0.305	0.123				
Q9ME04	ND4	0.654	0.123			Sim	
B1AW21	Mtm1	0.118	0.124				
Q8JZN7	Rhot2	0.271	0.124			Sim	
Q8C5W3	Tbcel	-1.063	0.124				
Q8CCZ4	Lias	0.313	0.125			Sim	
A6H6K1	Aspn	-0.309	0.125				
Q3THT9	Mrps18b	0.668	0.125			Sim	
Q3TPD9	Maoa	0.319	0.125			Sim	
O35969	Gamt	-1.392	0.126				
Q3UM44	Vamp5	0.601	0.126				
Q8BIJ6	Iars2	0.506	0.126			Sim	
Q5SXR6	Cltc	-0.238	0.126		Sim		
Q543N7	Pacsin3	-0.093	0.126				
Q542P5	Cbr2	0.305	0.127			Sim	
P70402	Mybph	-1.504	0.127				
G3UYV7	Rps28	0.685	0.127				
Q9JKB1	Uchl3	-2.749	0.127				
Q7TSQ8	Pdpr	0.527	0.128			Sim	
Q8CIJ3	Eif3b	-0.304	0.128				
Q0QEW9	Rpl18	0.422	0.128				
M0QW57	Jsrp1	0.543	0.128				
Q99L69	Bckdha	0.269	0.129			Sim	
Q8K1C0	Angel2	0.711	0.129			Sim	
Q9CQ86	Mien1	-0.302	0.129				
Q920A7	Afg3l1	0.189	0.129			Sim	
Q3UJR8	Btf3	0.355	0.130				Sim
Q01853	Vcp	-0.726	0.130				
Q8BY87	Usp47	-1.674	0.130				
P56480	Atp5b	0.173	0.130			Sim	
P08249	Mdh2	0.332	0.130			Sim	
P54071	Idh2	0.583	0.130			Sim	
Q62261	Sptbn1	-0.316	0.131				
Q9DCZ4	Apoo	0.397	0.131			Sim	
Q9CQF4	1700021F05Rik	0.402	0.131			Sim	
Q71RI9	Ccbl2	0.234	0.131			Sim	
Q3TCL2	Akr1b3	-1.296	0.131				
Q8R3G9	Tspan8	0.265	0.131				
D3YXZ3	Klc2	-1.650	0.132				
Q9CQU0	Txndc12	0.608	0.132			Sim	

Q4FJZ2	Kpna6	-0.882	0.132				
Q99LD8	Ddah2	-1.140	0.132				
Q2TPA8	Hsdl2	0.572	0.132			Sim	
A0A0A0MQ68	Gcdh	0.393	0.132			Sim	
Q05DE0	Arfgap1	-0.402	0.132				
B8X349	Spag9	-0.624	0.132				
Q4FJK0	Decr1	0.347	0.133			Sim	
Q9CR68	Uqcrfs1	0.319	0.133			Sim	
Q8BMF4	Dlat	0.301	0.133			Sim	
Q8C1X9	Anxa3	-0.688	0.134				
Q02788	Col6a2	-0.755	0.134				
Q3TI71	Prpf8	0.799	0.134				
Q3TLI6	Ndufaf2	0.224	0.134			Sim	
Q8BVJ7	Pdlim7	-1.353	0.134				
K3W4P5	Immp2l	0.672	0.135			Sim	
P45952	Acadm	0.374	0.135			Sim	
Q9EQ83	Sgcg	-0.501	0.135				
A0A0G2JFY0	Spata5	-0.610	0.135				
Q91YN3	Acsl4	0.280	0.135			Sim	
A3KMJ8	Vbp1	-1.276	0.135				
E9Q8Y0	Myl2	-0.457	0.135				
Q91YK6	Rpl23a	0.561	0.136				
Q3TX38	Vdac3	0.408	0.136			Sim	
Q9CRA2	Pdlim5	-0.918	0.136				Sim
A0A0A0MQ70	Slc25a35	0.337	0.136			Sim	
Q6P5F9	Xpo1	-2.395	0.136				
Q9CZ83	Mrpl55	0.561	0.136			Sim	
Q3URP6	P4hb	0.362	0.136			Sim	
Q91XV3	Basp1	0.511	0.136				
F6WJB7	Usp34	0.712	0.137				
Q4KL76	Hspe1	0.310	0.137			Sim	
Q3UDQ7	Afg3l2	0.295	0.137			Sim	
Q9D7P6	Iscu	0.412	0.137			Sim	
Q9DB15	Mrpl12	0.316	0.137			Sim	
Q8BTZ9	Mrps18c	0.330	0.137			Sim	
Q8C2Q8	Atp5c1	0.118	0.138			Sim	
G3UWE1	Tecr	0.463	0.138				
Q9D880	Timm50	0.286	0.138			Sim	
P70670	Naca	0.308	0.138				
B2RTM0	Hist2h4	-0.239	0.138				
B7ZNJ1	Fn1	-0.632	0.139				
Q5EBQ2	Pebp1	-1.480	0.139				
Q9CPQ8	Atp5l	0.206	0.140			Sim	
E9PZG4	Hdac7	-0.339	0.140				
Q3TDD8	Eif4b	-0.664	0.140				
Q544J2	Pdk4	0.200	0.140			Sim	
E9Q4A5	Gm1818	0.176	0.140			Sim	
Q9D2D1	Ctsa	0.561	0.140				
Q9DCC7	Isoc2b	0.281	0.140			Sim	
Q9QX60	Dguok	0.452	0.141			Sim	
F7CBP1	Eif4g2	-1.909	0.141				
P14152	Mdh1	-1.315	0.141			Sim	
Q9CPR5	Mrpl15	0.289	0.142			Sim	
B7ZP45	Lrig1	-0.315	0.142				
Q791M3	Lcat	0.542	0.143				
Q545M7	Pvalb	-2.054	0.143				
Q8BH64	Ehd2	-0.656	0.143				
Q8R010	Aimp2	-0.373	0.143				
Q9CQ60	Pgls	-1.706	0.144				
Q91YU9	Prdx5	0.271	0.144			Sim	
Q3UKQ5	M6pr	-0.287	0.144				
Q8CAZ9	Prelp	-0.283	0.145				
Q99M01	Fars2	0.514	0.145			Sim	
Q11011	Npepps	0.236	0.145				
E9Q4P0	Kxd1	-0.324	0.145				
P09813	Apoa2	-0.393	0.145				
Q5EBI8	Atp5k	0.298	0.146			Sim	
Q9D0K2	Oxct1	0.525	0.146			Sim	
O08911	Mapk12	-1.042	0.146				
D3YTY9	Kng1	-0.462	0.147				
Q7TMN7	Anxa4	-0.426	0.147				
Q99MR8	Mccc1	0.447	0.147			Sim	
Q8BZ71	Stac3	-0.684	0.147				
Q5F285	Tmem256	0.741	0.147				
Q52KP0	Rpl38	0.633	0.147				
Q8R3V2	Aimp2	-0.377	0.148				
Q3UJC3	Nmt1	0.232	0.148				
Q4FZG2	Fdx1	0.665	0.148			Sim	
Q541E3	Tspo	0.588	0.148			Sim	
Q9EQ06	Hsd17b11	0.221	0.148				
Q3UEK1	Mbl2	0.321	0.149				

B9EIU1	Eprs	-0.209	0.149				
P19096	Fasn	-1.408	0.149			Sim	
Q60932	Vdac1	0.141	0.149			Sim	
Q4QRK2	Fech	0.205	0.149			Sim	
Q3UX10	Tubal3	-2.246	0.149				
Q8VE22	Mrps23	0.288	0.149			Sim	
Q9Z295	Slc37a4	0.671	0.149			Sim	
Q3TI84	Cdc16	-0.699	0.149				
Q6ZPJ3	Ube2o	-1.552	0.150				
D6REH1	Pxmp2	0.456	0.150			Sim	
Q3TFD0	Shmt2	0.341	0.150			Sim	
A0A087WQH8	Slc35a4	0.840	0.150				
Q9D3L3	Snap23	0.118	0.150				
B2RTL6	Thbs4	-0.798	0.150				
Q8K1Z0	Coq9	0.320	0.150			Sim	
J3QMN4	Txnrd2	0.468	0.150			Sim	
Q9EQ20	Aldh6a1	0.512	0.151			Sim	
Q9JKL4	Ndufaf3	0.310	0.151			Sim	
F6TBV1	Magt1	0.199	0.152				
Q8BIP0	Dars2	0.288	0.152			Sim	
E9Q715	Luc7l2	-0.888	0.152				
Q05421	Cyp2e1	0.933	0.152				
Q921H8	Acaa1a	0.414	0.152			Sim	
Q5F1Z8	Gm2a	0.363	0.152				
A2AQR0	Gpd2	0.410	0.152			Sim	
B2RRS4	Gtpbp3	0.347	0.153			Sim	
Q8R1S0	Coq6	0.399	0.153			Sim	
Q8CBE6	Dag1	-0.493	0.154				
Q8CC03	Ap1g1	-0.743	0.154				
A2RTI3	Lgmn	0.264	0.154				
Q3UI56	Anxa6	-0.592	0.154				
P20108	Prdx3	0.674	0.155			Sim	
Q8R5J9	Arl6ip5	0.545	0.155				
Q9WUB3	Pygm	-0.933	0.155				
Q99JZ4	Sar1a	-0.675	0.155				
Q8R5H1	Usp15	-2.032	0.156				
Q9D7H9	Arl1	-1.223	0.156				
P82350	Sgca	-0.669	0.156				
Q9Z2I0	Letm1	0.157	0.156			Sim	
Q8R1G2	Cmbl	-1.187	0.157				
Q6PDY2	Ado	0.432	0.157				
Q7TPT7	Vars	-0.455	0.158				
F8WIT2	Anxa6	-0.601	0.158				
Q8BJU9	Mtrf1l	0.823	0.158			Sim	
Q6PB66	Lrpprc	0.459	0.158			Sim	
E0CYX9	Ccdc127	0.408	0.158			Sim	
B2RUK5	Mccc2	0.243	0.158			Sim	
Q99P72	Rtn4	0.355	0.159				
Q5EBQ0	Vdac3	0.352	0.160			Sim	
Q3U5I5	Grb2	-0.257	0.160				
A6X940	Fermt2	-0.988	0.160				
Q3U9A3	Tapbp	0.538	0.160				
Q6P1A9	Rpl7a	0.541	0.160				
Q5U458	Dnajc11	0.329	0.160			Sim	
Q3TQP7	Acat1	0.190	0.161			Sim	
A2AJY2	Col15a1	-0.677	0.161				
Q99KJ4	Tars	-0.657	0.161			Sim	
Q3TF84	Lrrc59	0.250	0.161				
V9GWW6	Mlip	-0.442	0.161				
Q91YY4	Atpaf2	0.511	0.161			Sim	
Q3TC72	Fahd2	0.511	0.162				
Q8BTB8	Mrpl49	0.257	0.163			Sim	
Q9CQM8	Rpl21	0.405	0.163				
Q5DTJ9	Mypn	-0.333	0.163				
A2AQ17	Ndufaf1	0.145	0.163			Sim	
Q99N93	Mrpl16	0.270	0.164			Sim	
Q8CEH8	Pfn1	-0.845	0.164				
Q8R086	Suox	0.363	0.164			Sim	
Q8BKE0	Psma2	-0.810	0.164				
Q3TBX5	Aup1	0.408	0.164				
Q3UKR1	Dcn	-0.381	0.164				
A3KFX0	Nt5c1a	-0.844	0.165				
Q91VJ9	Agpat1	0.285	0.165				
Q8BWM0	Ptges2	0.368	0.165			Sim	
A0A068BEQ2	H2-Ke6	0.488	0.165			Sim	
E9QPW4	Cep295	0.304	0.165				
Q99J39	Mlycd	0.504	0.165			Sim	
Q8BGD8	Coa6	0.408	0.165			Sim	
Q80ZP8	Manf	0.854	0.166				
Q91YM4	Tbrg4	0.372	0.166			Sim	
Q8BW75	Maob	0.202	0.168			Sim	

