

IGUARACY PINHEIRO DE SOUSA

**Fatores de Risco Cardiovascular e a Gênese da Disfunção
Endotelial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2021**

IGUARACY PINHEIRO DE SOUSA

**Fatores de Risco Cardiovascular e a Gênese da Disfunção
Endotelial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Iguaracy Pinheiro de
Fatores de risco cardiovascular e a gênese da
disfunção endotelial / Iguaracy Pinheiro de Sousa. --
São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Endotélio/fisiopatologia
2.Aterosclerose 3.Integração de dados ômicos 4.Redes
regulatórias 5.Sequenciamento da cromatina acessível
6.Sequenciamento de cromatina por imunoprecipitação

USP/FM/DBD-257/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Zerbini.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a pessoas essenciais na minha vida:

Aos meus pais, Francisco das Chagas e Antônia Meires, que fizeram o possível e o impossível para tornar essa jornada uma realidade.

Aos meus irmãos, Paraguacy, Dyeime, Dyeine e Cauã, principalmente pelos conselhos e incentivos para chegar até aqui.

À minha amada companheira Elayne B Jardim, que dentre os tantos aprendizados vividos e compartilhados, o de sempre ampliar nossos horizontes é o que mais tem definido nossas vidas, seja acadêmica ou pessoal.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais seria possível sem a ajuda de uma rede de pessoas que foram essenciais para o seu desenvolvimento, e é com imensa alegria que agradeço:

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Krieger, que foi muito além da orientação deste trabalho, e me guiou com ensinamentos fundamentais para sempre almejar a realização de uma ciência de qualidade. Nunca em um período tão curto e rápido de tempo, apesar dos 5 anos para a realização desse trabalho, trabalhei com tantas coisas incríveis. Tive discussões extremamente enriquecedoras, questionamentos e hipóteses criadas a cada discussão, testes e mais testes, busca de outras expertises para nos auxiliar quando nos víamos limitados com as ferramentas que tínhamos no momento. E no final, percebi que a coisa mais valiosa para fixar desse doutorado foi aprender a fazer uma boa pergunta, mais do que qualquer técnica realizada ou aprendida até aqui. Isso o prof. Krieger me ensinou com maestria e serei eternamente grato. Cabe a mim, então, continuar aperfeiçoando tais ensinamentos e, quem sabe, futuramente lhe prover alguns netos e bisnetos cientistas.

À minha companheira de vida Elayne Jardim, pessoa essa que venho compartilhando direta e indiretamente minha vida pelos últimos vinte anos. De vizinha, amiga de infância à minha companheira, a quem venho recebendo apoio incondicional em muitos momentos importantes da minha/nossa vida, inclusive a escolha de fazer o doutorado em São Paulo. E recentemente com sua crescente expertise em câncer e sistema imune, temos tido boas longas discussões e um ótimo *crossing over* de áreas, que inclusive me ajudou com *insights* em meu próprio trabalho. Muito grato por todo companheirismo e também pelas dicas sugeridas para a revisão deste trabalho.

À Samantha Teixeira que foi outra pessoa importantíssima para minha formação e na produção deste trabalho. Tenho a impressão de que não sabia fazer um desenho experimental antes de conhecê-la. Habilidades que puder desenvolver durante todos esses anos e um nível de exigência com meus experimentos e minhas análises que nunca tive antes. Sei do esforço que foi

necessário para me trazer para o laboratório, esforço feito sem nem me conhecer. Obrigado pelo voto de confiança e saiba que sou muito grato.

À Miriam Alaniz que facilmente é uma das melhores companheiras de bancada que já tive. Muito do que foi feito aqui, têm suas contribuições diretas. Sou muito grato, e espero que possamos continuar sempre colaborando não só neste projeto, mas em muitos outros.

Ao grupo vascular, em especial às suas PIs Miriam Alaniz e Ayumi Yamaguchi, juntamente com Thaís Girão e João Carlos d Silva. Pessoas com quem aprendi bastante através de discussões excelentes, com detalhes da biologia vascular, funcionamento do endotélio ou das células musculares lisas, e muito mais. Enfim, pessoas que carregam uma bagagem enorme de conhecimento e que tive a sorte de trabalhar junto.

Ao corpo técnico do LGCM, em especial a Mariana Carvalho (“Peppa”), pois desde de o início sempre me deu suporte e conselhos técnicos, principalmente na parte de biologia molecular, seja na construção de vetores, sequenciamento e mais recentemente com PCR em tempo real. És uma amiga que tenho sorte de ter conhecido e recebido apoio. À Mariliza pelo desafio de quantificar alguns genes (quase impossíveis de quantificar), e ter realizado toda a parte de microarray. Obrigado pela sua expertise. Também agradeço à Mariana Bozoklian (“Bozoki”) outra pessoa que recebi bastante suporte, sempre disposta a me ajudar, principalmente com a parte de cultura celular. Muito grato à todas as Maris que passaram pela minha vida nestes 5 anos.

Ainda ao corpo técnico do LGCM, agradeço à Renata Carmona como gerente geral do laboratório, juntamente com Marcelly Rosal, Maria de Lourdes Junqueira, Silvana Campos e Ana Maria Piesco pela ajuda incondicional em partes sensíveis do projeto, como o auxílio na submissão deste projeto e outros para o comitê de ética, na compra de reagentes, transporte de material biológico para universidades do exterior. Grato pelo trabalho excepcional que elas fazem.

À Élida Neri pessoa extremamente competente e que realente faz as coisas acontecerem. Não existem problemas que não sejam solucionados com ela na parte de cultura celular. É uma pessoa que admiro e gosto muito de trabalhar. Muito grato por ter recebido ajuda sempre que precisei.

Aos companheiros da bioinformática que fiz ao longo desses anos. Em especial ao Vinicius Souza (“Vini”) que pude observar todo seu crescimento e transformação em aplicar seu amplo conhecimento de informática para a bioinformática. Sempre disposto a ajudar, seja com alguns códigos no R ou em todo um projeto paralelo que desenvolvemos. E recentemente, Anderson e Ricardo com boas discussões e aplicação de algoritmos de *machine learning* para identificar padrões moleculares em placas ateroscleróticas humanas.

Ao meu caro amigo Silvestre Modestia (“Silver”), o “cara” da modelagem molecular, que sem sua ajuda, não sei se teria conhecimento químico e farmacológico suficiente para a triagem e seleção precisa das moléculas aqui testadas. Um amigo por quem tenho um grande apreço.

Ao grupo de pessoas que recentemente me ajudaram bastante com o *High Content Screening* das moléculas testadas. Sarah Mattioli com toda sua expertise na utilização de sondas para ajudar a quantificar disfunção endotelial. Sua ajuda tem sido indispensável. Aos colegas Caio da Silva e Iuri Valadão com seus conhecimentos para aquisição, quantificação e análise das imagens, que foi de extrema relevância para a obtenção dos resultados aqui apresentados.

Finalmente, gostaria de agradecer a pessoas que me ajudaram indiretamente na construção desse trabalho, seja com suporte, com conselhos, ou por apenas existirem:

Como a família incrível que tenho: meu pai, Francisco das Chagas, minha mãe Antônia Meires, e meus irmãos Paraguacy, Dyeime, Dyeine e Cauã.

Aos amigos que puder fazer durante minha estadia no LGCM, como Ágatha Ribeiro, Silver, Fábio Takeo, Peppa, Miriam, Samantha, Luis Fernando (“Louis”), Sérgio Marinho, Mariana Bozoki, Vera Kim, Thaís Sobelman e Sarah Mattioli. Obrigado pelos cafés, pelas conversas, pelos forrós na USP, por tudo.

À todos que contribuíram neste meu processo de crescimento pessoal e profissional, muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Há duas maneiras de abrir a cabeça de uma pessoa: Ler um bom livro, ou usar um machado. Recomendo o de Assis”

Dilson de Oliveira Nunes

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
ABREVIações	VIII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Biologia vascular e função endotelial	16
1.2 Mecanobiologia vascular – <i>stretch</i> e <i>shear stress</i>	17
1.2.1 <i>Stretch</i>	17
1.2.2 <i>Shear Stress</i>	18
1.3 Disfunção endotelial e aterosclerose	19
1.3.1 <i>Oscillatory shear stress – OSS</i>	20
1.3.2 <i>Inflamação e transmigração de leucócitos</i>	22
1.3.3 <i>Lipídios oxidados</i>	23
1.3.4 <i>Hipóxia</i>	23
1.4 Quantificação global molecular – ômicas – visão holística para entender um sistema complexo	25
1.4.1 <i>Estrutura da cromatina, epigenética e expressão gênica – redes regulatórias</i>	26
1.4.2 <i>scRNA-seq de placas ateroscleróticas e propriedades emergentes</i>	28
1.5 Ensaio de High-content screening (HCS) baseado em imagens	30
1.6 Proposta do trabalho	32
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo principal	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. METODOLOGIA	35
3.1 Cultura Celular	36
3.1.1 <i>Cultivo celular</i>	36

3.1.2 ECs sob os estímulos <i>IL1B</i> , <i>OxPAPC</i> e <i>CoCl₂</i>	36
3.1.3 ECs sob força de cisalhamento ou <i>shear stress</i>	36
3.1.4 ECs sob força de cisalhamento combinado com <i>IL1B</i> , <i>OxPAPC</i> e <i>CoCl₂</i>	37
3.2 Expressão gênica e proteica	38
3.2.1 Extração de RNA	38
3.2.2 PCR em tempo real	38
3.2.3 Extração de proteínas e <i>Western Blotting</i>	39
3.3 Análises de expressão gênica global – Microarray	40
3.3.1 Microarray ensaio	40
3.3.2 Análise do microarray – Controle de qualidade	40
3.3.3 Análise do microarray – Expressão gênica diferencial	41
3.3.4 Análise do microarray – enriquecimento de vias de sinalização intracelular e processos biológicos	41
3.3.5 Rede gênica regulatória TF-DEGs	42
3.4 Análise de dados públicos de RNA-seq de célula única (scRNA-seq) de placas ateroscleróticas presentes em artérias coronárias humanas	42
3.5 Seleção de dados públicos para a criação das redes regulatórias de disfunção endotelial	43
3.6 Análise dos dados públicos de sequenciamento de ATAC-seq, ChIP-seq e RNA-seq	43
3.7 Integração dos dados ômicos e enriquecimento de motifs	44
3.8 Criação de redes regulatórias TF-DEGs, perturbações in silico e priorização de genes candidatos	44
3.9 Seleção de moléculas alvos usando ChEMBL e OpenTarget	46
3.10 Ensaio de citotoxicidade das moléculas selecionadas	46
3.11 High Content Screening para marcadores de função endotelial	47
3.12 Aquisição e análise das imagens	48

3.13 Análises estatísticas	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
Capítulo 1 - A ativação das vias proliferativas no endotélio surge pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular: hipóxia, lipídios oxidados, inflamação e fluxo oscilatório	51
4.1 O efeito dos fatores de risco CV no transcriptômica global das células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC)	52
4.2 Os efeitos dos estímulos combinados na expressão gênica global de HCAEC são diferentes da soma dos efeitos individuais	55
4.3 DEGs e vias canônicas que podem contribuir para os fatores de risco CV associados à disfunção endotelial	58
4.3.1 Óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS).	59
4.3.2 Resposta inflamatória e moléculas de adesão	60
4.3.3 Remodelação de vasos e angiogênese	61
4.3.4 Cascata de coagulação e trombogênese	62
4.4 Rede de disfunção endotelial reguladora da transcrição	65
4.4.1 Os TFs <i>EGR1</i> , <i>KLF4</i> e <i>KLF2</i> são nós críticos modulados pelo OSS	65
4.4.2 Comportamento emergente proliferativo e seu impacto nos estímulos inflamatórios	66
4.5 Validação dos dados de HCAEC in vitro usando RNASeq de célula única de placa aterosclerótica coronariana humana	70
Capítulo 2 - Perturbação sistemática in silico de grandes redes multi-omicas identificou novos genes candidatos para prevenir a disfunção endotelial vascular	77
5.1 Análise de dados públicos de ATAC-seq, CHIP-seq e RNA-seq de células endoteliais da aorta humana (HAEC) submetidas ao OSS, IL-1 β , TNF- α e OxPAPC	78
5.2 TFs enriquecidos em regiões regulatórias comuns aos estímulos IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α e integração com o dado de RNA-seq	80
5.3 In silico KO nas redes TF-DEGs regulatórias identificou 17 possíveis alvos terapêuticos para a disfunção endotelial	82
5.4 High content screening (HCS) baseado em imagens identificou alvos terapêuticos promissores para a disfunção endotelial	87
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
6.1 Abordagem reducionista vs. holística	95

7. Referências

98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de formação de artérias e veias (vasculogênese) de acordo com a força e a intensidade do shear stress.....	16
Figura 2. Efeitos do <i>shear stress</i> laminar (LSS) e oscilatório (OSS) nas ECs...19	
Figura 3. Formação e crescimento de placas ateroscleróticas em regiões de bifurcação onde ocorre a mudança de fluxo de LSS para OSS.....	20
Figura 4. Integração de ATAC-seq, CHIP-seq e RNA-seq para inferir redes gênicas regulatórias.....	27
Figura 5. Indutores e <i>readouts</i> quantificáveis para disfunção endotelial. Imagem modificada.....	32
Figura 6. Sistema utilizado para simular o <i>shear stress</i>	37
Figura 7. Similaridade semântica entre os nós baseado nos termos de processos biológicos do GO utilizando os bancos de dados de sinalização Intact, Signor, PhosphoSitePlus e OmniPath.....	45
Figura 8. Shear stress in vitro no modelo de célula endotelial da artéria coronária humana (HCAEC) e padronização adicional de cada estímulo.....	52
Figura 9. O perfil de expressão gênica revelou a contribuição hierárquica dos fatores de risco CV Hipóxia, OxPAPC, IL-1 β e OSS além da modulação de TFs relevantes para a função endotelial quando todos esses fatores de risco estão combinados.....	55
Figura 10. HCAEC sob a hipóxia química, IL-1 β , OxPAPC e OSS e seus DEGs quando comparados com LSS.....	57
Figura 11. GO termos redundantes enriquecidos para os 620 DEGs dos fatores de risco agrupados vs. LSS.....	63
Figura 12. Rede regulatória TF-DEGs da condição de estímulos combinados...68	
Figura 13. Rede regulatória de TF de cada estímulo.....	69

- Figura 14. Validação dos DEGs identificados pelos fatores de risco CV agrupados em ECs de placa aterosclerótica da artéria coronária humana.....73
- Figura 15. Identificação dos clusters celulares, seus top 10 genes que o definem, seguido da expressão dos DEGs emergentes validados.....75
- Figura 16. Análise integrativa de dados ômicos para inferir uma rede de sinalização de disfunção endotelial.....78
- Figura 17. Sobreposição de regiões de cromatina aberta e enhancers ativos entre os estímulos IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α79
- Figure 18. Motifs enriquecidos nas regiões regulatórias comuns IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α e análise integrada com o dado de RNA-seq.....81
- Figura 19. 101 TF-DEGs rede regulatória reduzida com a presença de moléculas e doenças.....82
- Figura 20. Fluxograma do HCS e viabilidade celular.....88
- Figura 21. Quantificação de marcadores de disfunção endotelial quando modulados por moléculas pequenas.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de primers utilizados e seus <i>amplicons</i>	38
Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para validar as condições testadas.....	39
Tabela 3. Anticorpos utilizados para imunofluorescência.....	48
Tabela 4. Genes alvos selecionados após as perturbações in silico nas redes TF-DEGs.....	86
Tabela Suplementar 1. 620 DEGs identificados a partir da comparação de OSS & Hyp. & IL1B & OxPAPC vs. LSS.....	110
Tabela Suplementar 2. Marcadores scRNA-seq DEGs identificados para cada cluster celular e seus tipos celulares identificados (Excel_file - Tabela Suplementar 2)	
Tabela Suplementar 3. 670 DEGs identificados a partir da comparação de EC2 vs EC1 (Excel_file - Tabela Suplementar 3)	

ABREVIações

µg	Micrograma
ng	Nanograma
µM	Micromolar
ATAC-seq	Do inglês <i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>
ATF3	Do inglês <i>Activating transcription factor 3</i>
CCL2	Do inglês <i>C-C motif chemokine 2</i>
ChIP-seq	Do inglês <i>Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing</i>
CV	Cardiovascular
CVD	Do inglês <i>Cardiovascular diseases</i>
CXCL1	Do inglês <i>C-X-C motif chemokine 1</i>
CXCL8	Do inglês <i>C-X-C motif chemokine 8</i>
CXCR4	Do inglês <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
CXCR7	Do inglês <i>C-X-C chemokine receptor type 7</i>
CXCL12	Do inglês <i>C-X-C motif chemokine 12</i>
DEGs	Do inglês <i>Differentially expressed genes</i>
ECs	Do inglês <i>Endothelial cells</i>
ECM	Do inglês <i>Extracellular matrix</i>
EGLN3	Do inglês <i>Prolyl hydroxylase Egl nine homolog 3</i>
EndoMT	do inglês <i>Endothelial–mesenchymal transition</i>
EMT	do inglês <i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
FGF	Do inglês <i>Fibroblast growth factor</i>
GJA4	Do inglês <i>Gap junction alpha-4 protein</i>
GJA5	Do inglês <i>Gap junction alpha-5 protein</i>
GO	Do inglês <i>Gene ontoloty</i>
H3K27ac	Do inglês <i>histone 3 lysine 27 acetylation</i>
HAEC	Do inglês <i>Human Aorta Endothelial Cell</i>
HCAEC	Do inglês <i>Human Coronary Artery Endothelial Cell</i>

HCS	Do inglês <i>High Content Screening</i>
HIF-1 α	Do inglês <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HRP	Do inglês <i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM1	Do inglês <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IL-1 β	Do inglês <i>Interleukin 1 beta</i>
KEGG	Do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway</i>
KLF2	Do inglês <i>Kruppel-like Factor 2</i>
KLF4	Do inglês <i>Kruppel-like Factor 4</i>
KO	Do inglês <i>Knockouts</i>
LDL	Do inglês <i>Low-density lipoprotein</i>
LSS	Do inglês <i>Laminar Shear Stress</i>
MMP1	Do inglês <i>Matrix metalloproteinase-1</i>
MMP9	Do inglês <i>Matrix metalloproteinase-9</i>
MCP-1	Do inglês <i>monocyte chemoat- tractant protein-1</i>
NOS3	Do inglês <i>Nitric oxide synthase 3</i>
OSS	Do inglês <i>Oscillatory Shear Stress</i>
OxPAPC	Do inglês <i>1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phospholcholine</i>
PDGF	Do inglês <i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>
PECAM1	Do inglês <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PFKFB3	Do inglês <i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3</i>
PHD1-3	Do inglês <i>Prolyl hydroxylase 1-3</i>
PI3K	Do inglês <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PPI	Do inglês <i>Protein-Protein Interaction</i>
ROCK	Do inglês <i>Rho-associated kinase</i>
ROS	Do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RWR	Do inglês <i>Random-walk with restart</i>
SA	Do inglês <i>Stretch Activated</i>
SELE	do inglês <i>E-selectin</i>

SELPLG	Do inglês <i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
scRNA-seq	Do inglês <i>Single-cell RNA-seq</i>
SMCs	Do inglês <i>Smooth muscle cells</i>
STAT5A	Do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 5A</i>
TFs	Do inglês <i>Transcription factors</i>
THBD	Do inglês <i>Thrombomodulin</i>
TNF- α	Do inglês <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
VECAM1	Do inglês <i>vascular cell-adhesion molecule 1</i>
VEGFR2	Do inglês <i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VEGF-A	Do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

RESUMO

Sousa IP. *Fatores de Risco Cardiovascular e a Gênese da Disfunção Endotelial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Os fatores de risco cardiovascular, como hipóxia, dislipidemia, inflamação e fluxo oscilatório influenciam a disfunção endotelial (DE) que é comum as doenças cardiovasculares. No entanto, desconhecemos o mecanismo pelo qual estes fatores afetam redes gênicas em células endoteliais ou como interagem para provocar a DE. Para preencher esta lacuna, avaliamos primeiro o efeito individual ou combinado destes estímulos sobre a expressão gênica global de células endoteliais de artéria coronária humana (HCAEC). Utilizamos hipóxia química (CoCl₂), lipídios oxidados (OxPAPC), inflamação (IL-1 β) e shear stress oscilatório (OSS). Em uma abordagem complementar, integramos as marcações epigenéticas (ATAC-seq e ChIP-seq) e de expressão gênica (RNA-seq) provenientes de dados públicos para gerar redes gênicas regulatórias globais que podem afetar a DE. Realizamos então o desligamento genético in silico para identificar os genes candidatos causais que estariam associados a DE para serem validados experimentalmente. Nossos dados mostram que a soma das respostas aos insultos individuais não recapitula o efeito do estímulo combinado destes fatores. Aproximadamente 44% (271) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) e de vias específicas moduladas foram exclusivas da condição com os estímulos combinados sugerindo o aparecimento de efeito emergente. Nossos achados também indicam uma hierarquia entre os estímulos, considerando-se o impacto sobre o número de DEGs afetados usando-se como referência a condição basal de fluxo laminar. Observamos um aumento progressivo no número de DEGs para a exposição a hipóxia (8), OxPAPC (179), IL-1 β (275), OSS (412) e a combinação de todos os estímulos (620). Estes resultados são consistentes com as alterações encontradas em placa aterosclerótica em coronária humana com dados de single-cell RNA-seq. Validamos 103 dos 620 DEGs que estão associados a processos de DE como proliferação celular, adesão de leucócitos e vias de trombose. Na sequência, identificamos 17 genes candidatos que afetam redes gênicas por meio de deleção gênica in silico e validados em plataforma de High Content Screening (HCS) para verificar o potencial terapêutico destes

alvos para proteger HAECs com relação ao estado oxidativo, proliferativo e inflamatório em resposta a IL-1 β e OxPAPC. Dentre os alvos validados, a inibição do gene EGLN3 mostrou ação antioxidante e anti-inflamatória significativa suprimindo a produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento na intensidade de ICAM1, além de impedir alterações na permeabilidade vascular. Os nossos dados mostram que os fatores de risco cardiovascular exercem efeitos específicos sobre a DE e a combinação de estímulos, como observada em grande número de pacientes, resulta em efeitos emergentes que vão além da soma dos efeitos individuais e que foram validados em amostras de placas ateroscleróticas de coronária. Finalmente, a abordagem in silico identificou 17 alvos que afetam redes gênicas associadas a DE que poderão ser alvos terapêuticos como ilustrado pela inibição do EGLN3. Em conjunto, os dados desta tese fornecem elementos críticos para entendimento da base molecular da disfunção endotelial e potenciais alvos terapêuticos para disfunções cardiovasculares.

Descritores: Endotélio/fisiopatologia; Aterosclerose; Integração de dados ômicos; Rede regulatória; Sequenciamento da cromatina acessível; Sequenciamento de cromatina por imunoprecipitação.

ABSTRACT

Sousa IP. *Cardiovascular Risk Factors and the Genesis of Endothelial Dysfunction* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Cardiovascular risk factors such as hypoxia, dyslipidemia, inflammation and oscillatory flow influence the endothelial dysfunction (ED) that is common in cardiovascular diseases. However, we do not know the mechanism by which these factors affect gene networks in endothelial cells or how they interact to cause ED. To fill this gap, we first evaluated the individual or combined effect of these stimuli on the global gene expression of human coronary artery endothelial cells (HCAEC). We used chemical hypoxia (CoCl₂), oxidized lipids (OxPAPC), inflammation (IL-1 β) and shear oscillatory stress (OSS). In a complementary approach, we integrated epigenetic (ATAC-seq and ChIP-seq) and gene expression (RNA-seq) data to generate global regulatory gene networks that can affect ED. We then performed *in silico* genetic deletion to identify causal candidate genes that would be associated with ED to be experimentally validated. Our data show that the sum of responses to individual insults does not recapitulate the combined stimulus effect of these factors. Approximately 44% (271) of differentially expressed genes (DEGs) and specific modulated pathways were unique to the condition with the combined stimuli suggesting the appearance of an emergent effect. Our findings also indicate a hierarchy between stimuli, considering the impact on the number of affected DEGs, using the baseline condition of laminar flow as a reference. We observed a progressive increase in the number of DEGs for exposure to hypoxia (8), OxPAPC (179), IL-1 β (275), OSS (412) and the combination of all stimuli (620). These results are consistent with the changes found in human coronary atherosclerotic plaque with single-cell RNA-seq data. We validated 103 of the 620 DEGs that are associated with ED processes such as cell proliferation, leukocyte adhesion and thrombosis pathways. Next, we identified 17 candidate genes that affect gene networks through *in silico* gene deletion and validated in a High Content Screening (HCS) platform to verify the therapeutic potential of these targets to protect HAECs with respect to the oxidative, proliferative and inflammatory state in response to IL-1 β and OxPAPC. Among the validated targets, the inhibition of the EGLN3 gene showed significant antioxidant and

anti-inflammatory action, suppressing the production of reactive oxygen species and the increase in the intensity of ICAM1, in addition to preventing changes in vascular permeability. Our data show that cardiovascular risk factors have specific effects on ED and the combination of stimuli, as observed in a large number of patients, results in emergent effects that go beyond the sum of the individual effects and that have been validated in samples of coronary atherosclerotic plaques. Finally, the *in silico* approach identified 17 targets that affect ED-associated gene networks that could be therapeutic targets as illustrated by EGLN3 inhibition. Taken together, the data in this thesis provide critical elements for understanding the molecular basis of endothelial dysfunction and potential therapeutic targets for cardiovascular dysfunction.