Q99KI3	Emc3	0.325	0.168				
F8VPN4	Agl	-0.192	0.168				
Q99N87	Mrps5	0.397	0.168			Sim	
Q6ZWR0	Rap2b	0.307	0.168				
G3UWD7	Gm10269	0.490	0.170				
Q3KQQ4	Serpina1b	-0.162	0.170				
Q8K1N1	Pnpla8	0.269	0.170			Sim	
A2ASZ8	Slc25a25	0.325	0.170			Sim	
A2AJK6	Chd7	2.081	0.170				
A2APX3	Cst3	0.645	0.170				
Q6ZWZ7	Rpl17	0.532	0.170				
P48036	Anxa5	-0.859	0.171				
Q05DD2	Nefl	-0.446	0.171				
H3BJ77	Fundc1	0.514	0.171		Sim	Sim	
Q3UM45	Ppp1r7	-1.035	0.171				
Q9D1H6	Ndufaf4	0.214	0.172			Sim	
Q04857	Col6a1	-0.568	0.172				
Q925I1	Atad3	0.123	0.172				
Q3TWN8	Aldh18a1	1.062	0.173			Sim	
Q8BPE4	Tmem177	0.171	0.173			Sim	
P50171	Hsd17b8	0.557	0.174				
Q8BH79	Ano10	0.290	0.174				
Q8R2Y8	Ptrh2	0.399	0.175			Sim	
Q9D0I9	Rars	-0.930	0.176			Sim	
Q9QXT0	Cnpy2	0.747	0.177				
Q8R390	Gnpat	0.532	0.177				
D3Z7C0	Mrpl40	0.274	0.177			Sim	
K3W4S6	Gyg	-1.053	0.178				
Q8BK84	Dupd1	-0.399	0.178				
Q9CYN2	Spcs2	0.224	0.178				
Q8BG51	Rhot1	0.194	0.178			Sim	
Q9CQT1	Mri1	-0.822	0.179				
Q8BH59	Slc25a12	0.341	0.179			Sim	
Q5M8Q0	Rpl15	0.578	0.179				
Q9D1T2	Mxra7	0.309	0.179				
Q8BU30	Iars	-0.401	0.179				
P62835	Rap1a	0.184	0.179				
Q4JG03	Huwe1	-2.188	0.179				
Q3ULW0	Ran	-0.963	0.180				
Q3UJV6	Uqcr11	0.756	0.180			Sim	
Q8R429	Atp2a1	0.279	0.182				
Q6VEU5	Atp5e	0.734	0.182			Sim	
Q3UCZ5	Ptpn1	0.762	0.182				
B2RSR7	Gpd1l	-0.606	0.182				
Q8C6I2	Sdhaf2	1.151	0.182			Sim	
Q9D071	Mms19	-2.104	0.183				
D3Z0F5	Cops6	-0.501	0.183				Sim
Q9EQI8	Mrpl46	0.370	0.183			Sim	
Q3UB90	Rpl3	0.352	0.183				
P07759	Serpina3k	-0.396	0.183				
E9PXX7	Txndc5	0.142	0.183				
E9QAJ9	Arhgap17	-0.435	0.184				
J3QMM7	Carkd	0.263	0.184			Sim	
Q9CQ06	Mrpl24	0.340	0.184			Sim	
Q3ULL5	Eif2s2	-0.430	0.185				
Q5BLK0	Rpl12	0.577	0.185				
P61922	Abat	0.453	0.185			Sim	
Q9DB16	Cab39l	-0.808	0.185				
Q14AZ9	Zadh2	0.581	0.185			Sim	
Q3UI43	Babam1	-1.892	0.186				
Q3UJS0	Rpl8	0.400	0.186				
Q53YX2	Thy1	-0.440	0.187				
Q99LM3	Smtnl1	-0.914	0.187				
Q80XK9	Serhl	0.575	0.187				
B9EJA2	Cttnbp2	-0.139	0.187				
Q91ZE0	Tmlhe	0.434	0.187			Sim	
A2RTC8	March5	0.762	0.188			Sim	
B1AR69	Myh13	-1.451	0.188				
Q8R1U8	Efemp1	-0.784	0.189				
Q8C907	Vac14	-0.404	0.190				
G5E8X1	0610011F06Rik	-2.030	0.190				
P12979	Myog	0.086	0.191				Sim
Q31167	H2-D1	-0.326	0.191				
Q9Z1N5	Ddx39b	-1.030	0.191				
B1AX98	Lrrc47	-0.630	0.191				
Q8C1B7	Sept11	-0.600	0.192				
D3YX27	Htra2	0.419	0.192			Sim	
Q3UJQ3	Dars	-0.569	0.192				
Q8R3F5	Mcat	0.384	0.193			Sim	
Q8BMA4	Actr2	0.107	0.193				
Q9DBP5	Cmpk1	-1.127	0.193				

Q3TJA9	Dnaja3	0.375	0.193			Sim	
O70569	rps14	0.298	0.193			Sim	
Q3UEI6	Serbp1	0.495	0.194				
P19123	Tnnc1	-0.814	0.194				
Q8BH70	Fbxl4	0.259	0.195			Sim	
Q8VBZ3	Clptm1	0.249	0.195				
Q148P2	Oxsm	0.428	0.196			Sim	
P28665	Mug1	-0.428	0.196				
P16332	Mut	0.448	0.197			Sim	
Q8QZU9	Cpne2	0.352	0.197				
P08032	Spta1	-0.521	0.197				
E9PWQ3	Col6a3	-0.649	0.197				
E9Q035	Gm20425	0.362	0.197				
Q91V61	Sfxn3	0.177	0.197			Sim	
B1B0C7	Hspg2	-0.655	0.198				
Q02357	Ank1	0.549	0.198				
Q9QYE6	Golga5	-0.610	0.198				
Q80U83	Sec24c	-0.658	0.198				
Q65ZC0	Igkc	-0.454	0.199				
E9QP10	Ranbp3l	0.575	0.199				
O55029	Copb2	-0.564	0.199				
Q3UA17	Mtch2	0.480	0.200			Sim	
Q3V3U0	Pygb	-0.980	0.200				
Q5BLK2	Rps20	0.241	0.200				
D3Z6G3	Mapre3	-1.068	0.200				
P11087	Col1a1	-1.495	0.200				
A0A0G2JH03	Pla2g12a	0.672	0.201				
Q3TCW5	Nrbp1	-0.731	0.201				
Q3TL44	Nlrx1	0.406	0.201			Sim	
Q9CQL5	Mrpl18	0.260	0.202			Sim	
Q9D783	Klhl40	-1.259	0.202				Sim
Q99JB5	Psmd8	-1.053	0.202				
Q3TUP8	Vti1b	0.410	0.202				
A2RRR3	Clasp2	-1.000	0.203				
Q8C6H6	Smpd2	0.322	0.203				
P10639	Txn	-0.330	0.203				
Q9QYR9	Acot2	0.235	0.203			Sim	
Q8CBM2	Asph	0.300	0.204				
D3Z2Y7	Gpx3	-0.534	0.204				
A0A0A1HAM8	Marcks	0.423	0.204				
Q3TDI5	Pex19	-0.241	0.204				
Q8BFZ9	Erlin2	0.158	0.204				
Q9DBN7	Eci1	0.517	0.204			Sim	
Q0VGU0	Sar1b	-0.756	0.204				
Q922Q1	Marc2	0.291	0.204			Sim	
Q8BH95	Echs1	0.246	0.205			Sim	
Q6PCP5	Mff	0.259	0.206			Sim	
Q8C671	Srsf2	-0.390	0.206				
Q9JHW2	Nit2	0.736	0.207			Sim	
Q9DCL9	Paics	-0.831	0.207			Sim	
E9QMK9	9030617O03Rik	0.190	0.208			Sim	
Q8C213	Atp2a3	0.074	0.208				
A2A7Z4	Btf3l4	0.554	0.209				
Q3THL5	Pelo	-0.905	0.209				
Q5EBJ0	Fabp3	-1.715	0.209				
P51863	Atp6v0d1	0.104	0.210				
B2RUC7	Strap	-0.633	0.210				
A2VDH3	Lrrc38	0.399	0.210				
Q3TVR8	Smoc2	0.620	0.210				
E9PWK1	Ephx1	0.093	0.211				
Q3UJP8	Gart	-1.342	0.211				
Q99K23	Ufsp2	0.222	0.212				
Q9DAS9	Gng12	0.195	0.213				
L7N451	Gvin1	-0.329	0.214				
Q3UKA4	Adh1	-0.659	0.214				
P27612	Plaa	-1.529	0.215				
O35435	Dhodh	0.129	0.215			Sim	
A2CG35	Rab12	0.210	0.216				
Q3TAL2	Scamp2	-0.332	0.217				
Q99M87	Dnaja3	0.295	0.217			Sim	
Q3V2G6	Tpd52l1	-0.110	0.217				
P16015	Ca3	-0.517	0.217				
Q3TPL3	Uros	-0.083	0.218				
V9GXI7	Mrpl20	0.317	0.218			Sim	
Q9D7B6	Acad8	0.471	0.218			Sim	
A0A0B4J1M9	Map4	0.158	0.218				
Q3MIA8	Gps1	-0.628	0.218				
Q91WU5	As3mt	-2.040	0.219			Sim	
Q9D3P8	Plgrkt	0.179	0.219			Sim	
Q545A2	Slc25a5	0.417	0.220			Sim	
Q8CGY8	Ogt	-0.559	0.220				

Q3V4A6	Sdhaf3	0.295	0.221				
Q3THQ5	Stip1	-0.863	0.221				
Q80UW7	Iqgap1	-0.239	0.221				
A3KGU5	Sptan1	-0.173	0.221				
E9Q8N1	Ttn	-0.593	0.222				
Q8CI78	Rmnd1	0.197	0.222			Sim	
Q9D8S9	Bola1	0.172	0.222			Sim	
Q9D7P1	Rps24	0.647	0.223				
Q3UBW0	H2-K1	-0.307	0.223				
Q56A15	Cycs	1.023	0.223			Sim	
Q8BHC2	Ist1	-0.671	0.224				
Q8BT09	Rps6	0.624	0.224				
Q80T83	Vcpip1	-0.946	0.224				
D6RCW8	Alg3	0.599	0.225				
Q5H8C4	Vps13a	0.275	0.226				
Q924T2	Mrps2	0.130	0.227			Sim	
Q9CQY6	Uqcc2	0.247	0.228			Sim	
Q8K273	Mmgt1	0.224	0.228				
Q9R071	Eif6	-0.860	0.228				
Q5FWB7	Aldoa	-0.929	0.229				
Q3TLP5	Echdc2	0.032	0.230			Sim	
Q9D2R6	Coa3	-0.073	0.230			Sim	
B9EKB8	Igf2r	0.124	0.230				
Q91W18	Tdrd3	-0.517	0.230				
O88967	Yme1l1	0.088	0.231			Sim	
Q5SS40	Ywhae	-1.005	0.232				
A0A0A6YVP8	Cfh	-0.164	0.233				
Q9JJ44	Dut	0.322	0.233			Sim	
Q5SVY0	Ogdh	0.498	0.234			Sim	
A0A0A0MQA3	Serpina1a	-0.110	0.234				
B2RY22	Clasp1	-0.543	0.234				
Q3ULU3	Bcat2	0.405	0.234			Sim	
Q3UIH5	Psmc2	-0.905	0.234				
Q9CXI0	Coq5	0.367	0.235			Sim	
Q545T7	Myl1	-1.077	0.235				
Q9CQE3	Mrps17	0.299	0.235			Sim	Sim
D3YW98	Vps29	-0.142	0.236				
G3X9D8	Klhl31	-0.258	0.236				
Q9D1C3	Pyurf	0.367	0.237			Sim	
D3YTU0	Vamp1	0.328	0.237				
B2CSK2	Hspa1l	-0.131	0.237				
Q9D8Y1	Tmem126a	0.458	0.237			Sim	
A0A087WRE7	Adhfe1	0.388	0.238			Sim	
A2RTA0	Ckm	-1.274	0.239				
Q8C2C6	Tfg	-0.304	0.239				
Q3TX57	Col1a2	-1.628	0.239				
B7ZWK3	Sptan1	-0.173	0.239				
Q8BHN3	Ganab	0.167	0.240				
Q8VE38	Oxnad1	0.357	0.240			Sim	
P70349	Hint1	-1.157	0.240			Sim	
E9QQ25	Speg	0.403	0.241				
Q8C494	Prr33	-0.732	0.242				
Q8CHW3	Mrpl23	0.151	0.242			Sim	
Q8CGB6	Tns2	-0.366	0.242				
Z4YKT6	Dhrs7b	0.116	0.242			Sim	
Q8BKY8	Mterf2	0.474	0.243			Sim	
Q810E6	Taz	0.370	0.244				
E9Q2W8	Loh12cr1	0.385	0.245				
A2AVR9	Dynlrb1	0.191	0.245				
Q9D9Z4	Atp6v1c1	-0.841	0.245				
Q9D881	Cox5b	-0.158	0.245			Sim	
Q99MT5	Capn11	-1.382	0.246				
E9Q1S3	Sec23a	-0.742	0.246				
A2AVJ7	Rrbp1	0.216	0.247				
Q9CPU2	Ndufb2	-0.263	0.248			Sim	
Q80WJ7	Mtdh	0.320	0.248				
Q9DBF1	Aldh7a1	0.320	0.249			Sim	
Q9CQB5	Cisd2	0.175	0.250			Sim	
E9PX70	Col12a1	-1.666	0.251				
Q9Z1Q2	Abhd16a	0.159	0.252				
Q3TDN2	Faf2	0.104	0.252				
Q3V2E3	Uqcc3	0.558	0.253				
Q542A1	Bcap29	0.703	0.254				
Q9DAW9	Cnn3	-0.844	0.254				Sim
Q4FK79	Ssr3	0.450	0.254				
O88986	Gcat	0.369	0.255			Sim	
Q8BGH4	Reep1	0.207	0.258				
C9K0Z7	Fkbp8	0.166	0.258		Sim	Sim	
Q5I0W0	Atp5f1	0.735	0.258			Sim	
P51174	Acadl	0.349	0.259			Sim	
Q8K199	Cmc2	0.250	0.259			Sim	