Descriptors: Endothelium/physiopathology; Atherosclerosis; Omics data integration; Regulatory network; Accessible chromatin sequencing; Chromatin immunoprecipitation sequencing.

1. Introdução

1.1. Biologia vascular e função endotelial

O sistema vascular fornece a perfusão de sangue por todo o corpo por meio dos vasos sanguíneos, os quais servem como conexão entre os tecidos e órgãos. A manutenção de uma rede vascular intacta, para fornecer oxigênio e nutrientes a todos os tecidos, é fundamental para a sobrevivência do organismo¹.

Os vasos sanguíneos são compostos de células endoteliais (ECs – do inglês *Endothelial Cells*) que revestem sua superfície interna sobre uma membrana basal de proteínas da matriz extracelular (ECM – do inglês *Extracellular Matrix*) composta de, por exemplo, colágeno do tipo IV, laminina e fibronectina². O endotélio é crítico para a integridade vascular em virtude de sua capacidade de controlar propriedades fundamentais como a permeabilidade, a fluidez do sangue e o tônus vasomotor^{1,3}.

As ECs são o primeiro ponto de contato com o sangue. A vasculogênese, processo inicial de formação das veias e artérias, ocorre durante o desenvolvimento embrionário, quando o coração começa a bater. As ECs arteriais são expostas a pressões mais elevadas e à tensão de cisalhamento de fluido (*shear stress*), as quais induzem a liberação de sinais para recrutar células musculares lisas (SMCs – do inglês *Smooth Muscle Cells*) e pericitos que, por sua vez, contribuem com propriedades mecânicas para a formação de uma parede que suporta altas pressões. As veias, em contraste, têm suas paredes muito mais finas, mas com diâmetro maior para acomodar um volume de sangue maior, de modo a minimizar a resistência ao fluxo⁴ (Figura 1).

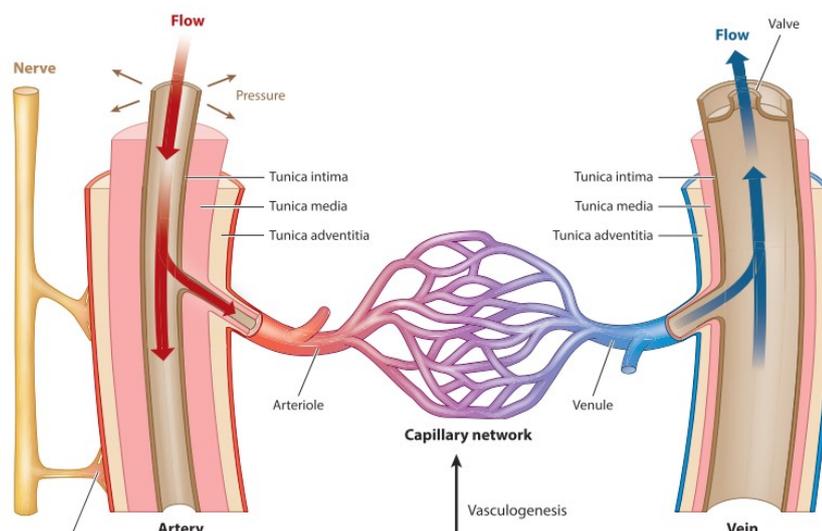


Figura 1. Processo de formação de artérias e veias (vasculogênese) de acordo com a força e a intensidade do *shear stress*. Imagem modificada de Niklason & Dai (2018)⁵.

Além da formação, revestimento e delimitação de vasos sanguíneos, o endotélio apresenta outras funções fisiológicas importantes. Ele desempenha um papel fundamental na síntese e no metabolismo de diversas substâncias e na modulação das respostas imunes, além de estar implicado na progressão de várias doenças vasculares como aterosclerose, aneurismas e hipertensão⁶. É um tecido dinâmico e altamente responsivo, cuja função pode ser alterada por estímulos biomecânicos (fluxo sanguíneo e estiramento) e bioquímicos (citocinas e lipídios oxidados), que levam à modulação da sinalização intracelular, alterando a expressão gênica, a morfologia celular e desencadeiam o remodelamento estrutural do vaso⁷.

1.2 Mecanobiologia vascular – *stretch* e *shear stress*

As células endoteliais estão constantemente expostas a forças hemodinâmicas e são capazes de transformá-las em sinais bioquímicos intracelulares que culminam na resposta final na regulação da homeostase e do remodelamento vascular. As principais forças mecânicas que afetam o endotélio vascular são o *shear stress* e o estiramento cíclico (*stretch*)⁸.

Os mecanismos pelos quais as ECs detectam e processam informações mecânicas dependem da natureza do sinal mecânico e das estruturas subcelulares que o transmitem. Os canais iônicos mecanossensitivos, por exemplo, detectam mudanças na tensão da membrana plasmática^{9,10}, ao passo que as junções aderentes compostas por caderinas são responsáveis por transmitir as tensões intercelulares¹¹. Por outro lado, a composição química e as propriedades mecânicas da ECM são detectadas por complexos multi-moleculares associados às proteínas integrinas, chamadas de adesões focais¹².

1.2.1 *Stretch*

A força da pressão sanguínea sobre as ECs, denominada *stretch*, é devido à natureza pulsátil do sangue bombeado do coração e resultante dos movimentos respiratórios. A deformação circunferencial cíclica é resultante da distensão da pressão pulsátil repetitiva na parede do vaso. O estiramento

mecânico permite a manutenção da homeostase vascular através da proliferação, da angiogênese, da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês *Reactive Oxygen Species*)¹³ e do controle do tônus e da remodelação vascular^{14,15}.

O *stretch* tem sido modelado *in vitro* de modo a simular condições fisiológicas e patológicas no vaso. Os estiramentos de baixa magnitude (de 5-10%) são categorizados como fisiológicos, enquanto que os estiramentos de alta magnitude (acima dos 20%) são considerados patológicos e geralmente propostos para simular o que ocorre durante a hipertensão arterial¹⁶. Estiramentos de diferentes intensidades podem ativar vias de sinalização específicas que determinam as características funcionais, biológicas e fenotípicas das ECs e SMCs¹⁷.

A mecanotransdução do estiramento é detectada por três proteínas mecanorreceptoras que estão distribuídas por toda a EC: o canal ativado por estiramento (SA do inglês *Stretch Activated*), integrinas e PECAM1 (do inglês *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*). O canal SA está localizado na membrana plasmática e já foi demonstrado que ele participa do influxo de cálcio em resposta ao estiramento, o que desencadeia a ativação de PI3K (do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*), mediada por Rho e ROCK (do inglês *Rho-associated kinase*) para a orientação espacial da célula^{18,19}. As integrinas são o segundo tipo conhecido de mecanorreceptores que atuam transmitindo os sinais do estiramento da célula para a ECM^{20,21}, enquanto que a PECAM1 participa da regulação da permeabilidade do endotélio, atuando como junção célula-célula²².

1.2.2 Shear stress

Já em resposta à força de atrito do fluxo sanguíneo ou *shear stress*, as ECs apresentam sofisticadas capacidades de mecanossensibilização com diversos receptores e vias de sinalização intracelular, que são capazes de detectar e responder aos diferentes tipos de *shear stress* e regular a fisiologia e remodelamento do vaso²³⁻²⁵.

Devido à grande variação que existe na arquitetura arterial com bifurcações, pontos de ramificação e regiões curvas, o *shear stress* varia ao longo do vaso. O *shear* laminar (LSS - do inglês *Laminar shear stress*) ocorre predominantemente em regiões retas das artérias, enquanto que o *shear*

turbulento ou oscilatório (OSS - do inglês *Oscillatory shear stress*) ocorre nas regiões de bifurcação e curvatura da árvore arterial^{26,27}. Seus mecanossensores conseguem detectar a magnitude do fluxo, a direção e a amplitude e frequência do fluxo pulsátil. O *shear stress* normal em artérias de grande calibre, como a aorta, está entre 10 e 15 dinas/cm² e é altamente pulsátil; já para as arteríolas e capilares varia de 40 a 50 dinas/cm²; e para as veias são de 1 a 6 dinas/cm² e pulsatilidade mínima^{28,29}.

Mecanicamente, o LSS ativa PECAM-1 que transmite a força mecânica diretamente na superfície para a junção VEGFR2 (do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 2*) em complexo com PECAM-1 e VE-caderina, ativando PI3K. Depois que PI3K é ativada, Akt também é ativada e as ECs expostas a LSS se alinham na direção do fluxo^{30,31}. Já em ECs expostas ao OSS, o alinhamento não ocorre, e há ativação de Rac1, que por sua vez leva ao aumento de ROS e NF- κ B. Assim, ativando os mesmos mecanossensores, o LSS via PI3K/Akt pode levar à ativação de genes antiaterogênicos como *eNOS* (do inglês *Nitric oxide synthase*) (Figura 2A-B). Enquanto o OSS induz a expressão de genes pró-ateroscleróticos, como *ICAM1*, por meio da ativação de NF- κ B^{26,27}.

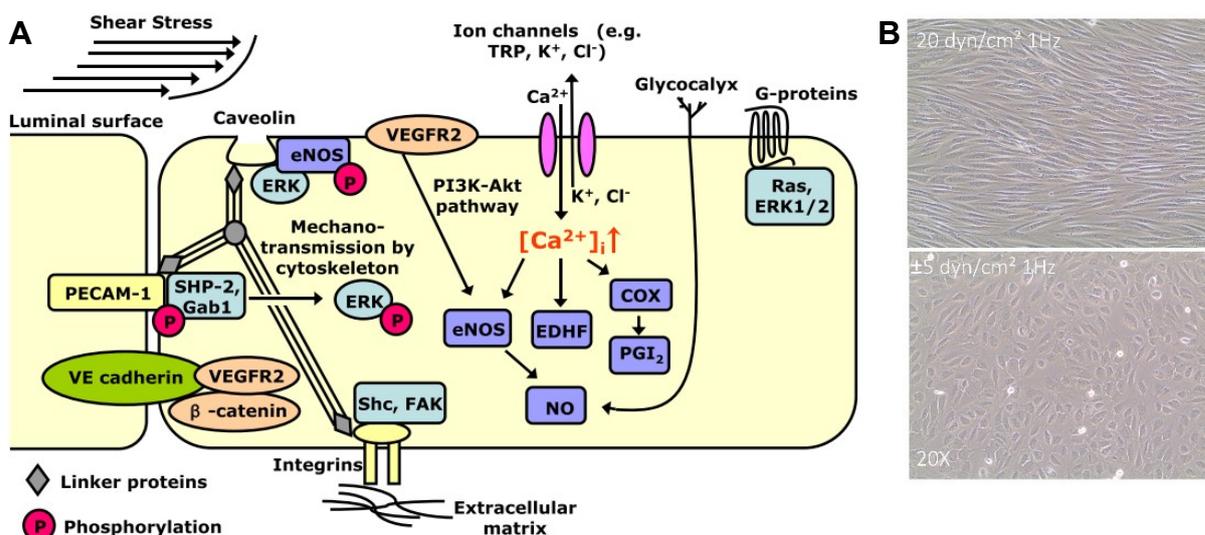


Figura 2. Efeitos do *shear stress* laminar (LSS) e oscilatório (OSS) nas ECs. A. Mecanotransdução da célula endotelial submetida ao LSS³². **B.** ECs de artéria coronária humana submetidas ao LSS e OSS por 48h mostrando um padrão de células alinhadas em LSS quando comparado a ECs sob OSS (Resultados capítulo 1, Figura 8E).