Q3TIR3	Ric8a	0.686	0.259				
Q78ZJ8	Rab11b	-0.169	0.260				
Q8C2U7	Aimp1	-0.231	0.260				
Q3UQ71	Ephx2	-0.080	0.261			Sim	
P51655	Gpc4	0.432	0.261				
Q6ZWQ5	Snx12	-0.447	0.261				
Q921R1	Entpd2	-0.223	0.261				
Q9D1R9	Rpl34	0.421	0.262			Sim	
D3YVZ9	Mrps21	0.263	0.262			Sim	
Q52KC5	Chchd5	0.585	0.262			Sim	
A2AL77	Asph	0.366	0.262				
A2AL50	Agps	0.260	0.263				
Q05BF0	Chchd1	0.286	0.263			Sim	
Q9DBS1	Tmem43	0.350	0.263				
Q8K1R3	Pnpt1	0.289	0.263			Sim	
A4QMQ0	Mtif3	0.556	0.264			Sim	
Q564E2	Ldha	-1.342	0.264				
P50544	Acadvl	0.223	0.264			Sim	
Q8K268	Abcf3	-0.815	0.264				
Q9D1Q6	Erp44	0.181	0.265				
Q8VCW8	Acsf2	0.571	0.266			Sim	
Q3U7R1	Esyt1	0.070	0.267				
Q3TPC7	Phyh	-0.222	0.267			Sim	
Q8R5C0	Mtx1	0.279	0.267			Sim	
F8WHP8	Atp5j2	0.143	0.267			Sim	
A2AKU9	Atp5c1	0.046	0.268			Sim	
P23116	Eif3a	-0.228	0.268				
Q3UFY8	Trmt10c	0.639	0.268			Sim	
Q80UU9	Pgrmc2	0.127	0.268				
Q561M4	Tom1	-0.469	0.268				
Q9CQ91	Ndufa3	0.504	0.268			Sim	
Q3UKH3	Acaa2	0.371	0.269			Sim	
G5E829	Atp2b1	-0.212	0.270				
D3YVS7	Cystm1	0.380	0.271				
Q3UIB5	Dhrs4	0.331	0.271			Sim	
Q9Z2L6	Minpp1	0.646	0.271				
Q9JHS4	Clpx	0.182	0.271			Sim	
Q8BX10	Pgam5	0.160	0.271			Sim	
Q80YV4	Pank4	-0.776	0.271				
Q3V1M8	Hdlbp	-0.151	0.272				
P20801	Tnnc2	-2.977	0.272				
G3XA66	Mtx1	0.253	0.272			Sim	
Q61769	Mki67	-0.216	0.272				Sim
D3YYK8	Mapre2	-1.178	0.272				
Q5SQB0	Npm1	0.157	0.273				
Q3TSX8	Tomm70a	0.282	0.274			Sim	
Q05CM5	Eif5	-0.455	0.274				Sim
Q99PL6	Ubxn6	-0.530	0.274				
Q8BMS1	Hadha	0.126	0.274			Sim	
Q6XPS7	Tha1	0.131	0.275			Sim	
S4R1V0	Pdlim1	-0.204	0.275				Sim
Q80TN4	Dnajc16	0.570	0.275				
Q3UXL4	Kiz	0.787	0.276				
Q3UFD0	Gm20498	0.129	0.276				
D3YWT0	Sec11a	0.186	0.278				
G3UYQ2	Bag6	-0.603	0.278				
Q8BNU3	Fmod	-0.720	0.278				
Q32ME1	Atp2b4	-0.421	0.278				
P05132	Prkaca	-0.370	0.278				
P60766	Cdc42	0.666	0.279				
Q91V16	Lyrm5	0.615	0.280			Sim	
G3X9M0	Dap3	0.290	0.280			Sim	
Q3UQV0	Igfbp5	0.305	0.280				
Q6PDC2	Tmed9	0.121	0.280				
Q923F9	Ndufs4	0.283	0.280			Sim	
Q3UQ95	Glrx2	0.825	0.281			Sim	
Q5XKN4	Jagn1	1.055	0.281				
E9Q3B9	Mgll	0.209	0.281				
G3X8Y3	Naa15	-0.818	0.281				
Q8BM38	Ppp2r3a	-0.541	0.281				
A0A087WRU0	Tns1	-1.093	0.281				
A0A0G2JDW7	Rps27	0.220	0.282				
Q8BHE8	9430016H08Rik	0.388	0.282			Sim	
A2AP31	Ndufb6	0.156	0.283			Sim	
Q8BWT1	Acaa2	0.385	0.283			Sim	
Q9CQ54	Ndufc2	0.223	0.283			Sim	
Q5F2E7	Nufip2	0.410	0.283				
B2RRH9	Gmps	-1.376	0.284				
Q3U1N3	Rras	-0.287	0.285				
Q921H9	Coa7	0.467	0.285			Sim	
Q6P8J7	Ckmt2	0.413	0.286			Sim	

Q9JKB3	Ybx3	0.732	0.286				
A8IP69	Ywhag	-0.672	0.286				
Q8VDP6	Cdipt	0.414	0.287				
Q9D6T9	Mrps36	0.168	0.287			Sim	
Q9D096	Isoc1	-0.439	0.287				
P58281	Opa1	0.376	0.288			Sim	
Q80UJ8	Lactb	0.326	0.288			Sim	
Q8R2S3	Nol3	-0.331	0.288				
O08553	Dpysl2	-0.526	0.289				
Q9CQW0	Emc6	0.253	0.289				
Q3TAW3	Acox3	0.276	0.290			Sim	
Q9EQH2	Erap1	0.302	0.290				
I7HJQ8	Cd99l2	0.252	0.291				
Q3URS9	Ccdc51	-0.007	0.291			Sim	
P17665	Cox7c	0.417	0.291			Sim	
Q3UQJ1	Vps35	-0.155	0.292				
Q5SSH8	Cyb5d2	0.310	0.293				
Q3TLX9	Smpdl3b	-0.346	0.293				
O55003	Bnip3	0.552	0.293		Sim	Sim	
Q3UR55	Atp1b2	0.102	0.294				
P60904	Dnajc5	0.234	0.294				
A5D6P3	Abcc1	0.206	0.295				
P70280	Vamp7	0.121	0.295				
Q3U125	Fam213a	0.165	0.295			Sim	
Q6ZQI3	Mlec	0.371	0.295				
P52503	Ndufs6	0.224	0.296			Sim	
B1AX95	Tprgl	-0.040	0.296				
Q9JK42	Pdk2	0.506	0.297			Sim	
Q8BPI2	Tmed2	0.411	0.297				
Q6GT24	Prdx6	-0.616	0.297			Sim	
A2AGL5	Aven	-0.507	0.298				
Q8BU31	Rap2c	0.114	0.298				
Q8C163	Exog	0.756	0.298			Sim	
P10649	Gstm1	-0.684	0.299				
Q9CQ45	Nenf	0.617	0.299				
Q544R7	Hmox2	0.145	0.299				
A0A0A6YVP6	Stam	0.300	0.300				
Q3UN82	Pcolce	-0.981	0.300				
P54823	Ddx6	-0.189	0.301				
Q6TCI0	Plg	-0.472	0.301				
Q99L04	Dhrs1	0.157	0.301			Sim	
Q3UN10	Wfs1	0.241	0.301				
F6SVV1	Gm9493	0.498	0.302				
Q9D7J6	Dnase1l1	0.290	0.303				
Q8BK30	Ndufv3	0.339	0.303			Sim	
Q3U1W3	Adam9	0.203	0.303				
Q8C894	Lipt1	0.324	0.304			Sim	
Q6P5I3	Adh5	0.292	0.304				
Q80TT4	Tomm70a	0.255	0.304			Sim	
Q8BLV1	St3gal6	-0.329	0.305				
Q9D0P6	Rps11	0.507	0.306				
Q8C4S9	Dnajc28	0.157	0.306			Sim	
G3X9U9	Fis1	0.350	0.307			Sim	
Q5SX53	Slc25a11	0.311	0.309			Sim	
Q3UME9	Mogs	0.334	0.309				
O08599	Stxbp1	-0.402	0.311				
P34928	Apoc1	-0.609	0.311				
Q3UIG0	Eif3e	-0.855	0.311				
Q8CGN5	Plin1	-0.911	0.311				
Q5NCI4	Pgam2	-0.391	0.311				
Q9D1R1	Tmem126b	0.662	0.312			Sim	
Q5RKP4	Rpn1	0.181	0.312				
B1AS33	Ssbp3	0.512	0.312				
Q8C9M6	Mrpl33	0.608	0.312			Sim	
Q3TML0	Pdia6	0.187	0.312				
Q9DD18	Dtd1	0.599	0.312				
Q3U4M7	Tpp2	-0.644	0.312				
Q3UHK5	Atp1a2	0.164	0.313				
Q9D1N9	Mrpl21	0.167	0.313			Sim	
F8WJK8	St13	-0.290	0.314				
Q9CQN3	Tomm6	0.171	0.314			Sim	Sim
Q3TDZ5	Tgfbi	-0.277	0.315				
Q9D938	Tmem160	0.112	0.315				
O54737	Blnk	0.305	0.316				
H3BKH6	Esd	-0.644	0.317				
E9QJU4	Myoz3	-0.730	0.317				
Q91ZW3	Smarca5	0.223	0.318				
P09411	Pgk1	-1.109	0.318				
Q9CZ04	Cops7a	-0.233	0.319				
B2RTM2	Ucp3	0.358	0.319			Sim	
Q9CPU4	Mgst3	0.953	0.320			Sim	