1.3 Disfunção endotelial e aterosclerose

As doenças cardiovasculares (CVDs - do inglês *Cardiovascular diseases*) são responsáveis pelas principais causas de morbimortalidade no mundo ocidental. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), CVDs serão as principais causas de morte em todo o mundo, com previsão de 23,4 milhões mortes até ano de 2030³³. A aterosclerose é a principal CVD com alteração anatomopatológica, caracterizada por um processo inflamatório e formação de placas fibrosas, acometendo principalmente as camadas íntima e média das artérias. Como complicação, ela leva à isquemia do coração e ao infarto agudo do miocárdio^{34,35}.

A exposição crônica a vários fatores de risco cardiovasculares como dislipidemias, hipertensão, uso de tabaco, sedentarismo e diabetes têm um impacto direto no comprometimento da função endotelial, o que pode levar ao desenvolvimento da aterosclerose. As perturbações no fluxo sanguíneo presentes nos ramos arteriais irregulares da parede do vaso são importantes fatores de iniciação da disfunção endotelial, precedendo a aterogênese (formação de placas ateroscleróticas)^{27,36}. Normalmente, as ECs presentes nestes ramos irregulares mantêm um estado inflamatório crônico^{27,36}. Além disso, a exposição aos lipídios oxidados e o *feedback* positivo constante de citocinas inflamatórias são essenciais para o crescimento da placa aterosclerótica nessas regiões³⁷ (Figura 3).

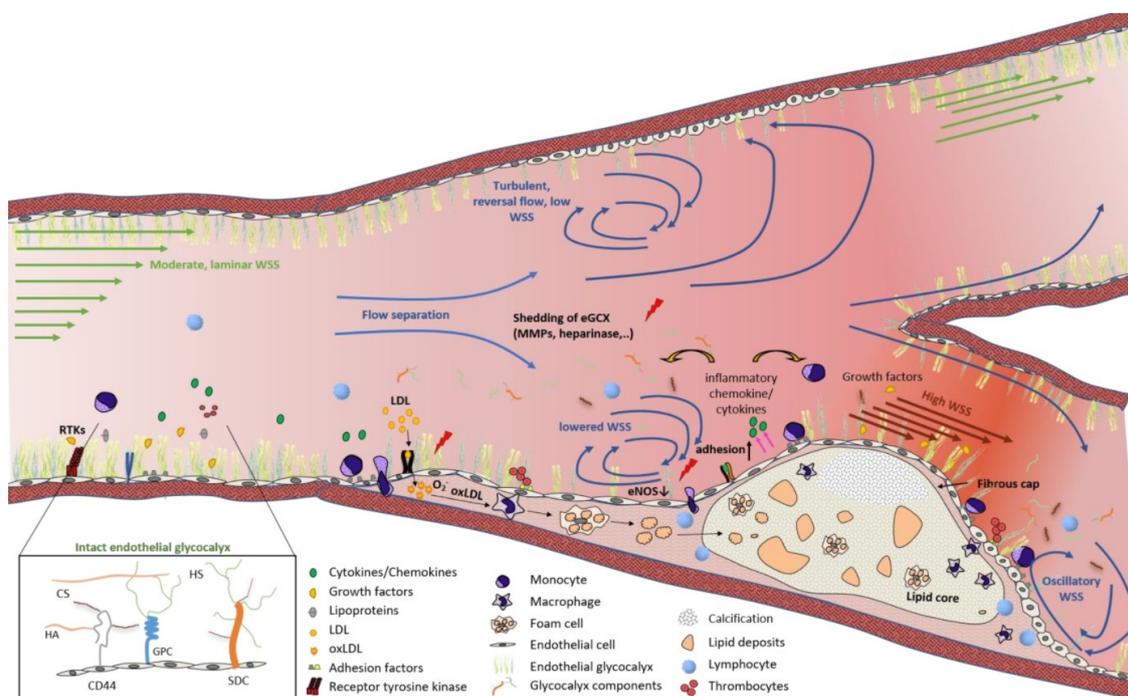


Figura 3. Formação e crescimento de placas ateroscleróticas em regiões de bifurcação onde ocorre a mudança de fluxo de LSS para OSS³⁸

1.3.1 Oscillatory shear stress - OSS

O OSS é caracterizado por um fluxo sanguíneo bidirecional que exerce um fenótipo pró-inflamatório nas ECs, através da mecanoativação de fatores de transcrição (TFs - do inglês *Transcription factors*) que impulsionam a inflamação e modificam estruturas e funções essenciais das ECs. Além disso, OSS suprime a expressão gênica de dois TFs essenciais para a homeostase vascular, KLF2 (do inglês *Kruppel-like Factor 2*) e KLF4 (do inglês *Kruppel-like Factor 4*). Foi demonstrado que estes TFs regulam diretamente genes como NOS3 (do inglês *nitric oxide synthase 3*), responsável pela produção de óxido nítrico (NO), e o gene antitrombogênico *THBD* (do inglês *Thrombomodulin*). A diminuição da expressão desses genes deixa o endotélio com a vasodilatação prejudicada e propenso a formação de trombos. Ainda, estes TF estão associados a uma atividade anti-inflamatória suprimindo a expressão de moléculas de adesão como *ICAM1* (do inglês *intercellular adhesion molecule 1*), *VCAM1* (do inglês *vascular cell-adhesion molecule 1*) e MCP-1 (do inglês *monocyte chemoat- tractant protein-1*), codificada pelo gene *CCL2* (do inglês *C-C motif chemokine 2*). Diversos estudos mostram que o *KLF2*, *KLF4*, *NOS3* e *THBD* estão regulados negativamente em regiões pro-ateroscleróticas³⁹⁻⁴¹.

Outro impacto do OSS ocorre nas junções endoteliais. A conexina 37 (Cx37), codificada pelo gene *GJA4* (do inglês *Gap junction alpha-4 protein*), é uma proteína de junções comunicantes altamente expressa no endotélio saudável, mas não em regiões de aterosclerose⁴². Já foi relatado aumento da expressão de *GJA4* e *KLF2* em ECs expostas ao LSS⁴², e já foi observado que o *KLF2*, quando silenciado, reduz significativamente a expressão de *GJA4*, sugerindo que este está envolvido nos efeitos protetores do LSS, já que o aumento da sua expressão, via ativação de *KLF2*, proporciona aumento da comunicação intercelular das junções comunicantes e sincronização das ECs⁴³. A combinação de moléculas de adesão aumentadas em ECs com a diminuição das junções endoteliais, em locais de OSS, levam à adesão intensiva de

monócitos, acúmulo de lipídios na parede vascular e progressão da aterosclerose^{43,44}.

Em geral, nas regiões onde o fluxo é oscilatório, o endotélio tem um fenótipo pró-inflamatório associado à baixa produção de NO, redução da função de barreira endotelial e aumento das propriedades pró-adesivas, pró-coagulantes e proliferativas das ECs^{26,36,45}. Em contraste, as ECs presentes em regiões ateroresistentes (resistentes à formação de placas ateroscleróticas), expostas ao LSS, mantêm o fenótipo quiescente em consequência dos sinais antioxidantes desse tipo de fluxo^{39,40}. De fato, vários padrões de fluxo contribuem para a heterogeneidade fenotípica e funcional do endotélio arterial, cuja resposta aos estímulos pró-aterogênicos é diferenciada. Isso pode explicar o desenvolvimento preferencial da disfunção endotelial em locais arteriais com fluxo perturbado^{26,36}.

1.3.2 Inflamação e transmigração de leucócitos

A inflamação vascular desempenha um papel importante na iniciação e progressão da aterosclerose e outras formas de CVDs⁴⁶. ECs em resposta ao OSS ou a lesões vasculares se tornam ativadas e iniciam uma cascata de reações pro-inflamatórias. Mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β (do inglês *Interleukin 1 beta*) e TNF- α (do inglês *Tumour Necrosis Factor alpha*), estimulam as ECs a secretar outras citocinas pró-inflamatórias, principalmente a partir da regulação de um *master* TF pró-inflamatório, o NF- κ B (do inglês *factor nuclear kappa B*). NF- κ B estimula a expressão de interleucinas (IL-6, IL-8), moléculas de adesão, como MCP-1, ICAM1, VCAM1, P-selectina (SELPLG do inglês *P-selectin glycoprotein ligand 1*), E-selectina (SELE do inglês *E-selectin*), além de fatores de crescimento e outros fatores inflamatórios^{47,48}.

Como já mencionado, essas substâncias secretadas acima quando o endotélio está inflamado atraem monócitos e leucócitos, que se fixam no endotélio ativado, penetram na parede arterial e iniciam a inflamação⁴⁹. Em mais detalhes, a cascata de adesão dessas células do sistema imune é geralmente dividida em quatro etapas sequenciais diferentes: “amarração”, rolamento lento, parada firme e transmigração⁵⁰. Durante a “amarração”, os leucócitos interagem com a P- ou E-selectina na superfície da EC. Pouco depois, selectinas adicionais e outras moléculas adesivas são envolvidas, levando a um rolamento lento ou sustentado. Na terceira fase, as integrinas

leucocitárias são ativadas, levando a uma parada celular firme na superfície do endotélio⁵¹. A adesão dos leucócitos ao endotélio representa o evento inicial na fase inflamatória da aterogênese.

A inflamação endotelial tem sido intensamente investigada já que ela desempenha um papel crucial nas CVDs. Agentes terapêuticos que inibem ou modulam parte da resposta destes *master* TFs, como NF-κB, ou aqueles que ativam KLF2/KLF4, têm grande potencial no tratamento da disfunção endotelial e CVDs. Esta é uma área relativamente ativa de investigação onde a descoberta de novos TFs que regulam a inflamação endotelial, ou a reposição de medicamentos visando com alvo estes TFs associados à inflamação é necessária.

1.3.3 Lipídios oxidados

Lipídios como LDL (do inglês *Low-density lipoprotein*) e alguns de seus componentes minimamente modificados como o PAPC (do inglês *1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phospholcholine*)⁵², quando oxidados nas paredes dos vasos, promovem disfunção endotelial e contribuem para a formação, progressão e desestabilização da placa aterosclerótica⁵²⁻⁵⁴. Um dos mecanismos patológicos dos lipídios oxidados é a indução de estresse oxidativo e inflamação induzindo levando ao aumento de expressão de genes como o TF ATF3 (do inglês *Activating transcription factor 3*), SELE e IL-8 (CXCL8 do inglês *C-X-C motif chemokine 8*), além da produção de moléculas de adesão como ICAM1 e VCAM1 facilitando a adesão e transmigração de leucócitos na parede arterial^{52,55,56}. Outra contribuição importante deste estímulo é a rápida absorção por macrófagos que, subsequentemente, se tornam células espumosas (células de Foam) que entram em processo de apoptose e se acumulam na íntima⁵⁷.

OxLDL e OxPAPC também participam da estimulação de migração e proliferação das SMCs na íntima, acompanhado por um aumento da secreção de fatores de crescimento, como PDGF (do inglês *Platelet-derived growth factor subunit B*) e FGF (do inglês *Fibroblast growth factor 8*) por ECs e macrófagos^{58,59}. Além disso, há aumento da produção de colágeno por SMCs e aumento da secreção das metaloproteinases 1 e 9 (MPP-1, MPP-9 do inglês *Matrix metalloproteinase-1/9*)^{60,61} promovendo a degradação de ECM, o que pode tornar placas ateroscleróticas instáveis. As evidências acima mostram as

ações pró-inflamatórias, pró-oxidantes, proliferativas e regulatórias da organização da ECM que os lipídios oxidados exercem no endotélio.

1.3.4 Hipóxia

As células da parede do vaso sanguíneo dependem do suprimento de oxigênio do sangue luminal. Na aterosclerose em estágio avançado, a taxa de consumo de oxigênio aumenta na parede do vaso, levando à ocorrência de hipóxia do tecido na lesão da placa^{62,63}. Outra situação de hipóxia no vaso em decorrência da aterosclerose é oclusão de vasos ou eventos trombóticos, levando à doença cardíaca isquêmica, ou também conhecida como infarto do miocárdio⁶⁴, enquanto a trombose ou êmbolos são as causas mais comuns de lesão cerebral isquêmica, também conhecida como acidente vascular cerebral⁶⁵. A isquemia resulta da restrição do suprimento de sangue aos tecidos, limitando a disponibilidade de oxigênio e glicose. Em particular, a lesão de isquemia-reperfusão aumenta a produção de ROS, interrompe a biodisponibilidade de NO e causa desequilíbrios de Ca^{2+} , levando à disfunção endotelial e apoptose de ECs⁶⁶.

As ECs quando expostas à hipóxia, ativam vias glicolíticas por meio de PFKFB3 (do inglês *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3*), o que promove a inflamação vascular^{67,68}, além de ativar vias de sinalização de HIF-1 α (do inglês *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), o que leva uma mudança considerável do metabolismo das ECs em placas ateroscleróticas⁶⁹. Já foi demonstrado que a deficiência de HIF-1 α em ECs reduz o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos deficientes em ApoE, via redução do recrutamento de macrófagos através do receptor CXCL1 (do inglês *C-X-C motif chemokine 1*)⁷⁰. Tem sido mostrado também que a inibição da glicólise pode melhorar a função da barreira endotelial^{68,71}.

No entanto, os papéis da sinalização do HIF-1 α na disfunção endotelial e no desenvolvimento de CVDs parecem ser mais complicados do que o esperado. A redução e estabilização sistêmica do HIF-1 α pode ser um pré-requisito para a lesão de isquemia/reperfusão, e fator de risco cardiovascular em diabéticos⁷². A estabilização de HIF-1 α está associada a atividade enzimática de PHD1-3 (do inglês *Prolyl hydroxylase 1-3*), que na presença de oxigênio atua na hidroxilação de resíduos de prolina em HIF-1 α , marcando a para degradação proteossomal^{73,74}. De fato, foi observado que a estabilização

de HIF-1 α , em camundongos diabéticos KO para PHD2, mostraram uma melhor revascularização pós isquemia⁷⁵. Além disso, a estabilização de HIF-1 α sistêmica, *in vivo*, melhorou o metabolismo da glicose sistêmica em modelos de camundongos ateroscleróticos com diabetes deficientes para PHD1 e PHD2^{76,77}. Embora os mecanismos subjacentes ainda precisam ser estabelecidos, o aumento da utilização da glicose celular nesses modelos pode implicar em uma ligação entre a sinalização de hipóxia e as complicações cardiovasculares.

Coletivamente, os papéis da sinalização de HIF-1 α devem ser examinados em mais detalhes, já que uma série de questões permanecem sem solução quanto aos papéis da inflamação ou alteração metabólica nos distúrbios cardiovasculares. Assim, estudos adicionais sobre a sinalização da hipóxia nos ajudarão a compreender seus processos patológicos com mais detalhes.

1.4 Quantificação global molecular – ômicas – visão holística para entender um sistema complexo

A adição de “ômicas” a um termo molecular implica em uma avaliação abrangente ou global de um conjunto de moléculas⁷⁸. Além da ômica mais comumente utilizada, a expressão gênica ou transcriptoma, outras tecnologias também estão sendo aplicadas para quantificar outros níveis moleculares como mutações (exomas e sequenciamento total do genoma) ou modificações químicas no DNA (epigenômica), RNAs não codificantes (miRNoma), proteômica, fosfoproteômica e metabolômica^{78,79}.

A integração destas várias camadas ômicas pode ser usada para identificar mecanismos causais de doenças. Especificamente, a utilização de diferentes modelos de rede, como interação proteína-proteína (PPI – do inglês *Protein-Protein Interaction*), redes regulatórias ou de co-expressão, provou ser um recurso valioso para priorizar e identificar genes e vias de sinalização envolvidos com doenças⁸⁰⁻⁸².

O desafio agora se encontra em obter um entendimento holístico do fluxo de informações moleculares e do sistema molecular de forma interativa, que só pode ser alcançado pelo estudo de múltiplas camadas de dados ômicos simultaneamente. A incorporação de abordagens multi-ômicas em redes

multidimensionais e análises de biologia de sistemas poderá preencher lacunas em nosso conhecimento atual dos mecanismos moleculares, interações gene-ambiente e efeitos longitudinais durante o desenvolvimento de doenças crônicas^{78,83,84}.

Até recentemente, muitos pesquisadores estudavam mecanismos moleculares específicos, identificando genes, proteínas e vias únicas, e essas abordagens reducionistas geraram muitos *insights* sobre como as células funcionam dentro de um sistema; no entanto, com grandes quantidades de dados gerados pelas novas plataformas de sequenciamento em diversas camadas de informação, podemos ter uma visão global do sistema, de sua complexidade, de como os genes/proteínas interagem nas vias, e como as vias interagem entre si, mudando de um sistema fisiológico para um patológico. Essa abordagem pode ser usada para compreendermos melhor a função endotelial e seu papel homeostase e estabilidade vascular, e como e quais fatores de risco CV desencadeiam a disfunção endotelial a nível global⁸⁵.

1.4.1 Estrutura da cromatina, epigenética e expressão gênica – redes regulatórias

Qualquer perturbação ambiental, seja ela farmacológica, por um fator de risco cardiovascular ou a mudança de temperatura, desencadeia modificações na estrutura nuclear da cromatina, modulando a expressão gênica e, conseqüentemente, alterando a tradução e as modificações pós-translacionais de proteínas, levando a modificação fenotípica observada^{86,87}.

O DNA que é fortemente compactado na cromatina em sua conformação é inacessível (heterocromatina) aos complexos de iniciação da transcrição⁸⁸ (Figura 4). No entanto, as caudas N-terminais das histonas projetam-se das partículas do nucleossomo e são extensivamente modificadas, sendo as modificações mais conhecidas acetilação, metilação e fosforilação⁸⁹⁻⁹¹. Essas modificações servem como sinais, que modificam a cromatina em conformações repressivas ou permissivas⁸⁹⁻⁹¹. A acetilação e a desacetilação das histonas influenciam a acessibilidade do DNA aos fatores que regulam a replicação, o reparo e a transcrição. Por exemplo, a acetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27ac - do inglês *histone 3 lysine 27 acetylation*) permite a acessibilidade da cromatina para a iniciação da transcrição gênica daquela região^{92,93}.

Essas modificações químicas que ocorrem nas histonas ou no DNA, de forma simplista, são denominadas como regulação epigenética. A identificação e quantificação dessas modificações que ocorrem na cromatina podem ser realizadas com algumas técnicas: ATAC-seq (do inglês *Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*)⁹⁴, por exemplo, consiste em sequenciar as regiões de cromatina acessível em todo o genoma (Figura 4). Já o ChIP-seq (do inglês *Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*)⁹⁵ consiste no sequenciamento de regiões do genoma ligadas à proteínas, como as histonas, a partir da imunoprecipitação dessas proteínas tem-se o sequenciamento das moléculas de DNA que estavam acopladas a elas (Figura 4).

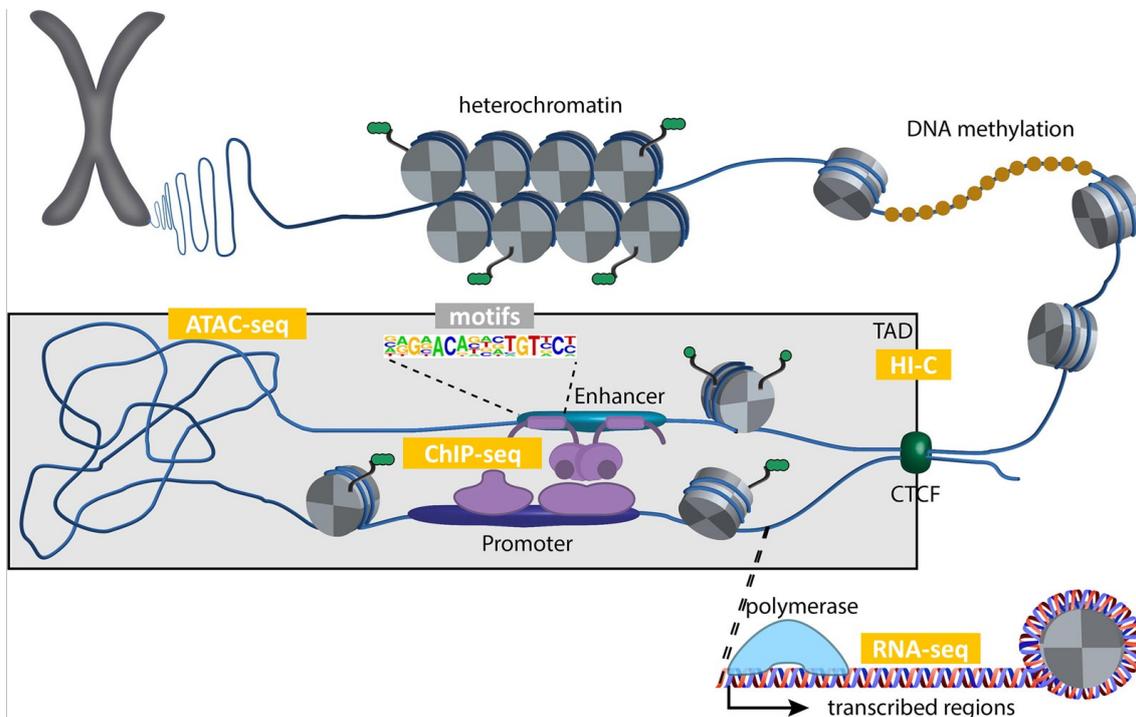


Figura 4. Integração de ATAC-seq, ChIP-seq e RNA-seq para inferir redes gênicas regulatórias. Figura modificada da revisão de Höllbacher *et al.* (2020)⁹⁶.

Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado que genes presentes em regiões com alta atividade regulatória, como as regiões de *enhancers* ativos (H3K27ac), são nós centrais em redes biológicas, os quais são mais propensos a estar associados a doenças humanas^{97,98}. *Enhancers* são elementos cis-regulatórios distais que orquestram a regulação da expressão de genes interagindo com as regiões promotoras dos mesmos⁹⁹. Esses elementos são

compostos de pequenas regiões chamadas *motifs* (de 6 a 20 pares de base) onde acontece a ligação dos fatores de transcrição¹⁰⁰.

Essa atividade regulatória está diretamente associada à estrutura do DNA, e a quão acessível está à sua maquinaria de transcrição basal. Estados de cromatina local e modificações epigenéticas podem limitar ou promover a ligação de TFs em *loci* específicos¹⁰⁰. É importante destacar que alguns TFs podem ser considerados como reguladores centrais da expressão gênica impactando diretamente na função celular, como descrito a pouco com KLF2¹⁰¹, KLF4⁴¹, NF-κB¹⁰² e HIF-1α^{103,104}, dentre muitos outros. Além disso, técnicas para avaliar regiões acessíveis da cromatina (ATAC-seq) e algumas modificações de histonas, como as de *enhancer* (ChIP-seq), têm sido usadas para prever a ligação de TFs específicos associados à expressão gênica^{105,106}.

Essa integração de diferentes camadas ômicas tem permitido a identificação com mais robustez de *motifs* e seus respectivos TFs que, em última instância, podem desencadear modificações globais na regulação gênica levando ao desenvolvimento de um determinado fenótipo¹⁰⁰. Integrando essa informação epigenética a dados de expressão gênica, como RNA-seq, podemos definir melhor a arquitetura transcricional por trás dos fenótipos aqui investigados, como a disfunção endotelial, com a inferência de redes gênicas regulatórias, mapeando TFs aos genes diferencialmente expressos (DEGs do inglês *Differentially expressed gene*) (Figura 4).

As aplicações para as redes gênicas regulatórias são inúmeras. Em especial, destaca-se a capacidade de criar perturbações *in silico* nessas redes e inferir mudanças desejadas no fenótipo celular, ou a possibilidade da simulação *in silico* de KOs (do inglês *Knockouts*), a fim de identificar potenciais genes, proteínas ou vias de sinalização candidatas a terapias^{107,108}. Foi recentemente demonstrado, através de perturbações sistemáticas *in silico* em redes gênicas regulatórias, a identificação de um potencial alvo terapêutico, o Tie2 (do inglês *Angiopoietin-1 receptor*), para cirrose hepática. A modulação experimental farmacológica deste alvo, em modelo de cirrose hepática em rato, induziu mudanças desejadas na expressão gênica de TFs chave envolvidos na fibrose hepática¹⁰⁹.