Z4YKM2	Cisd3	0.367	0.320			Sim	
A5GZX3	Glo1	-0.495	0.321				
Q8C1Z9	Tmed2	0.154	0.322				
Q8VCI0	Plbd1	0.334	0.324				
Q3UTR5	Pycr1	0.373	0.324			Sim	
A0A0A0MQE1	Tmem233	0.182	0.324				
Q9DCZ1	Gmpr	-0.390	0.325				
E9Q6V3	Blmh	-0.872	0.326				
Q8K0C8	Cox19	-0.523	0.326			Sim	
Q8BRW2	Adipoq	1.081	0.326				
P17751	Tpi1	-0.775	0.326			Sim	
F6WM75	Ccdc167	0.293	0.327				
Q91WD5	Ndufs2	0.232	0.328			Sim	
Q3V384	Lace1	0.307	0.328			Sim	
E9PV45	Usp24	-0.639	0.329				
Q4FJQ0	Rab7	0.225	0.329				
Q78NS1	Rtn4	0.374	0.329				
Q9CY49	Tbl2	0.174	0.329				
Q8BVC4	Ccdc68	0.112	0.330				
Q3UZJ4	Ppp2r5e	-0.614	0.330				
E9PYT3	Atl3	-0.435	0.331				
Q9ERR7	Sep15	0.307	0.331				
Q91VJ2	Prkcdbp	-0.230	0.331				
Q8BUY5	Timmdc1	0.161	0.332			Sim	
Q9CWT6	Ddx28	0.508	0.332			Sim	
Q8BFQ1	Psap	0.472	0.333				
Q544Q7	Atp1b3	0.174	0.333				
A0A068WAZ7	Epb4.1	-0.196	0.335				
Q8R127	Sccpdh	0.158	0.335			Sim	
Q9JK98	Clu	-0.479	0.336				
Q3UM18	Lsg1	-0.697	0.337				
E9QL12	Dysf	0.216	0.337				
Q8C1T5	Napg	0.211	0.339				
Q8R404	Qil1	0.601	0.339				
G3UVV4	Hk1	0.292	0.339			Sim	
Q3THL2	Psma7	-0.305	0.340				
Q149B8	Perm1	-0.313	0.340				
A2AKW0	Slc25a51	0.134	0.341			Sim	
G5E881	Tamm41	0.591	0.341			Sim	
Q8BU14	Sec62	-0.274	0.341				
A0A0A6YX18	Atp6v1h	-0.797	0.341				
Q4VAA9	Metap1	0.355	0.341				
Q7TMH5	Mrpl13	0.071	0.342			Sim	
Q99LB4	Capg	-0.843	0.342				
Q9WVT6	Ca14	0.231	0.343				
Q58DZ5	Mrps33	0.275	0.343			Sim	
A0JNY3	Gphn	-0.454	0.343				
P68181	Prkacb	-0.138	0.345				
E9Q1A0	Pde4dip	0.169	0.345				
A2AH28	Nudt9	0.152	0.345			Sim	
Q99PM6	Tro	0.679	0.346				
D2KHZ9	GAPDH	-0.710	0.346			Sim	
Q9DBG7	Srpr	0.276	0.346				
Q3UKB1	Pls3	-0.198	0.347				
E9PYA3	Hagh	0.368	0.347			Sim	
P63242	Eif5a	-0.365	0.347				
O35452	Tnxb	-0.113	0.347				
Q3UG16	Ap1m1	-0.225	0.347				
Q3U144	Slc3a2	0.318	0.347				
Q0PD63	Rab3a	-0.057	0.348				
Q9D1B9	Mrpl28	0.148	0.348			Sim	
Q3U518	Prkcsh	0.350	0.348				
Q9CQL6	Mrpl35	0.307	0.348			Sim	
Q9DAB3	Arl8b	0.415	0.349				
F8VPR2	Fmnl2	-0.120	0.349				
Q3TMP8	Tmem38a	0.774	0.349				
Q8BYL4	Yars2	0.373	0.350			Sim	
Q9DB05	Napa	-0.301	0.351				
Q3TR40	Thbs1	-0.154	0.351				
Q91WX5	Bak1	0.522	0.351			Sim	
Q9WVA2	Timm8a1	0.471	0.351			Sim	
D3YVV9	Synpo2	-1.466	0.352				
Q9CVE7	Cmc1	0.396	0.352			Sim	
Q505N7	Mpst	0.535	0.352			Sim	
O54962	Banf1	-0.509	0.352				
P68040	Gnb2l1	0.343	0.353				
Q50HX4	Rab14	-0.105	0.353				
Q3TWG5	Dync1li1	-0.328	0.354				
F8VPK5	Rock2	-0.225	0.354				
O35459	Ech1	0.429	0.354			Sim	
Q3TG07	Gorasp2	-0.502	0.356				

A0A0A6YX78	Car2	-0.525	0.357				
Q8R0Y8	Slc25a42	0.229	0.357			Sim	
B2RUP8	Cln5	-0.404	0.357				
Q9D1S3	Rps3a1	0.364	0.358				
P08228	Sod1	0.308	0.358			Sim	
O08715	Akap1	-0.322	0.359			Sim	
Q3U0T9	Rab35	0.651	0.359			Sim	
Q5EBG6	Hspb6	-0.692	0.360				
Q3TJ01	Rtcb	0.110	0.361				
Q7TQD5	Cpt1a	0.584	0.361			Sim	
Q9CQX8	Mrps36	0.159	0.361			Sim	
D6RI20	Hdhd2	0.265	0.361				
G3UZY2	Txn2	0.357	0.362			Sim	
Q9D375	Abhd6	0.086	0.362				
Q9D8X2	Ccdc124	0.735	0.363				
P19157	Gstp1	-1.068	0.363				
Q9DCL4	Mettl15	0.474	0.364			Sim	
Q9D0Q7	Mrpl45	0.205	0.364			Sim	
P97855	G3bp1	-0.200	0.364				
P50285	Fmo1	0.489	0.365				
Q6P3A8	Bckdhb	0.587	0.365			Sim	
B1B1D8	Mrpl2	0.312	0.367			Sim	
P08553	Nefm	-0.224	0.367				
P70452	Stx4	0.218	0.368				
Q3TEX7	Mfn2	0.258	0.369			Sim	
A2A5N2	Ywhab	-0.692	0.369				
Q3U944	Lman1	0.154	0.369				
Q9MD59	mt-Nd2	0.501	0.370				
S4R1X1	Wdr91	-0.008	0.371				
P68510	Ywhah	-0.770	0.371				
P40936	Inmt	-0.828	0.371				
P60766	Cdc42	0.135	0.372				
Q3TLR8	Smox	1.637	0.374				
Q6P9J9	Ano6	0.219	0.374				
A1L3B8	Psmd7	-0.217	0.375				
Q9WV98	Timm9	0.552	0.375			Sim	
Q5KTC0	Trpm2	-0.179	0.376				
P49817	Cav1	-0.498	0.377				
P97300	Nptn	-0.570	0.377				
Q52L78	Cryab	-0.863	0.378				
B2RRE0	Akap12	0.569	0.379				
Q8BZ52	Fsd2	0.022	0.379				
Q3UVI9	Abcf2	0.225	0.379			Sim	
O88736	Hsd17b7	-0.013	0.379				
Q3UZV6	Naalad2	0.209	0.381				
Q3U489	Ak4	0.127	0.384			Sim	
D6RIN4	Dynll2	-0.478	0.384				
Q64337	Sqstm1	0.376	0.385		Sim		Sim
Q3TH64	Cyb5b	0.327	0.386			Sim	
Q642L7	Rps27a	0.260	0.386				
Q8BGH2	Samm50	0.362	0.386			Sim	
E0CXW2	Adck5	-0.266	0.387			Sim	
Q9CPW3	Mrpl54	0.632	0.387			Sim	
Q9CZ57	Nsun4	0.422	0.388			Sim	
Q9DCW5	Cox6a1	-0.642	0.388			Sim	
Q3UW56	Ces1g	0.717	0.389				
Q2VPC9	Prkag1	-0.225	0.389				
Q5M9L7	Rps17	0.244	0.389				
Q3U213	Serac1	0.436	0.389			Sim	
Q9CR61	Ndufb7	0.308	0.390			Sim	
Q8VDT9	Mrpl50	0.164	0.391			Sim	
Q7GIP5	mt-Nd3	0.522	0.391				
Q9D6K5	Synj2bp	0.120	0.392			Sim	
P56391	Cox6b1	0.426	0.393			Sim	
Q8K2C6	Sirt5	0.478	0.394			Sim	
Q9DC77	Smpx	0.229	0.394				
Q9D6J5	Ndufb8	0.315	0.394			Sim	
Q921I1	Tf	0.294	0.394				
A2AAJ9	Obscn	0.057	0.394			Sim	
Q8BMP9	Stt3a	0.279	0.394				
Q9JMH6	Txnrd1	0.180	0.395			Sim	
Q9CRA7	Atp5s	0.315	0.396			Sim	
Q9DCI9	Mrpl32	0.446	0.397			Sim	
Q9CPY7	Lap3	0.643	0.398			Sim	
Q3TZZ7	Esyt2	0.237	0.399				
D3Z456	Mrpl3	0.714	0.400			Sim	
Q3USX5	Irak4	-0.341	0.400				
Q921T2	Tor1aip1	0.066	0.400				
B2RVX0	Lrrc30	0.124	0.401				
B2RVT1	Myeov2	-0.212	0.401				
Q3UVI0	mt-Nd5	0.318	0.401				

Q9CQE2	Tmem223	0.460	0.402				
B9EHK9	Hacd1	0.962	0.402				
Q6TEK5	Vkorc1l1	0.385	0.402				
Q4FJX4	Csrp1	-1.591	0.403				Sim
G3X937	Slc41a3	0.457	0.403				
Q3UFJ3	Pdha1	0.329	0.404			Sim	
Q80WW9	Ddrgk1	0.131	0.404				
Q545G3	Tcap	-0.345	0.404				
Q80Y14	Glrx5	0.403	0.405			Sim	
D3YZN4	Spg7	0.164	0.406			Sim	
Q8BYX6	Arhgap4	-0.595	0.406				
F8WJ41	Rps15a	0.367	0.406			Sim	
Q8CEK6	Shisa4	0.453	0.407				
E9Q9P4	Kcnma1	0.397	0.407				
Q3U955	Tmpo	0.287	0.408				
Q3UX28	Mpc1	0.386	0.408			Sim	
A4PBQ8	Abca8a	0.229	0.408				
Q9DC71	Mrps15	0.364	0.409			Sim	
Q3TDM8	Scamp3	0.231	0.409				
Q8JZU2	Slc25a1	0.115	0.410			Sim	
Q9DB60	Fam213b	0.108	0.411				
Q5SUF2	Luc7l3	-0.153	0.411				
Q9BCZ4	Vimp	0.167	0.411				
Q3TH46	Rdx	-0.511	0.412				
Q9QYA2	Tomm40	0.311	0.412			Sim	
Q14C53	Slc39a7	-0.698	0.413				
A2A9I0	Gosr2	0.186	0.415				
Q5K4Q9	Mettl7a1	0.105	0.415				
Q9JI39	Abcb10	0.194	0.415			Sim	
Q9DCT2	Ndufs3	0.100	0.416			Sim	
Q91YE8	Synpo2	-1.480	0.417				
E9Q688	Tnnt1	-0.875	0.418				
Q9CYL5	Glipr2	0.194	0.419				
Z4YJU8	Golga2	0.126	0.419				
A0A087WQY7	1810043H04Rik	0.515	0.419			Sim	
Q3TNH0	Tmpo	0.179	0.419				
Q8C1L7	mCG_6739	0.525	0.420				
P63024	Vamp3	0.132	0.421				
Q3UDZ1	Rhog	0.083	0.422				
Q7TMI2	Dnajc30	0.128	0.423			Sim	
Q9DCM2	Gstk1	0.386	0.423			Sim	
E9Q496	Use1	-0.157	0.423				
P37040	Por	0.155	0.423				
Q3TL27	Xpnpep1	0.164	0.425				
Q91WK5	Gcsh	0.654	0.425			Sim	
Q8BU21	Qars	0.000	0.426				
K3W4Q8	Bsg	-0.262	0.426				
Q3TTY6	Lin7c	-0.062	0.426				
Q3U487	Hectd3	0.076	0.427				
Q91WC0	Setd3	-0.329	0.428				
Q60930	Vdac2	0.290	0.428			Sim	
D3Z4J9	Eml1	0.108	0.429				
P10493	Nid1	-0.737	0.429				
Q8C7V8	Ccdc134	0.159	0.429				
D3Z499	Mdga1	0.377	0.429				
Q8BLF1	Nceh1	0.216	0.430				
A2ALA4	Med22	0.189	0.431				
Q99MR9	Ppp1r3a	-0.139	0.431				
Q3UC51	Ddost	0.138	0.431				
Q54AC6	COX17	0.228	0.432			Sim	
Q9CRD0	Ociad1	0.134	0.432			Sim	
Q3UGC5	Bcl2l13	0.183	0.432		Sim	Sim	
E9QNH7	Acbd5	0.307	0.432				
Q6ZWZ6	Rps12	0.601	0.434				
Q1XH17	Trim72	-0.124	0.434				
A8C1T7	Creld1	0.173	0.434				
F6WHQ7	Gstm1	-0.609	0.435				
Q14DH7	Acss3	0.180	0.435			Sim	
Q8CEW7	Zbed5	0.562	0.437				
Q8CG76	Akr7a2	0.299	0.438				
P56375	Acyp2	0.421	0.439			Sim	
A0A075DC92	ND4L	0.486	0.439			Sim	
Q5RKZ7	Mocs1	0.222	0.439			Sim	
Q9D020	Nt5c3a	-0.120	0.440				
P14576	Srp54	0.223	0.440				
Q8VIJ6	Sfpq	0.457	0.441				
Q01339	Apoh	0.307	0.441				
Q9CPP6	Ndufa5	-0.095	0.441			Sim	
Q3UIU9	Hsd3b4	-0.132	0.441				
Q3U240	Cbx4	-0.728	0.442				
Q91VW0	Fam173a	0.381	0.443				

Q9D7N6	Mrpl30	0.172	0.443			Sim	
Q9CRF7	Srp19	0.242	0.444				
Q8K0B7	Slc25a32	0.221	0.447			Sim	
Q9CQW9	Ifitm3	0.369	0.447				
Q8VDC1	Fyco1	0.150	0.447		Sim		
Q3TJH1	Gnai3	-0.125	0.448				
B7ZNH7	Col14a1	0.300	0.448				
Q9CQ69	Uqcrq	-0.248	0.450			Sim	
Q8BGK2	Adprhl1	-0.118	0.450				
A2AFK4	Mtg2	0.011	0.450			Sim	
Q540E2	Mstn	0.244	0.450				
Q5SVR0	Tbc1d9b	-1.161	0.450				
Q3UDS7	Adpgk	0.123	0.451				
Q8VEA4	Chchd4	0.166	0.451			Sim	
Q922E1	Nnt	0.106	0.452			Sim	
Q3TRY0	Wdtc1	-0.197	0.452				
P01027	C3	0.278	0.452				
F8WIX8	Hist1h2al	-0.505	0.452				
Q4KL26	Cacng1	0.427	0.452				
D3Z7P2	Tmem109	1.140	0.452				
Q8C9T1	A630001G21Rik	0.146	0.452				
Q80X95	Rraga	-1.076	0.453				
Q8BJ03	Cox15	0.439	0.453			Sim	
Q6A0D1	Emc2	0.165	0.453			Sim	
Q7JCZ0	mt-Atp8	0.191	0.453				
A0A0G2JFB2	Tdrkh	0.121	0.454			Sim	
A2A4P5	Ptges3l	-0.623	0.454				
P40240	Cd9	-0.152	0.454				
D3Z3L7	Mfap5	-0.292	0.454				
Z4YJT3	Larp1	0.290	0.454				
Q6NVE9	Pptc7	0.492	0.455			Sim	
P48962	Slc25a4	0.161	0.455			Sim	
Q99N92	Mrpl27	0.255	0.456			Sim	
Q4VAE8	Ndufb4	-0.123	0.456			Sim	
C6EQG6	Mnda	0.486	0.457				
Q922Y1	Ubxn1	-0.296	0.457				
P60603	Romo1	0.249	0.457			Sim	
B2ZRS6	Depdc6	0.482	0.458				
P31428	Dpep1	-0.051	0.459				
Q3UY05	Ndufs8	0.227	0.459			Sim	
D3YUT2	Alpk3	-0.104	0.459				
Q8C3X4	Guf1	0.204	0.460			Sim	
E9Q800	Immt	0.292	0.460			Sim	
Q544Y7	Cfl1	0.332	0.461				
S4R2E1	Abcg2	-0.019	0.462				
E9Q8R5	Trabd	0.251	0.462				
Q8CAQ8	Immt	0.287	0.462			Sim	
P62077	Timm8b	0.681	0.462			Sim	
Q99P30	Nudt7	0.328	0.463				
Q6NXZ8	Epb4.2	-0.569	0.463				
Q9ERS2	Ndufa13	0.080	0.463			Sim	
Q921G7	Etfdh	0.215	0.465			Sim	
Q5U5I3	Mrps18a	0.279	0.466			Sim	
A0A0G2JED0	Atp11b	-0.161	0.466				
Q3UGW4	Clpp	0.029	0.466			Sim	
Q9QYT9	Prnpb	0.122	0.467				
Q3U8N1	Sars	-0.005	0.467				
Q3V1C8	Nudt2	0.102	0.467			Sim	
Q3UEK9	Ahsg	-0.243	0.469				
Q9QZH6	Ecsit	0.171	0.470			Sim	
Q544R1	Prosc	0.065	0.471			Sim	
A1A5B6	Tbc1d25	0.725	0.472		Sim		
Q4FK36	Dstn	-0.086	0.472				
Q8BPS5	Slc16a1	-0.327	0.473			Sim	
Q3TU85	Hspa1b	-0.113	0.473				
Q07646	Mest	-0.035	0.474				
P05201	Got1	-1.369	0.474				
Q99JV6	Slc38a10	-0.091	0.475				
Q3U9K3	Coro1a	-0.665	0.476				
P70333	Hnrnph2	-1.257	0.478				
Q9CQB4	Uqcrb	0.387	0.478			Sim	
Q8K2B3	Sdha	0.283	0.478			Sim	
E9QP56	Apoc3	-0.524	0.478				
Q3U379	Gpc1	0.105	0.478				
Q0PD66	Rab1b	-0.066	0.479				
Q0PD38	Rab18	0.140	0.479				
Q3UTE7	Oxa1l	0.012	0.480			Sim	
Q8VCE7	Tmed5	-0.010	0.481				
Q8BJY8	Mtrf1	-0.003	0.481			Sim	
Q9CSR6	Hsd17b12	-0.078	0.482				
P0C5K1	Sbk2	-0.160	0.483				

Q8BJW6	Eif2a	0.082	0.483				
Q3UHH5	Gnaq	0.274	0.487				
Q9EPK2	Rp2	-0.065	0.487				
B1AYG7	Itgb6	-0.300	0.487				
A0A087WR20	Ctsh	0.174	0.487				
Q9CZ13	Uqcrc1	-0.121	0.488			Sim	
B1ARU1	Macf1	-0.286	0.488				Sim
A2AEM2	Clcc1	-0.366	0.488				
Q80ZI6	Lrsam1	-0.595	0.489				Sim
Q9CR67	Tmem33	1.360	0.490				
Q5XQL2	H2-Ab	0.781	0.491				
D3Z7R9	Ccpg1	0.424	0.491				
Q8CFQ9	Fus	0.815	0.491				Sim
H7BX05	Obscn	0.033	0.492			Sim	
E9QMH7	Ikbip	-0.071	0.492				
Q3UDP9	Slc16a3	0.126	0.492				
Q80UJ7	Rab3gap1	-0.383	0.493				
Q8VHG7	Obox2	0.867	0.494				
Q8R035	Ict1	0.019	0.494			Sim	
A2AJI1	Map7d1	-0.163	0.495				
Q0VBU4	Ccdc47	0.080	0.495				
Q3TKM5	Idh3g	0.435	0.495			Sim	
Q4FK74	Atp5d	0.477	0.495			Sim	
Q5NCE8	Mrs2	0.072	0.496			Sim	
B0QZL1	Eno1	-0.544	0.497				
Q14CE3	Cnksr1	-0.148	0.498				
Q91VD9	Ndufs1	0.184	0.498			Sim	
Q9D1H8	Mrpl53	0.354	0.499			Sim	
Q9CPW9	Metap1d	0.201	0.499			Sim	
Q811U4	Mfn1	0.114	0.500			Sim	
Q6QD59	Bnip1	0.127	0.500				
E9PUW6	Crls1	0.333	0.501			Sim	
P26883	Fkbp1a	0.232	0.501				
A1L0U3	Hist1h3e	-0.359	0.502				
Q8BGU5	Ccny	-0.180	0.502				
Q9QY74	Astn2	-0.603	0.502				
Q7TPW6	Slc25a20	0.370	0.504			Sim	
D3Z7Q2	Smim20	0.267	0.504			Sim	
Q80V26	Impad1	0.074	0.506				
Q4FK11	Nono	-0.262	0.510				
Q80VD1	Fam98b	-0.128	0.510				
B2RXY7	Cbr1	-0.059	0.510				
Q9CWW6	Pin4	-0.122	0.510				
A2VDH1	Trak1	-0.296	0.512				
P63094	Gnas	0.237	0.512				
Q5SW19	Cluh	0.018	0.516			Sim	
Q3V3K6	Pigs	0.400	0.517				
Q91XE8	Tmem205	0.293	0.517			Sim	
E0CZ27	H3f3a	-0.308	0.517				
Q3U716	Cars	0.167	0.521				
Q545K5	Rbm3	-0.400	0.521				
D3Z2Z1	Clip1	-0.443	0.522				
Q9D5T0	Atad1	0.440	0.522			Sim	
Q8C3X2	Ccdc90b	0.009	0.523			Sim	
P70158	Smpdl3a	0.716	0.523				
F8VPK0	Ttc37	-0.109	0.524				
D3YVF6	Acsl1	-0.024	0.525			Sim	
E9Q616	Ahnak	-0.024	0.525				
H3BIW5	Ehmt2	0.031	0.528				
Q3U4T9	Sypl	0.243	0.528				
Q61743	Kcnj11	0.369	0.529				
Q811D0	Dlg1	-0.294	0.530				
Q8K2Q5	Chchd7	0.459	0.531			Sim	
Q8BTX9	Hsdl1	0.415	0.532			Sim	
Q60770	Stxbp3	0.196	0.532				
F6ZFT1	Ndufab1	0.432	0.532			Sim	
A2ALK8	Ptpn3	0.210	0.533				
P11352	Gpx1	-0.163	0.533			Sim	
E9Q6R3	Sec22b	0.118	0.534				
Q9EQ80	Nif3l1	0.085	0.534			Sim	Sim
Q924K4	Myoc	0.028	0.535				
Q9JIQ3	Diablo	0.149	0.535			Sim	
Q9JKR6	Hyou1	0.234	0.537				
Q4FK22	Ergic1	0.196	0.538				
E9QPK1	Cgref1	-0.059	0.538				
A2AP58	Sptbn5	0.212	0.538				
E9Q0V6	Nhsl2	-0.087	0.539				
P49586	Pcyt1a	-0.456	0.539				
Q0PD35	Rab21	0.012	0.539				
O70423	Aoc3	-0.484	0.539				
A2RRK3	Slk	-0.533	0.540				

Q8BH40	Stx7	0.065	0.540				
P62814	Atp6v1b2	0.175	0.540				
P28481	Col2a1	-0.394	0.540				
Q9CQJ8	Ndufb9	0.032	0.542			Sim	
S4R2H0	Tmem161a	-0.047	0.543				
Q8BU88	Mrpl22	0.083	0.544			Sim	
Q4FJL0	Rab10	0.491	0.545				
Q69ZQ1	Kiaa1161	0.326	0.545				
P52480	Pkm	-0.513	0.546				
Q60675	Lama2	-0.876	0.548				
Q4VAE6	Rhoa	0.056	0.549				
Q810B1	Mrpl43	0.199	0.549			Sim	
B1AUY9	Naa10	-0.748	0.549				
Q5J7N1	Kras	0.101	0.549				
P17426	Ap2a1	-0.083	0.549				
P42669	Pura	0.006	0.549				
B7ZMW6	Cd163	-0.115	0.549				
Q80YD0	Chd6	0.017	0.550				
Q71V06	Ybx1	0.261	0.551				
Q5BLJ4	Rtca	0.165	0.551				
Q6GQT9	Nomo1	0.117	0.552				
Q8BTR5	Dusp28	0.104	0.552				
G5E889	Mto1	0.034	0.553			Sim	
Q9CZD3	Gars	0.148	0.554			Sim	
Q923B6	Steap4	-0.069	0.555				
Q4FJU3	Crip2	-0.281	0.556				Sim
O70404	Vamp8	-0.487	0.556				
Q8BW41	Pomgnt2	0.457	0.556				
Q8C7F9	Tm9sf2	0.129	0.557				
B2RV71	1110007C09Rik	0.039	0.557				
Q62181	Sema3c	0.194	0.559				
Q5DTS3	Sept7	0.150	0.559				
P21550	Eno3	-0.620	0.560				
Q3UY30	Npr1	-0.215	0.560				
Q0PD49	Rab8b	-0.066	0.560				
G5E902	Slc25a3	0.235	0.561			Sim	
Q8VDN2	Atp1a1	0.118	0.562				
Q9QZB7	Actr10	-0.355	0.563				
P23953	Ces1c	0.095	0.566				
Q3TVP0	mCG_120563	-0.587	0.567				
Q8R1V4	Tmed4	0.014	0.567				
Q9D6J6	Ndufv2	0.007	0.568			Sim	
Q8C6F5	Tm9sf3	-0.019	0.568				
A0A087WRA0	St8sia4	-0.127	0.568				
D3YW02	Gtpbp6	0.358	0.570			Sim	
Q61292	Lamb2	-0.401	0.570				
A6H667	Prkcq	0.090	0.571				
Q9CSP8	Nap1l1	0.176	0.572				
Q2M2Q8	Msi2	-0.112	0.573				
D3Z3S1	Preb	0.024	0.574				Sim
E9Q4M2	Lipe	-0.179	0.574				
Q9CQU3	Rer1	0.058	0.575				
Q9D517	Agpat3	-0.134	0.575				
Q3UTR6	Strn3	-0.613	0.575				
Q3U6V5	Etf1	-0.668	0.575				
Q3V3W7	F13a1	0.123	0.576				
Q3TJ76	Pisd	0.038	0.577			Sim	
Q60936	Adck3	0.242	0.577			Sim	
P05533	Ly6a	-0.273	0.577				
Q3U9V4	Gnb2	0.152	0.577				
Q8VD75	Hip1	0.088	0.577				
O08528	Hk2	0.233	0.578			Sim	
Q8CD23	Ncl	0.201	0.578				
F6XTP0	Rnf121	-0.049	0.578				Sim
P09055	Itgb1	-0.150	0.578				
Q6P5D4	Cep135	0.118	0.579				
Q61001	Lama5	-0.049	0.579				
G3UWY3	Cobl	-0.065	0.579				
E9PZI9	Cd200	-0.109	0.582				
Q9D9V3	Echdc1	0.188	0.582			Sim	
Q9D172	D10Jhu81e	0.543	0.583			Sim	
P52430	Pon1	-0.075	0.583				
D3Z7H8	Cilp2	-0.872	0.585				
Q5IRJ6	Slc30a9	0.023	0.585			Sim	
Q5M9K7	Rps10	0.217	0.586				
Q14AQ2	Rilp	-0.004	0.586				
Q0VF54	Atp2b3	-0.194	0.587				
Q03265	Atp5a1	0.125	0.588			Sim	
Q6NV50	Ctnna1	0.042	0.588				
P06745	Gpi	-0.512	0.589				
Q3U7D9	Vps18	0.002	0.590				