Com a ajuda de ferramentas computacionais e a grande disponibilidade de dados públicos para ECs¹¹⁰⁻¹¹², a integração destes dados pode ser usada para modelar computacionalmente processos e vias biológicas complexas, de forma holística, a fim de explorar novos mecanismos envolvidos na disfunção endotelial e aterosclerose, além de aumentarmos as chances de identificar potenciais novos alvos terapêuticos para doenças cardiovasculares.

1.4.2 scRNA-seq de placas ateroscleróticas e propriedades emergentes

Recentemente, o sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq do inglês *Single-cell RNA-sequencing*) permitiu que a expressão gênica fosse estudada em uma resolução sem precedentes. A promessa dessa tecnologia está atraindo muitos usuários para análise de uma única célula em diferentes tipos de tecido¹¹³, inclusive aterosclerose.

scRNA-seq tem sido usado para entender a complexidade e avaliar a natureza heterogênea da composição celular presente em placas ateroscleróticas^{114,115}. Esse método revelou diferentes perfis endoteliais que são contexto-dependentes. Um estudo recente, usando scRNA-seq e scATAC-seq de regiões da artéria carótida de camundongos submetidos à ligadura parcial, revelou que a indução do fluxo oscilatório teve grande impacto nas ECs, sendo responsável por modular regiões de cromatina aberta e expressão gênica dessas células, onde ECs foram reprogramadas de um fenótipo ateroprotetor para um fenótipo aterogênico¹¹⁶. Essas tecnologias avançadas têm permitido que identifiquemos novos tipos celulares residentes na placa, novos reguladores de respostas biológicas induzidas pelo fluxo sanguíneo e outros fatores de risco cardiovascular, além de permitir identificar perfis de ECs em diferentes estados de disfunção^{117,118}.

Foi publicado recentemente um atlas de ECs de camundongos usando scRNA-seq. Foram analisadas mais de 32 mil células endoteliais, coletadas do cérebro, testículo, fígado, baço, intestino delgado, cólon, músculo esquelético e coração, e foi identificado 78 *subclusters* de ECs. Interessantemente, o que mais contribuiu para a heterogeneidade das ECs foi o tecido de onde foram coletadas, e não os diferentes leitos vasculares de onde vieram, como artérias, capilares, veias e vasos linfáticos. Ou seja, a heterogeneidade da EC é dependente do tecido em que residem¹¹⁹. Nesse sentido, a disfunção endotelial

pode contribuir de forma específica de acordo com o tecido que reside. Por exemplo, ECs presentes na barreira hematoencefálica possuem junções celulares altamente conectadas funcionando como barreiras seletivas com baixa permeabilidade. A disfunção endotelial na barreira hematoencefálica pode levar a doenças como Alzheimer¹²⁰ e esclerose múltipla¹²¹.

O entendimento mais detalhado da heterogeneidade molecular das ECs, inclusive em tecidos doentes como aterosclerose, nos possibilita delinear experimentos mais informativos com relação a disfunção endotelial. Isso se faz mais importante, haja vista que o principal modelo utilizado para o estudo da função e disfunção endotelial é a HUVEC (do inglês *Human umbilical vein endothelial cell*)¹¹⁰. Além disso, a forma em que os estímulos nocivos ao endotélio são investigados, de forma isolada principalmente, impede de identificar propriedades emergentes a partir da interação entre diferentes estímulos atuando na disfunção do endotélio.

No presente estudo, a fim de estudar disfunção endotelial e seu desfecho na aterosclerose, utilizamos ECs de artérias, especificamente do leito arterial coronário. Considerando que os fatores de risco CV geralmente coexistem durante o processo de aterosclerose, nosso interesse reside em identificar e entender o papel de propriedades emergentes na disfunção endotelial e na aterosclerose quando fatores-chave são combinados, como OSS, inflamação, lipídios oxidados e hipóxia. Dessa forma, desenhos experimentais *in vitro* combinados com scRNA-seq pode nos ajudar a dissecar novos mecanismos moleculares, principalmente relacionado às propriedades emergentes que estão presentes em um contexto complexo como a disfunção endotelial na aterosclerose *in vivo*.

1.5 Ensaio de *High-content screening* (HCS) baseado em imagens

Nos subtópicos anteriores (1.3 e 1.4) discutimos a necessidade de entender a complexidade da disfunção endotelial através de uma perspectiva mais holística, na qual propriedades emergentes podem ser descobertas quando fatores de risco cardiovascular são combinados. Essa abordagem pode nos dar uma visão global de genes e vias de sinalização que podem estar sendo modulados somente na condição combinada. Todavia, ainda assim é difícil de identificar e apontar alvos causais. Uma das propostas de solução

para este problema é colocar outras camadas ômicas para entendermos melhor, por exemplo, o sistema regulatório da expressão gênica dentro de uma célula. Com essas camadas extras de informação, diversos algoritmos podem nos ajudar a simular computacionalmente condições celulares complexas que acontecem *in vitro*, e ir além, com perturbações *in silico* que podemos dar pesos e prever matematicamente possíveis alvos causais^{107,122}.

Uma forma interessante, rápida e relativamente barata para testar possíveis alvos terapêuticos identificados com essas abordagens computacionais são os *high-content screenings* (HCS) baseados na análise quantitativa de imagens. Essa triagem que combina microscopia de fluorescência automatizada com análise de imagem quantitativa permite a aquisição de dados multiparamétricos imparciais a nível de uma única célula^{123,124}. Através de perturbações genéticas ou químicas (fármacos) podemos abordar diversas questões biológicas e identificar uma infinidade de fenótipos quantitativos em diversos modelos¹²³.

Para este tipo de abordagem alguns fatores precisam ser levados em consideração, dentre os mais importantes temos: i) utilizar o modelo que melhor simula a condição/doença desejada; ii) selecionar o(s) estímulo(s) para produzir uma resposta associada à condição/doença; iii) escolher *readouts* quantificáveis que mais refletem a condição/doença investigada¹²⁵. Aplicando este modelo para quantificar *readouts* relevantes para à (dis)função endotelial, temos: capacidade reduzida da vasodilatação (NO)¹²⁶, aumento de estresse oxidativo (ROS)¹²⁷, inflamação e adesão de leucócitos (ICAM1, VCAM1, eSelectin)¹²⁸, hiperpermeabilidade (VE-caderina)¹²⁹ e apoptose (Caspase)¹³⁰. E, para induzir tais fenótipos, temos diversos indutores de disfunção (Figura 5), como lipídios oxidados, citocinas inflamatórias, fluxo turbulento ou oscilatório, e diversas drogas e fatores de risco.

Assim, a utilização dos indutores descritos acima combinados de forma estratégica à quantificação de marcadores relevantes para de disfunção endotelial (Figura 5) a partir de imunofluorescência e a técnicas computacionais melhoradas de análise de imagem de microscopia em grande escala, podem nos ajudar a identificar novos alvos terapêuticos para disfunção endotelial ou mesmo reposicionar moléculas de alvos pré-existentes.

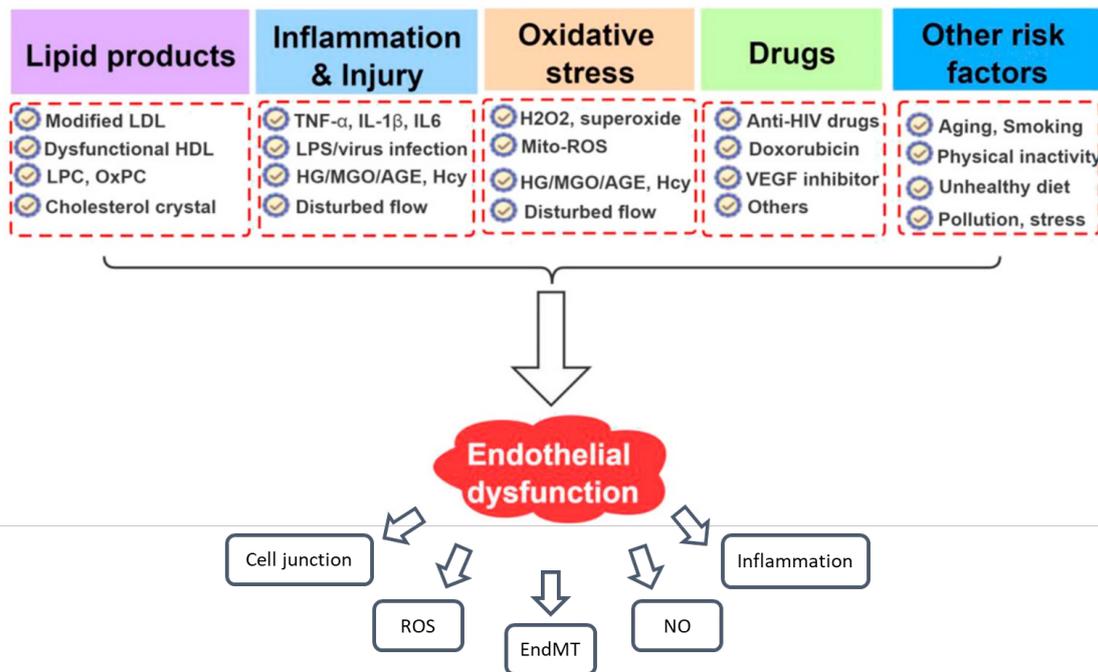


Figura 5. Indutores e *readouts* quantificáveis para disfunção endotelial Figura modificada da revisão de Xu *et al.* (2021)¹³¹.

1.6 Proposta do trabalho

Nossa hipótese é que a somatória individual dos estímulos indutores de disfunção endotelial não é capaz de reproduzir o fenótipo de quando estes estímulos estão combinados, como é visto na maior parte dos pacientes com doenças cardiovasculares. Por isso, nossa proposta foi simular um ambiente complexo *in vitro*, onde fatores de risco cardiovascular clássicos coexistem no desenvolvimento da aterosclerose, e identificar processos biológicos emergentes que não aparecem quando estes estímulos são estudados individualmente.

Em seguida, utilizamos uma abordagem integrada a partir de dados públicos de marcações epigenéticas provenientes de ATAC-seq e ChIP-seq, e de expressão gênica oriundos de RNA-seq para inferir redes gênicas regulatórias em células endoteliais e para identificar genes causais envolvidos com disfunção endotelial. Esta última abordagem se baseou em simulações de deleção gênica (KO) *in silico* nas redes regulatórias para identificar genes candidatos para serem validados experimentalmente utilizando moléculas pequenas e uma plataforma de HCS.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Principal

Identificar genes e redes gênicas associadas a disfunção endotelial em resposta a exposição individual ou combinada de substitutivos de fatores de risco cardiovascular clássicos, como hipóxia, lipídios oxidados, agentes inflamatórios e *shear stress* oscilatório

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a contribuição individual e combinada dos fatores de risco hipóxia química (CoCl₂), lipídios oxidados (OxPAPC), inflamação (IL-1 β) e *shear stress* oscilatório e determinar o papel dos termos emergentes para a gênese da disfunção endotelial
- Identificar novos alvos moleculares a partir da perturbação *in silico* de redes gênicas regulatórias geradas a partir da integração de dados públicos de ATAC-seq, ChIP-seq e RNA-seq de ECs submetidas aos estímulos acima
- Validar os alvos identificados utilizando moléculas pequenas e uma plataforma de HCS para quantificação de fenótipos e marcadores de disfunção endotelial

3. Metodologia

3.1 Cultura celular

3.1.1 *Cultivo celular*

As células endoteliais de artéria coronária humana (HCAEC do inglês *Human Coronary Artery Endothelial Cell*) e da artéria aorta (HAEC do inglês *Human Aorta Endothelial Cell*) foram adquiridas da empresa LONZA (Lonza, Walkersville, MA, USA). As células foram cultivadas em meio, ambos da empresa LONZA, EGM-2MV (HCAEC) e EGM-2 (HAEC) e mantidas em estufa (37°C, 5% CO₂). Todos os experimentos foram realizados entre as passagens 4 e 7.