E9Q3H6	Coq10a	0.256	0.591			Sim	
F8VQJ3	Lamc1	-0.399	0.592			Sim	
B7ZMZ9	Nin	-0.030	0.592				
Q3UBF4	Txnl1	-0.022	0.592				
Q8BGY7	Fam210a	0.195	0.593			Sim	
Q8R0Z5	Slc25a28	0.275	0.595			Sim	
G3X9T8	Cp	0.385	0.595				
Q3TU20	Ace	-0.144	0.596				
Q9D6U8	Fam162a	0.420	0.597			Sim	
Q5SZA3	Hist1h1c	0.457	0.597				
Q9JIG8	Praf2	-0.460	0.597				
Q9QWK3	Rhd	-0.248	0.598				
Q91ZX7	Lrp1	-0.048	0.600				
Q91V38	Hsp90b1	0.188	0.600				
Q8K173	Col3a1	-0.268	0.600				
Q3U8P8	Jak1	0.250	0.601				
Q3TTN2	Cast	0.242	0.601				
Q8VDK4	Cdh13	-0.089	0.601				
Q8R3P3	Tmem258	-0.346	0.602				
Q3TVI8	Pbxip1	0.188	0.602				
Q8BI21	Rnf38	0.914	0.602				
Q3UWG5	Cd81	0.404	0.602				
Q3TZQ2	Msn	-0.129	0.602				
E9Q5B5	Hk2	0.239	0.604			Sim	
Q8C872	Tfrc	0.471	0.604				
A0A0A6YVR9	Surf1	-0.107	0.605			Sim	
Q3UEM7	Fgg	-0.272	0.606				
Q545U9	Art1	0.190	0.607				
Q6PDL0	Dync1li2	-0.492	0.607				
Q9D7A8	Armc1	0.196	0.608				
Q545P0	Atp1b1	0.055	0.608				
Q8BPI6	Pcmt1	0.289	0.608				
Q8K133	Rab24	0.068	0.610			Sim	
F8VPL5	Map4k4	0.031	0.611				
F6SXM5	Ssb	0.127	0.611				
P99028	Uqcrh	0.132	0.612			Sim	
H3BJ71	Ctage5	-0.083	0.612				
Q3U6Y9	Cd36	-0.110	0.614				
Q99JR1	Sfxn1	0.286	0.614			Sim	
F6QI82	Clcn1	-0.169	0.615				
Q63918	Sdpr	0.478	0.615				
E9Q705	Bola3	0.478	0.615				
Q3U9U5	Bcap31	0.066	0.616				
Q3TJ39	Rab5c	-0.165	0.618				
Q4VBD2	Tapt1	0.041	0.619				
O70251	Eef1b	0.209	0.620				
Q5XK33	Sdhc	0.448	0.620			Sim	
Q8BHS6	Armcx3	-0.202	0.620				
D3YU17	Ncln	0.191	0.621				
Q3TYL9	Cnp	0.497	0.621				
P08752	Gnai2	-0.112	0.625				
A2A813	Park7	-0.164	0.625			Sim	
Q80TN1	Camk2a	0.087	0.626				
Q9CVJ6	Tram1	-0.063	0.626				
A2VCP8	Cltb	0.245	0.626				
Q8CEU2	Gprc5c	-0.294	0.628				
D6RDC1	Tmem41b	-0.232	0.628				
E9PYJ6	Focad	0.127	0.628				
P70302	Stim1	0.140	0.628				
Q8BGB4	Bcam	-0.536	0.629				
B0R091	Chp1	0.341	0.630				
Q9ERE7	Mesdc2	0.104	0.630				
Q9CRC0	Vkorc1	0.233	0.631				
Q52PE3	Ssr1	0.125	0.632				
Q5U421	Mapk14	0.002	0.634				
Q54AA6	Dgat1	0.124	0.634				
P83741	Wnk1	-0.561	0.635				
D3Z7F0	Ldhb	-0.477	0.635				
Q9CXD6	Mcur1	0.027	0.636			Sim	
Q3UAS7	Gsr	0.380	0.637			Sim	
Q6XE40	Mpp3	-0.044	0.638				
Q6ZWR6	Syne1	0.488	0.640				
Q9JIK8	Ndk3	0.167	0.640				
Q8BP47	Nars	-0.327	0.641				
Q8BU20	Ndufb5	-0.146	0.641			Sim	
Q8R2L0	Cox6a2	-0.314	0.642			Sim	
Q3UPH1	Prrc1	0.071	0.642				
Q80ZW2	Them6	0.002	0.643				
Q3TGM7	Hbs1l	-0.400	0.643				
D3Z497	Gm7075	-0.437	0.644				
Q14C26	Emc7	-0.023	0.644				

Q9DB77	Uqcrc2	0.066	0.644			Sim	
Q2HZ94	Mrc1	-0.076	0.645				
Q3UZI3	Snd1	-0.032	0.645			Sim	
F8WHM5	Glg1	0.031	0.645				
Q922B1	Macrod1	0.215	0.647			Sim	
Q8R216	Sirt4	0.159	0.647			Sim	
Q3TMC4	Slc25a44	0.136	0.648			Sim	
Q91VE2	P2rx5	-0.419	0.648				
G5E814	Ndufa11	0.348	0.649			Sim	
Q5EBK8	Dynlt1	0.026	0.653				
P99027	Rplp2	0.040	0.654				
Q3UBN8	Bpnt1	0.024	0.655				
O70514	Fgfbp1	0.225	0.656				
A2RS22	Coro1b	0.039	0.656				
Q80XN0	Bdh1	-0.109	0.657			Sim	
Q8BVF2	Pdcl3	-0.225	0.657				
Q5NC82	Nme2	-0.144	0.659				
Q9QYI4	Dnajb12	-0.061	0.659				
Q3U6Z1	Lcp1	0.124	0.660				
Q3U343	Zfp622	-0.154	0.660				
Q3ULF7	Actr3	-0.195	0.660				
E9QJS0	Mrps10	-0.019	0.661			Sim	
Q921N7	Tmem70	0.050	0.662			Sim	
Q9D6M3	Slc25a22	-0.188	0.662			Sim	
Q3U8Y1	Mrps11	0.335	0.662			Sim	
Q8CCJ3	Ufl1	-0.177	0.663				
D3Z2J6	Tmx2	0.298	0.664				
Q9D8B4	Ndufa11	0.398	0.665			Sim	
A3KCG1	Orai1	-0.230	0.666				
Q5FW97	EG433182	-0.352	0.666				
Q8CHR8	Drg1	-0.160	0.667				
Q80X56	Trim69	-0.007	0.667				Sim
Q8C1Y3	H1f0	0.536	0.668				
D3YTP0	Steap3	-0.073	0.669				
Q9D1I5	Mcee	0.246	0.671			Sim	
Q9DBE8	Alg2	0.261	0.672				
Q8R3Q0	Saraf	-0.120	0.672				
Q8C5G6	Tollip	-0.097	0.673				
Q9JKY7	Cyp2d22	0.005	0.673				
Q3UDG2	Wars	0.135	0.674				
Q8C297	Tmem14c	0.474	0.675			Sim	
Q6R5N8	Tlr13	0.244	0.675				
D3YY42	Yif1b	0.115	0.675				
Q5SW18	Pafah1b1	0.125	0.675				
Q3TDU5	Mfge8	0.032	0.676				
Q5RL55	Abcf1	0.400	0.678				
F6ZFU0	Eef1d	-0.091	0.678				
Q99K28	Arfgap2	0.169	0.680				Sim
Q6RUT7	Ccsmst1	0.019	0.680				
Q3TLW5	Aqp1	0.190	0.681				
Q9D7N9	Apmap	0.126	0.682				
B1AWE0	Clta	-0.181	0.682				
Q6NVG5	Mreg	-0.293	0.683				
Q9JJC6	Rilpl1	0.083	0.683				
Q80X85	Mrps7	0.211	0.684			Sim	
Q7TSZ3	Lars	-0.089	0.685				
Q91VA7	Idh3b	0.298	0.685			Sim	
F6VME3	Mbp	0.825	0.685				
Q9CPS6	Hint3	-0.141	0.686			Sim	
Q9CRD0	Ociad1	-0.010	0.686			Sim	
Q58E35	Rplp1	0.381	0.687				
Q9CZI7	Anxa2	0.381	0.687				
G5E8J6	Hrc	0.164	0.689				
Q9D239	B2m	-0.267	0.691				
Q58E39	Hnrnpa3	-0.177	0.691				
G3UYU4	Flot1	-0.047	0.692				
Q546G4	Alb	0.111	0.692				
Q1MXF9	Scn4b	0.060	0.694				
Q1WWK3	Hist1h1b	-0.510	0.696				
Q3UBU9	Fkbp3	0.298	0.697				
Q6P4T1	Snx19	0.170	0.697				
E9Q0D4	Sbf2	-0.319	0.698				
Q8BXZ1	Tmx3	0.035	0.699				
H3BLL2	Atpaf1	0.177	0.700			Sim	
G5E850	Cyb5a	0.153	0.700				
A3KGR9	H13	-0.194	0.702				
Q9CQD1	Rab5a	-0.096	0.702				
Q9CZX9	Emc4	0.214	0.704				
M4TKR7	Insr	-0.114	0.704				
F8WIS9	Camk2a	0.054	0.704				
Q8K4T3	Stradb	-0.237	0.704				