3.1.2 *ECs sob os estímulos IL1B, OxPAPC e CoCl₂*

Os estímulos foram padronizados, inicialmente, em HCAEC cultivadas na condição estática (ou seja, sem o estímulo mecânico). Assim que as células atingiram 100% de confluência, foram tratadas individualmente com interleucina 1 β (IL-1 β , 10 ng/mL) (Thermo Fisher Scientific), OxPAPC (1-*palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine*, 50 μ g/mL) (SINAPSE) e cloreto de cobalto (CoCl₂, 150 μ M) (SigmaAldrich) e cultivadas por 48h. Para confirmar o efeito de cada estímulo, utilizamos a expressão proteica do marcador de inflamação VCAM1 para o estímulo com IL-1 β ; a expressão gênica de *CD36* e *ATF3* para o tratamento com OxPAPC; e a expressão proteica de HIF1- α para confirmar a hipóxia química induzida por CoCl₂. Os primers e os anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 1 e 2, respectivamente.

3.1.3 *ECs sob força de cisalhamento ou shear stress*

Para os experimentos com *shear stress*, utilizamos o equipamento IBIDI (IBIDI), Figura 6A. Este equipamento nos permitiu simular, controlar e quantificar a força de cisalhamento aplicado às ECs durante todo o experimento, utilizando o *PumpControl* software, na aba *Flow Parameters* (Figura 6B). As ECs foram cultivadas em μ -Slides I Luer 0.4 (IBIDI) revestidos com gelatina a 0,1% (Figura 6C - imagem ilustrativa). As HCAECs foram plaqueadas com 100% de confluência (aproximadamente 1×10^5 células/cm²) nos slides e incubadas *overnight* em condições de cultura celular estática padrão. As ECs foram expostas a dois tipos de forças de cisalhamento, um atero-protetor unidirecional com 20 dinas/cm² de laminar *shear stress* (LSS) e um aterogênico, bidirecional a 1 Hz (0 ~ \pm 5 dinas/cm²) oscilatório *shear stress*

(OSS) por 48 horas. Para confirmar o efeito do *shear stress* para diferentes forças hemodinâmicas analisamos o alinhamento das células em direção ao fluxo para o LSS (Figura 2B e 8E) juntamente com a expressão gênica de marcadores como *KLF2* e *KLF4* no microarray de expressão (Figura 8C).

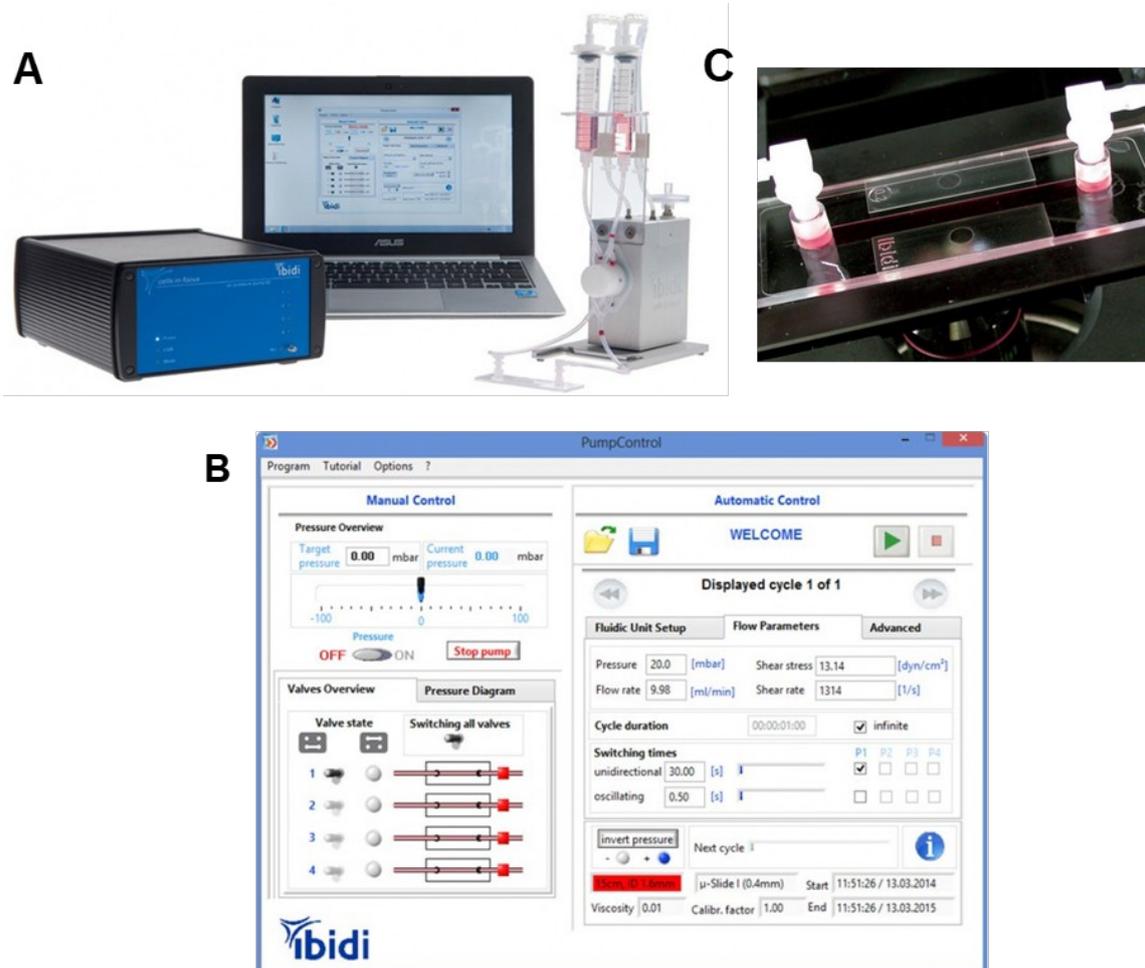


Figura 6. Sistema utilizado para simular o *shear stress*. **A** Sistema IBIDI, acompanhado pela bomba (azul), o software PumpControl (notebook) e a unidade fluídica presente com o set de perfusão. **B** Painel do software PumpControl. **C** μ -Slides I Luer 0.4 onde as ECs foram cultivadas.

3.1.4 ECs sob força de cisalhamento combinado com IL-1 β , OxPAPC e CoCl $_2$

Uma vez que os estímulos foram confirmados, o experimento com todos os fatores combinados se deu da seguinte forma: i) plaqueamento das HCAECs em μ -Slides I Luer 0.4 e cultivo *overnight*; ii) no dia seguinte as células foram acopladas ao set de perfusão contendo 12 ml de meio EBM2-MV (Figura 6A) seguida da adição dos estímulos (IL-1 β , OxPAPC, CoCl $_2$ ou todos combinados) ao set de perfusão e integração à bomba; iii) início do *shear stress* com LSS ou OSS por 48 horas e viscosidade do meio (0.0072 para o

meio EGM-2MV da Lonza) (Figura 6C). Esse processo foi repetido para todas as combinações descritas na (Figura 8A). O equipamento é limitado a simular somente um tipo de fluxo de cada vez. Repetimos o mesmo experimento para todas as combinações quatro vezes, sempre utilizando lotes diferentes de HCAEC adquiridos pela LONZA. O RNA total foi coletado das células após cada experimento.

3.2 Expressão gênica e proteica

3.2.1 Extração de RNA

As células foram lisadas com 1mL de *Trizol Reagent* (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente com clorofórmio (200µL/amostra) e centrifugadas a 12000g a 4°C por 15 minutos para a separação de fases. O sobrenadante onde se localiza o RNA total foi coletado e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente com 500µL de isopropanol. Após a centrifugação (12000g, 4°C, 10 minutos), o precipitado de RNA foi incubado com 1mL de etanol a 75%, e novamente centrifugado a 7500g a 4°C por 5 minutos. Após a secagem, o precipitado de RNA foi diluído em 20µL de água deionizada autoclavada com dietilpirocarbonato (DEPC). A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop).

3.2.2 PCR em tempo real

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). A PCR em tempo real foi realizada usando o reagente SYBR-Green (Roche) com o sistema QuantiStudio 12K Flex (Applied Biosystems) e primers específicos (Tabela 1). Utilizamos os valores de Ct de GAPDH para normalização do Δ Ct. A variação da expressão gênica entre as amostras foi calculada usando o método $\Delta\Delta$ Ct¹³².

Tabela 1. Lista de primers utilizados e seus amplicons

Gene	Foward	Reverse
CD36	AGATGCAGCCTCATTTCCAC	AGATGCAGCCTCATTTCCAC
ATF3	GCAAAGTGCCGAAACAAGAAG	GCTTCTCCGACTCTTTCTGC

3.2.3 Extração de proteínas e Western Blotting

As células foram lisadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, deoxicolato de sódio 0,5%, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, Tris-HCl 50mM, pH 8) contendo inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich) e as proteínas quantificadas por kit de ensaio proteico BCA (Pierce Biotechnology).

Quantidades equivalentes de proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra (SDS 0,5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%, ditioneitol 50mM, Tris 50mM, pH 6,8), e submetidas a eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando géis de poli(acrilamida) de diferentes concentrações. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond). As membranas de PVDF contendo as proteínas transferidas foram incubadas primeiro em solução de bloqueio (albumina de soro bovino a 5% e Tween 20 a 0,1% em TBS, pH 7,4) durante 1 hora, a temperatura ambiente, seguido de incubação por 16-18 horas em anticorpo primário específico (Tabela 2) diluído em solução de bloqueio a 4°C. As membranas também foram incubadas com anticorpos primários específicos para GAPDH ou Beta-actina (Abcam, Cambridge, MA, USA) utilizados como controles internos (normalizadores).

Após incubação durante 1 hora, a temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP), o anticorpo primário ligado foi detectado utilizando um analisador de imagem quimioluminescente (ImageQuant LAS 4000 mini) e as imagens quantificadas por densitometria utilizando o software ImageJ¹³³.

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para validar as condições testadas

Anticorpos	Empresa	Diluição
HIF-1 α	Cell Signaling#3619	Diluição 1:1000
VCAM-1	Origene#TA50391	Diluição 1:1000
GAPDH	Abcam#ab22555	Diluição 1:2000
β -actin	Abcam#ab8227	Diluição 1:2000

3.3 Análises de expressão gênica global – Microarray

3.3.1 Microarray ensaio

Utilizamos o Micro Kit RNeasy (Qiagen) para isolamento de RNA total para aumentar a eficiência de extração de RNA de amostras com pouco material, como as cultivadas no Ibidi (2×10^5 células). Seguimos o protocolo do fabricante (RNeasy® Micro Handbook), que de forma resumida consiste em lisar as amostras em um *buffer* de lise (*Buffer* RLT) com 1% de β -Mercaptoetanol (β -ME). O etanol foi adicionado ao lisado para proporcionar condições de ligação ideais. O material lisado foi posteriormente tratado com a enzima DNase adicionada ao *Buffer* RDD. E finalmente, o lisado foi colocado na coluna de centrifugação RNeasy MinElute, onde o RNA se liga à membrana de sílica. Em seguida, a DNase e quaisquer contaminantes foram lavados e o RNA concentrado puro foi eluído em 14 μ L de água.

Para gerar a expressão gênica global (>20.000 genes), utilizamos os Ensaios Clariom S Humano (Thermo Fisher Scientific) que detectam apenas os exons presentes em todas as isoformas expressas de transcritos conhecidos como exons constitutivos de locus de um único gene. As amostras foram processadas em matriz de placas no GeneTitan™ Microarray System. Todo o protocolo de processamento e corrida das amostras seguiu o protocolo padrão descrito pelo fabricante (GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit Manual Target Preparation for GeneChip™ Whole Transcript (WT) Expression Arrays). A análise dos dados de transcriptomas foi realizada utilizando a plataforma R para analisar e visualizar o perfil molecular da expressão de genes, análises de expressão diferencial, análises de enriquecimento de vias e *gene ontology* para processos biológicos.