A2BFF8	Dync1i2	-0.082	0.706				
Q8CEG7	Exoc4	0.109	0.706				
Q9CRB9	Chchd3	-0.028	0.707			Sim	
Q61733	Mrps31	0.217	0.708			Sim	
Q5JC28	Eps15	-0.371	0.710				
Q8BPG5	Rac1	-0.075	0.710				
Q17ST2	Kcna7	0.100	0.711				
Q8BH80	Vapb	0.265	0.711				
A0A0A6YY53	Ighg2c	-0.199	0.711				
Q3UVK0	Ermp1	-0.282	0.711				
P56379	Mp68	0.256	0.711				
Q3TD51	Picalm	-0.056	0.712				
Q8R2G4	Art3	-0.104	0.715				
A2A5R8	Stau1	-0.169	0.716				
F6U2C2	Atxn2	-0.187	0.716			Sim	
Q9JK92	Hspb8	-0.633	0.716				
Q3US82	C1qb	-0.037	0.717				
Q7M6Y3	Picalm	-0.034	0.717				
P97450	Atp5j	-0.068	0.718			Sim	
Q8VCL2	Sco2	0.230	0.718			Sim	
Q5NCJ9	Uqcr10	0.257	0.719			Sim	
P50518	Atp6v1e1	-0.351	0.721				
Q9CVT6	Timm21	-0.027	0.722			Sim	
Q9CQS4	Slc25a46	0.052	0.723			Sim	
P62141	Ppp1cb	-0.193	0.723				
Q2YDW1	Eif3j	-0.089	0.724				
F6S1R2	Ahsa2	0.323	0.726				
Q5M8R9	Fdps	-0.108	0.726				
Q3TLQ4	Mrps6	0.125	0.727			Sim	
F6V084	Tmx1	0.281	0.727				
D3YWR7	Qdpr	-0.124	0.729			Sim	
Q9DAU1	Cnpy3	0.120	0.729				
Q8C5J1	Aldh3a2	-0.043	0.730			Sim	
Q3TU16	Abcd2	0.164	0.731			Sim	
Q9WU79	Prodh	0.119	0.731			Sim	
D3Z1A8	Sdhc	0.213	0.733			Sim	
Q8C292	Kars	-0.017	0.733			Sim	
A0A087WP03	Dnajb2	-0.364	0.734				
Q8C7E7	Stbd1	0.086	0.734		Sim		
Q8VC72	Ndufs8	0.173	0.734			Sim	
P49442	Inpp1	-0.129	0.735				
Q542F1	Clic1	-0.205	0.737				
Q3TWV4	Ap2m1	-0.054	0.737				
Q8VC79	Apom	0.043	0.737				
P82349	Sgcb	-0.263	0.739				
Q8BMD8	Slc25a24	0.274	0.741			Sim	
Q549D0	Cd63	-0.342	0.742				
P05202	Got2	-0.191	0.742			Sim	
D3YYQ5	Amy1	-0.501	0.743				
B8JK33	Hnrnpm	-0.141	0.743				
Q3UUI3	Them4	0.024	0.743			Sim	
Q3UDK5	Cox7a2l	-0.113	0.744			Sim	
Q8BME2	Ndufa12	-0.031	0.745			Sim	
Q3U957	Derl2	0.135	0.746				
Q80T06	Eef1d	-0.106	0.747				
Q9ES97	Rtn3	-0.151	0.747				
Q9CQ75	Ndufa2	0.048	0.749			Sim	
A2ALW5	Dnajc25	-0.036	0.749				
A0A075B6A3	Igha	-0.151	0.749				
Q9D6H6	Ndufb3	0.001	0.750			Sim	
Q8C553	Lmnb1	-0.186	0.751				
D3Z2K2	Mrps14	0.041	0.752			Sim	
Q3TRI2	Dab2	-0.208	0.752				
Q61738	Itga7	-0.183	0.753				
Q3U4W5	Rab6a	0.084	0.753				
Q8CAW4	Pecam1	0.054	0.754				
Q5SVJ0	Camk2b	0.042	0.755				
Q3TI65	Mtfp1	-0.043	0.755			Sim	
Q9CPT4	Mydgf	0.137	0.756				
Q548W7	Dbi	-0.368	0.756			Sim	
Q5FWI3	Tmem2	0.286	0.757				
Q3UZP4	Svip	-0.073	0.757				
P14142	Slc2a4	-0.084	0.758				
A2AI08	Tprn	0.427	0.759				
Q60963	Pla2g7	0.067	0.759				
Q9CWJ9	Atic	0.259	0.760			Sim	
Q6A0E4	Herpud1	-0.274	0.761				
Q5M9N6	Rpl37a	0.658	0.761				
B1AWT7	Ube2j1	-0.191	0.762				
Q3UF82	Mapk1	0.251	0.763				
Q3UGC3	Cald1	-0.190	0.763				

Q497V8	2310061I04Rik	-0.174	0.766			Sim	
E9QQ96	Obscn	-0.006	0.767			Sim	
Q6PGC1	Dhx29	-0.001	0.768				
Q7TPW2	Slc16a10	-0.403	0.769				
Q8BL66	Eea1	0.243	0.769				Sim
Q8BFR4	Gns	0.080	0.769				
Q9D0M3	Cyc1	-0.080	0.771			Sim	
Z4YL78	Ckap5	0.223	0.772				
Q8CDP6	Skiv2l	-0.029	0.772				
F8VPX1	Usp7	0.064	0.773				
Q9CPX7	Mrps16	0.036	0.775			Sim	
Q8CHR4	Vamp2	0.191	0.775				
Q3U781	Srsf3	0.123	0.777				
Q3V3C0	Polrmt	-0.217	0.778			Sim	
W4VSP6	Gm5538	-0.241	0.782				
Q6PBC0	Cds2	0.138	0.782				
Q8R1Q3	Angptl7	0.061	0.783				
Q7JCY9	mt-Atp6	0.935	0.783				
Q8BJS4	Sun2	-0.002	0.784				
Q3TM18	Rnf19a	0.477	0.784				Sim
Q9Z1P6	Ndufa7	0.120	0.784			Sim	
Q9ESU7	Slc1a5	-0.095	0.785				
E0CYI9	Gcc2	0.223	0.787				
H3BIY9	Ap2b1	-0.007	0.787				
Q8K2Q7	Brox	0.483	0.788				
Q9D173	Tomm7	-0.127	0.788			Sim	
Q80VF9	Rftn1	0.082	0.789				
A2AUM6	Srp14	0.018	0.790				
P24527	Lta4h	0.122	0.790				
Q793L1	Emc9	0.078	0.791				
Q9ER00	Stx12	-0.184	0.792				
Q00898	Serpina1e	0.076	0.793				
B1AZ42	Chmp6	-0.160	0.795				
E9Q390	Myof	0.192	0.795				
S4R1E5	Gpx4	-0.415	0.796			Sim	
Q3V4A0	Tmco1	0.103	0.796				
Q8C5C0	Samhd1	-0.096	0.798				
Q8CD10	Micu2	-0.130	0.798			Sim	
Q8BMH2	Rnpep	0.104	0.798				
Q9JL56	Gde1	0.030	0.799				
P54116	Stom	0.086	0.801			Sim	
Q8BZS4	Prss23	-0.131	0.802				
Q9CQZ5	Ndufa6	0.023	0.802			Sim	
Q9ESB3	Hrg	-0.103	0.803				
Q9D8P4	Mrpl17	0.271	0.803			Sim	
Q3TFP8	Pgrmc1	0.011	0.804				
Q3U3T6	Stk24	0.111	0.804				
Q9D577	Scamp1	0.190	0.804				
Q8R3I5	Wdfy1	-0.076	0.806				
A4FUU9	Selo	0.191	0.806			Sim	
Q3TR59	Utrn	0.222	0.806				
Q197W7	Man2a2	0.063	0.806				
Q91WS0	Cisd1	0.064	0.807			Sim	
O54724	Ptrf	0.127	0.808				Sim
G3X931	Vmn2r65	0.279	0.810				
Q02525	Zfp39	0.064	0.810				Sim
Q8R0F8	Fahd1	-0.450	0.810			Sim	
Q9CQU5	Zwint	0.093	0.811				
G3X8T7	Scn4a	0.136	0.811				
Q99KU0	Vmp1	-0.104	0.812				
Q9D6Y7	Msra	0.021	0.812			Sim	
I6L9A5	Pgm2l1	-0.110	0.814				
Q78IK4	Apool	0.136	0.815			Sim	
E9QMB7	Naa30	0.022	0.816				
D3YW52	Pzp	-0.190	0.816				
P84084	Arf5	-0.110	0.817			Sim	
F6RPJ9	Ide	0.108	0.820			Sim	
E9QM38	Slc12a2	0.079	0.821				
Q8C988	Emc8	-0.049	0.822				
B9EHZ5	Mpp6	0.063	0.825				
G3UVV5	Ecscr	-0.135	0.826				
F7D1I5	Gypc	-0.099	0.826				
A2A7S7	Yars	-0.185	0.827				
E9Q242	Adsl	-1.645	0.828				
A0A0A0MQC7	Mapt	0.029	0.828				
Q91YZ8	Pabpc4	-0.021	0.828				
Q9DCX2	Atp5h	-0.017	0.829			Sim	
A2AKI5	Itgav	-0.075	0.829				
E9PVB7	Satb1	0.085	0.829				Sim
P43274	Hist1h1e	0.129	0.830				
Q62425	Ndufa4	0.020	0.831			Sim	

Q8JZN1	Mgl2	-0.053	0.832				
P17439	Gba	0.251	0.832				
Q9CXY0	Rala	-0.018	0.833				
A0A067XG51	Fgf13	0.512	0.834				
Q80XM8	C2cd2	0.105	0.834				
E9Q5W5	Zzef1	-0.071	0.836				
Q8BTE0	Sdhaf4	0.668	0.836			Sim	
F7DBB3	Ahnak2	-0.020	0.836				
Q9DBM2	Ehhadh	0.012	0.837			Sim	
Q3TXR9	Hexb	-0.205	0.838				
Q8BL03	Slc25a29	-0.262	0.840			Sim	
O89116	Vti1a	-0.112	0.841				
Q8BMA6	Srp68	-0.172	0.841				
Q3U931	G3bp2	0.071	0.841				
A0A0G2JDF1	Srrt	-0.138	0.843				
Q8BMK4	Ckap4	0.107	0.843				
Q6P9T6	Acbd3	-0.049	0.844				
Q791T5	Mtch1	0.265	0.844			Sim	
Q3U967	Cd47	-0.091	0.845				
P62071	Rras2	0.181	0.845				
Q9MD68	mt-Co1	0.687	0.846				
Q3UKW2	Calm1	0.003	0.847				
Q9CPQ3	Tomm22	0.061	0.847			Sim	
Q9EQ79	Alpl	-0.360	0.847				
Q6KAU3	Mrps25	-0.067	0.848			Sim	
P04104	Krt1	-0.367	0.849				
P24549	Aldh1a1	-0.134	0.849				
Q8R3E3	Wipi1	-0.292	0.849				
Q8VCF0	Mavs	0.080	0.850			Sim	
Q8K1J6	Trnt1	0.130	0.852			Sim	
Q80X50	Ubap2l	0.099	0.853				
Q8C5E7	Snx5	0.051	0.853				
Q3UN88	Mcpt4	-0.030	0.855				
Q5M9P0	Ahcy	0.249	0.855				
B2RUR3	Abcb1b	-0.241	0.856				
P20065	Tmsb4x	0.203	0.857				
Q3TIV5	Zc3h15	0.221	0.861				Sim
Q543E2	Slc25a15	-0.018	0.861			Sim	
Q544H0	Eif3g	0.013	0.862				
Q8C013	Tpbgl	0.178	0.862				
Q3U8W0	Ppp1ca	-0.118	0.863				
E9Q6A6	Col6a6	-0.060	0.864				
E9Q740	Srp72	0.033	0.865				
Q6PEE6	Ap2a2	0.147	0.865				
P62073	Timm10	-0.254	0.866			Sim	
A0A0A6YWH7	Serpinc1	-0.054	0.867				
Q792Z1	Try10	-0.285	0.867				
Q61411	Hras	0.069	0.867				
E9QP46	Syne2	0.131	0.868				
Q6IMP4	Panx2	0.290	0.868				
A0A0A6YWL5	Ppapdc3	-0.225	0.869				
Q91ZQ1	Pde6c	0.294	0.869				
Q3TJT6	Sco1	0.225	0.870			Sim	
Q3U344	Arf3	-0.060	0.870				
Q640N1	Aebp1	-0.006	0.870				
Q3TQ70	Gnb1	0.076	0.871				
Q14AR0	Slirp	-0.020	0.871			Sim	
D3YV81	Slmap	-0.358	0.871				
Q3TI40	Mtx2	0.073	0.872			Sim	
F6RG68	Fcho2	0.025	0.872				
Q6IWE1	Sdha	0.474	0.872			Sim	
Q3UFZ6	Caprin1	-0.055	0.873				
Q3TDP3	Agpat5	-0.185	0.876			Sim	
Q9QZD8	Slc25a10	-0.028	0.877			Sim	
A0A087WSU3	Ndufs1	0.117	0.877			Sim	
F6SQM4	Itfg3	-0.168	0.879				
Q9CRC6	2010012O05Rik	-0.273	0.879				
Q9DCJ5	Ndufa8	0.058	0.883			Sim	
A2ARZ3	Fsip2	-0.060	0.885				
Q8BXA5	Clptm1l	0.126	0.887				
B7ZWF9	Oxld1	-0.064	0.888			Sim	
B6ZHD0	Epb4.1l2	0.053	0.890				
Q3UMI7	Eef2	0.341	0.891				
E0CYH0	Wtap	0.135	0.891				
Q91X95	Gna11	0.155	0.892				
Q9DC36	Flot2	0.008	0.892				
Q8BRF7	Scfd1	0.068	0.893				
Q8K2C9	Hacd3	-0.195	0.895				
G3X8Q1	Cabin1	0.255	0.895				
Q0QEZ4	Sdhb	0.089	0.896			Sim	
J3QP41	Creg1	0.420	0.897				

J3QQ22	Smg1	0.349	0.898				
A2RSV8	Cox4i1	0.082	0.900			Sim	
Q3UF30	S100a10	0.159	0.901				
A0A0G2JGS4	Camk2d	0.036	0.902				
Q8BN32	Pabpc1	0.200	0.903				
Q792A4	Cox7a1	-0.036	0.903			Sim	
Q60949	Tbc1d1	0.299	0.904				
A0A0G2JFF9	Hax1	-0.129	0.905				
O35295	Purb	-0.056	0.906				
Q3ULE5	Ubxn4	0.260	0.906				
D3YU60	Mgst1	-0.030	0.906			Sim	
Q9CPV4	Glod4	0.008	0.907			Sim	
B2RSW8	Pcm1	-0.004	0.910				
Q9CQV1	Pam16	0.105	0.911			Sim	
A2ASL8	Lnp	0.035	0.911				
Q920G6	CD59A	-0.004	0.912				
Q3TA75	Fxr2	0.257	0.912				
F8WHW3	Tmem55b	0.104	0.914				
Q9QZ84	Cenpf	0.189	0.914				
Q9D9X9	Pdha2	-0.668	0.914			Sim	
H7BWY7	Arih1	0.169	0.914				
Q9CPQ1	Cox6c	0.009	0.916			Sim	
Q923T9	Camk2g	-0.119	0.916				
Q3TLX1	Nampt	-0.054	0.917				
Q6NVF7	Prx	-0.046	0.918				
Q6PCM2	Ints6	-0.026	0.918				
Q3UP74	Anpep	-0.008	0.918				
D3YVV1	Tmem30a	0.031	0.919				
E9QAH1	Golgb1	-0.551	0.922				
Q9WTI7	Myo1c	0.046	0.922				
Q9DCS9	Ndufb10	-0.067	0.922			Sim	
Q9D6J9	Sdhd	0.366	0.923			Sim	
P21614	Gc	0.055	0.924				
Q9CQJ1	Higd2a	0.066	0.924			Sim	
P97287	Mcl1	-0.089	0.925				
Q9CQG4	Reep5	0.115	0.927				
O88983	Stx8	0.154	0.927				
Q0VE46	Myadm	-0.160	0.928				
Q8N7N5	Dcaf8	-0.020	0.929				
Q3UJ95	Pip4k2b	-0.177	0.930				
Q8BTE5	Cebpzos	0.086	0.930				
E9Q0U7	Hsph1	0.143	0.931				
D3YUM1	Ndufv1	0.035	0.932			Sim	
Q4VA29	2700060E02Rik	-0.026	0.932				
Q8K190	Saysd1	-0.122	0.933				
E9QK82	Mpz	0.050	0.935				
Q9ES83	Bves	0.002	0.935				
D3YVC9	Slc25a16	0.367	0.935			Sim	
Q545U2	Timm17a	0.028	0.936			Sim	
B2RVS5	Mettl21c	0.749	0.936				
Q8BJZ4	Mrps35	0.193	0.937			Sim	
A0A087WS23	Ktn1	-0.122	0.940				
Q8JZM0	Tfb1m	0.200	0.942			Sim	
Q60936	Adck3	0.306	0.945			Sim	
E9PXB9	Timm22	-0.012	0.950			Sim	
P53702	Hccs	0.077	0.952			Sim	
P49290	Epx	-0.109	0.953				
Q4KL41	Tomm20	0.020	0.953			Sim	
Q3TTT2	P4ha1	0.450	0.954				
Q8K2V2	Tmcc1	-0.099	0.956				
Q9D3C4	Arpc4	-0.220	0.956				
Q3UAX2	Lpl	-0.210	0.957				
B2RPS1	Rab5b	-0.048	0.958				
B1ARW4	Ndufs5	0.142	0.958			Sim	
Q3TVN4	Ap1b1	0.040	0.959				
Q3UGR5	Hdhd2	0.262	0.960				
Q9Z239	Fxyd1	0.140	0.961				
Q7TQH0	Atxn2l	0.281	0.962				
Q8C129	Lnpep	-0.088	0.963				
D3YWI4	Mpv17	0.211	0.963			Sim	
Q91VK2	Eef1d	-0.125	0.964				
P97823	Lypla1	-0.030	0.964			Sim	
Q78IK2	Usmg5	-0.014	0.968			Sim	
Q0PD50	Rab8a	0.135	0.969				
Q8BIM2	Stim2	-0.183	0.971				
Q5SVY2	Ppia	-0.084	0.972				
Q8BY89	Slc44a2	-0.076	0.975				
P09528	Fth1	0.059	0.976			Sim	
A0A075B5P6	Ighm	-0.181	0.978				
J9JIB2	Obscn	-0.049	0.978			Sim	
F8VQC7	Ktn1	-0.160	0.982				

D3Z5Y5	Cept1	0.043	0.982				
Q8BIS2	4732456N10Rik	-0.296	0.982				
Q9D8H7	Oma1	0.051	0.983			Sim	
Q9D1Q4	Dpm3	-0.117	0.984				
G3UWE2	F830016B08Rik	-0.016	0.985				
Q6PE78	Vps26a	-0.147	0.985				
Q9ERI6	Rdh14	0.036	0.985			Sim	
Q3TYR7	Sh3glb1	-0.311	0.986				
Q9WV96	Timm10b	-0.042	0.986			Sim	
Q4FZK2	Eef1g	-0.048	0.986				
Q14BR4	Arf4	-0.296	0.986				
Q545K0	Ndufa1	-0.078	0.987			Sim	
Q8BI84	Mia3	-0.065	0.987				
Q8C1A5	Thop1	0.049	0.988				
Q8BXC0	Ptgis	-0.093	0.990				
Q9CR24	Nudt8	0.097	0.990			Sim	
A0A087WNP6	Cdv3	-0.550	0.992				
Q7TMK9	Syncrip	-0.133	0.993				
Q8R123	Flad1	0.040	0.994			Sim	
P08030	Aprt	0.559	0.995				
Q05DM6	Tmed1	0.052	0.996				
Q8CJG0	Ago2	0.048	0.996				
Q8VHE0	Sec63	0.076	0.997				
Q545D8	Prg2	-0.275	0.998				
Q3TDE4	Ncstn	-0.152	0.998				
Q61584	Fxr1	0.172	0.999				
Q7TQ95	Lnp	-0.074	1.000				
Q3UBA7	Prkar1a	0.137	1.000				
D3Z139	Esrp2	-0.357	1.000				Sim
F8VQ28	Pxn	-0.569	1.000				Sim
A2A6M1	Snf8	-0.037	1.000				Sim
Q5SVT1	Trim16	-0.660	1.000				Sim
Q3UDN8	Trim28	-19.692	1.000				Sim
E9QAT9	Trim54	-0.339	1.000				Sim
Q3UYR3	Cbfb	-18.793	1.000				
Q8C7D2	Crbn	-18.261	1.000				
Q3TCH7	Cul4a	-0.103	1.000				
Q6A0B5	Fam175b	-1.030	1.000				
Q3KN92	Fbxo40	-19.186	1.000				
Q6PAV2	Herc4	-0.633	1.000				
Q5SWQ8	Pex12	-0.826	1.000				
Q9CSU2	Psmd14	-1.111	1.000				
A2VCP7	Psmf1	-17.790	1.000				
D3Z061	Uba6	-17.944	1.000				
Q9CY34	Ube2f	-20.644	1.000				
Q5DTH1	Ube3a	-0.440	1.000				
Q80U95	Ube3c	-0.374	1.000				
I7ENE7	Uchl1	-0.995	1.000				
Q3U816	Htatip2	0.191	1.000			Sim	
P40142	Tkt	0.526	1.000			Sim	
Q9CYG7	Tomm34	0.586	1.000			Sim	
B7ZMX4	1700024P16Rik	-19.804	1.000				
E9QNR6	AI837181	-19.328	1.000				
Q3TY95	Akt2	-18.492	1.000				
A2AKV7	Alkbh3	-17.459	1.000				
A2AE38	Amigo1	4.358	1.000				
B9EHQ4	Angpt2	-18.589	1.000				
Q5U432	Apol7b	0.284	1.000				
Q61599	Arhgdib	-0.408	1.000				
Q8BNU0	Armc6	-0.551	1.000				
Q9CXW3	Cacybp	-19.990	1.000				
Q8BJA6	Camk1	-18.880	1.000				
Q3U4S3	Cd96	0.235	1.000				
Q9D1P4	Chordc1	-20.996	1.000				
E0CYY1	Ciapin1	-18.327	1.000				
Q63829	Commd3	-0.251	1.000				
F2Z3X3	Cuedc1	-0.466	1.000				
Q8K0E9	Dhdh	0.113	1.000				
Q9QXB9	Drg2	-0.024	1.000				
Q99JX4	Eif3m	-0.182	1.000				
Q8BGB7	Enoph1	1.538	1.000				
Q8VEH5	Epm2aip1	-19.455	1.000				
Q99K58	Fbln2	-0.696	1.000				
Q9CRA9	Fgfr1op2	0.943	1.000				
Q9CPX4	Ftl1	-3.050	1.000				
Q8BT78	Gbe1	-0.168	1.000				
Q3UDC0	Gbp2	0.228	1.000				
D3YTN4	Gimap4	-0.459	1.000				
Q566C3	Gpt	-18.110	1.000				
Q3TNK3	Gpx7	0.503	1.000				
P24472	Gsta4	-18.363	1.000				

A1L0V4	Hist1h3i	0.015	1.000				
Q8K0U4	Hspa12a	-17.490	1.000				
Q61249	Igbp1	-1.433	1.000				
Q3UEQ1	Inpp4a	-18.455	1.000				
Q5U4C5	Ipo4	-0.552	1.000				
Q9R000	Itgb1bp2	-20.080	1.000				
F6RJV6	Lancl2	0.443	1.000				
A2RTH5	Lcmt1	-0.863	1.000				
Q8C094	Mapk9	0.565	1.000				
Q3U2P8	Mapkapk2	-0.548	1.000				
Q6PE05	Mat2a	0.435	1.000				
Q921Z9	Mpi	1.008	1.000				
Q3UWK4	Mttp	0.378	1.000				
D3Z2J4	Aktip	-0.440	1.000				
A2ABU4	Myom3	0.241	1.000				
Q9D8B3	Chmp4b	-1.079	1.000				
Q9CZA6	Nde1	-0.318	1.000				
Q7TQG5	Neo1	19.684	1.000				
B2RR26	Nhlrc2	0.065	1.000				
D3Z3J6	Paip1	-17.076	1.000				
Q8CIN4	Pak2	0.369	1.000				
Q3UF75	Parva	-17.990	1.000				
Q3UGT9	Parvb	-0.351	1.000				
F8WI55	Pdcd10	-19.474	1.000				
Q0VG59	Pgm5	0.616	1.000				
Q80UI5	Pik3r1	-17.506	1.000				
Q8K394	Plcl2	-0.449	1.000				
Q3UE59	Pltp	-19.130	1.000				
Q543K9	Pnp	-18.735	1.000				
Q3UB60	Ppid	-18.186	1.000				
Q6PD28	Ppp2r5b	-1.277	1.000				
D6RGU9	Ubxn2a	-0.703	1.000				
G5E8R4	Ppp6r3	-19.722	1.000				
Q8BGM7	Prkag3	-19.890	1.000				
Q1MX43	Prkcd	-19.935	1.000				
D6RGL6	Ptgr2	-0.292	1.000				
Q8BKH0	Rap1gds1	-1.230	1.000				
J3QSN2	Usp13	-20.228	1.000				
A2A4J8	Vps25	-20.417	1.000				
D3Z7I9	Osbpl1a	-18.674	1.000			Sim	
A2AA71	Sec24a	0.410	1.000				
S4R2A9	Sec31a	0.683	1.000				
Q63844	Mapk3	-0.209	1.000				
A2ARZ7	Rab22a	-0.947	1.000				
P97355	Sms	-1.560	1.000				
F6T867	Sri	-19.108	1.000				
Q3UG53	Stk10	-0.575	1.000				
Q91VJ4	Stk38	-18.974	1.000				
E9Q0Z7	Sumf1	1.169	1.000				
Q3URF1	Synpo	0.192	1.000				
Q3UL39	Tnpo3	-17.977	1.000				
Q3U9K9	Trappc3	-18.947	1.000				
Q9CR09	Ufc1	-1.195	1.000				
E9PUW7	Xpo7	-0.426	1.000				