3.3.2 Análise do microarray – Controle de qualidade

Utilizando os arquivos CEL gerados a partir do GeneTitan™ Microarray System, o controle de qualidade de cada arquivo foi checado antes de qualquer análise posterior. O pacote utilizado foi o arrayQualityMetrics¹³⁴, a fim de identificar intensidades anormais do sinal (saturação ou ruído), média da variância da intensidade desse sinal e possíveis *outliers*. Para calcular intensidades anormais, utilizamos o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov entre a distribuição da matriz de intensidade de cada *array* (amostra) e a distribuição dos dados agrupados. Normalmente, espera-se uma distribuição semelhante entre todas as amostras e se a distribuição de uma matriz for muito diferente das outras, pode indicar um problema experimental. Outra análise realizada foi

do desvio padrão das intensidades nas matrizes após a normalização e transformação para uma escala de logaritmo, a fim identificar possível saturação do sinal. E por fim, para a identificação de *outliers* foi realizado a estatística D de Hoeffding na distribuição conjunta de M e A para cada matriz. M e A são definidos como:

$$M = \log_2 (I1) - \log_2 (I2)$$

$$A = 1/2 (\log_2 (I1) + \log_2 (I2)),$$

onde I1 é a intensidade da matriz estudada e I2 é a intensidade de uma "pseudo"-matriz que consiste na mediana entre as matrizes. $D > 0.15$ foi considerado como *threshold* para remover os *outliers*.

3.3.3 Análise do microarray – Expressão gênica diferencial

A análise de expressão gênica diferencial foi realizada com o pacote limma¹³⁵. A análise foi realizada utilizando a matriz logarítmica da intensidade do sinal ajustado em um modelo linear, utilizando a função lmFit(). E por fim, aplicamos estatísticas empíricas de Bayes a este modelo linear, calculando o valor t e seu p-valor correspondente para cada gene. Concomitantemente, foi realizado um ajuste por múltiplos testes pelo BH, que é o método de Benjamini e Hochberg para controlar o *False Discovery Rate* (FDR).

Os genes diferencialmente expressos (DEGs do inglês *Differentially Expressed Gene*) foram visualizados na condição comparada ao que foi considerado como controle. Por exemplo, na comparação OSS vs. LSS, os genes diferencialmente expressos equivalem aos genes na condição OSS quando comparada ao LSS, sendo o LSS considerado o controle nessa comparação. Consideramos genes diferencialmente expressos os que apresentaram p-valor ajustado < 0.05 e o valor absoluto do $|\text{Log}_2\text{Foldchange}| > 1.3$.

3.3.4 Análise do microarray – enriquecimento de vias de sinalização intracelular e processos biológicos

Realizamos análises de enriquecimento de vias e processos biológicos com os DEGs identificados nas comparações acima utilizando o pacote clusterProfiler¹³⁶. Esse pacote utiliza anotações significativamente enriquecidas com base em uma lista de genes, com suas extensas bibliotecas de conjuntos de genes incluindo *Gene Ontology* (GO) e várias bibliotecas de análise de via como a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway* (KEGG),

Reactome pathway, *Wikipathway* e outros. Consideramos via enriquecidas e GO para processos biológicos com p-valor ajustado menor ou igual a 0.05. A análise de redundância foi aplicada para identificar e manter os termos do GO mais representativos entre os termos redundantes (ponto de corte = 0.9 e p valor ajustado ≤ 0.05). Calculamos um *score* com base no $-\log_{10}$ (valor p ajustado) das vias e processos biológicos significativamente enriquecidos. Consideramos os processos biológicos as vias enriquecidas com um p valor ajustado < 0.05 .

3.3.5 Rede gênica regulatória TF-DEGs

Usando o banco de dados TRRUST (versão 2)¹³⁷, os TFs foram mapeados para seus alvos de transcrição previamente publicados. A rede de transcrição identificada foi filtrada adicionalmente com base se o TF e seus alvos eram um DEG. O tamanho do nó foi considerado de acordo com o grau de conectividade. O *Cytoscape*¹³⁸ (versão 3.7.2) foi usado para visualizar topologicamente a rede regulatória TF-DEGs e a ferramenta *Network Analyzer* para identificar os *hubs* com base em valores de centralidade de alto grau e alta proximidade.

3.4 Análise de dados públicos de RNA-seq de célula única (scRNA-seq) de placas ateroscleróticas presentes em artérias coronárias humanas

O dado público usado (GSE131778) para o scRNA-seq de placas de artéria coronária humana¹³⁹ está disponível no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO). Utilizamos as matrizes de expressão gênica para as análises subsequentes usando o pacote R Seurat¹⁴⁰ versão 3.2.2. Utilizando o tutorial (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/training/10XRNASeq/seurat_workflow.html), fizemos um *cutoff* das células que expressavam menos de 200 genes e se estes eram expressos em menos de três células. Filtramos células com contagens de genes únicos (nFeature_RNA) acima de 2.500 ou menos de 200. Células contendo $> 5\%$ de genes mitocondriais foram consideradas de baixa qualidade e também foram descartadas. As contagens de células foram normalizadas por log por um fator de tamanho de 10.000 contagens de RNA e, em seguida, escalonadas. A análise de componentes principais (PCA do inglês *Principal components analysis*) foi aplicada aos dados escalonados para

redução da dimensionalidade. Usamos as funções FindNeighbors() e FindClusters() no dado de PCA utilizando a distância euclidiana para refinar os pesos das bordas entre quaisquer duas células e agrupar interativamente as mesmas com um padrão de expressão semelhante. Usamos UMAP para visualizar as células dos clusters identificados. Aplicamos a função FindMarkers() para identificar os marcadores que definem cada cluster, que automaticamente por meio de análise de expressão diferencial compara um cluster com todos os outros. Mantivemos como marcadores com p valor ajustado ≤ 0.05 e valor absoluto de $|\log_2\text{foldchange}| \geq 0.25$. Os 10 principais marcadores de cada cluster foram utilizados para anotar manualmente o tipo de célula.

3.5 Seleção de dados públicos para a criação das redes regulatórias de disfunção endotelial

Utilizando dados públicos para a criação das redes regulatórias, utilizamos dados de RNA-seq para expressão gênica global, CHIP-seq de H3K27ac para marcadores ativos de *enhancer*, e ATAC-seq para regiões abertas da cromatina. Identificamos estudos que quantificavam esses três tipos de *datasets* em células endoteliais de artéria aorta humana (HAEC). Os estudos selecionados foram: (GEO - GSE112340)¹⁴¹ HAECs submetidas a OSS, LSS e condição estática por 24h; (GEO - GSE89970)¹⁴² HAECs cultivadas em condição estática e estimuladas com IL-1 β (10ng/mL), TNF- α (10ng/mL) ou OxPAPC (40 μ g/mL) por 4h.

3.6 Análise dos dados públicos de sequenciamento de ATAC-seq, CHIP-seq e RNA-seq

Utilizamos os dados pré-processados alinhados a hg19 usando Bowtie2. Picos foram identificados usando a ferramenta MACS2. Os arquivos BED de chamada de picos de várias replicatas foram compilados por meio de votação de consenso (<https://ro-che.info/articles/2018-07-11-chip-seq-consensus>), em que os picos considerados foram os picos sobrepostos entre as replicatas (pacotes no R, rtracklayer¹⁴³ e GenomicRanges¹⁴⁴). Os picos de consenso ATAC e CHIP-seq foram identificados e anotados usando o pacote R CHIPSeeker¹⁴⁵.

Para o dado de RNA-seq, após o controle de qualidade fastQC das amostras, as sequências foram trimadas com 13 bp para criar os arquivos

SAM, posteriormente convertidos para BAM e alinhados para hg19 usando HTSeq2 (ref). A PCA, o efeito de correção de *batch* e a análise de expressão diferencial foram realizados com o pacote R DESeq2¹⁴⁶. A análise de expressão diferencial foi realizada para cada condição, IL-1 β , TNF- α e OxPAPC, em comparação com o controle basal estático, enquanto que o OSS foi comparado com LSS. Consideramos como DEGs aqueles com um p-valor ajustado < 0.05 e o valor absoluto do $|\text{Log}_2\text{Foldchange}| > 1.5$.

3.7 Integração dos dados ômicos e enriquecimento de *motifs*

Para integrar o dado de ChIP-seq e ATAC-seq e identificar os picos que se sobrepõem a todas as condições, utilizamos o pacote R ChIPpeakAnno¹⁴⁷. Usamos a função findOverlappingPeaks(), que consiste em usar como *input* os picos consensos identificados anteriormente para cada condição investigada. Consideramos como um recurso de sobreposição o fato de o pico1 residir inteiramente dentro do pico 2. Inicialmente identificamos as regiões comuns de cromatina aberta (ATAC-seq) e, subsequente aos dados de ChIP-seq, quando as HAEC foram submetidas aos estímulos OSS, IL-1 β , TNF- α e OxPAPC. Posteriormente, aplicamos o findOverlappingPeaks() para identificar a sobreposição de picos de ChIP-seq e ATAC-seq. Assim, o arquivo final continha as regiões comuns a todos os estímulos e as regiões de cromatina aberta e *enhancers* ativos. A análise de enriquecimento de *motifs* usando rGADEM e MotIV¹⁴⁸ (pacotes R utilizando o banco de dados JASPAR¹⁴⁹) foi realizada nesse arquivo final para predizer os fatores de transcrição ativos nessas regiões regulatórias. Os picos sobrepostos quando anotados (ChIPSeeker), são associados a genes, e dessa forma, conseguimos filtrar os DEGs no dado de RNA-seq presentes nessas regiões regulatórias. Consideramos apenas os DEGs identificados em qualquer estímulo quando comparado ao seu controle basal.

3.8 Criação de redes regulatórias TF-DEGs, perturbações *in silico* e priorização de genes candidatos

Novamente usamos o banco de dados TRRUST, só que para mapear os TFs enriquecidos nas regiões regulatórias com os DEGs encontrados no RNA-seq. Assim, os DEGs ligados a esses TFs foram usados para gerar redes de interação proteína-proteína (PPI do inglês *Protein-Protein Interaction*). As redes foram geradas inicialmente utilizando o algoritmo RWR (do inglês *Random-*

walk with restart) usando o pacote R *dnet*¹⁵⁰. As arestas foram calculadas utilizando similaridade semântica de Resnick BMA¹⁵¹ entre os termos de processos biológicos do GO a partir de pares de interação herdados dos bancos de dados Intact¹⁵², Signor¹⁵³, PhosphoSitePlus¹⁵⁴ e OmniPath¹⁵⁵. Os valores das arestas variam de 0 a 1, quanto mais próximo de 1, maior a similaridade semântica entre os genes e, portanto, maior a probabilidade do algoritmo RWR caminhar por aquela aresta conectando os dois nós pela rede (Figura 7).

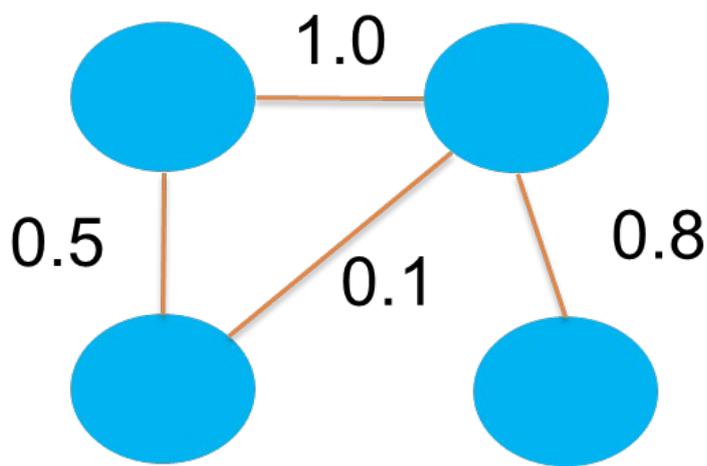


Figura 7. Similaridade semântica entre os nós baseado nos termos de processos biológicos do GO utilizando os bancos de dados de sinalização Intact¹⁵², Signor¹⁵³, PhosphoSitePlus¹⁵⁴ e OmniPath¹⁵⁵.

Os genes presentes nas redes foram anotados de acordo com as principais funções identificados em vias de sinalização clássicas, como proteínas secretadas ou indutores externos, proteínas de membrana, seguidos de Kinases e fosfatases, e por fim, os TFs. Genes que não se encaixavam em nenhuma dessas funções foram agrupados como “outras”.

Rodamos as redes a partir dos genes *seeds* (TF e seus DEGs) identificados a partir da integração dos dados de ChIP-seq, ATAC-seq e RNA-seq. Utilizando o algoritmo RWR para simulação aleatória de 1.000 vezes para cada *seed*. Um nó era considerado significativo se seu *score* de afinidade em relação as *seeds* usadas fosse maior do que o *score* de afinidade do mesmo nó com uma simulação RWR realizada com *seeds* aleatórias. Para simular os *Knockouts* (KOs) dos TF-DEGs nas redes, geramos novamente as redes utilizando o mesmo processo acima, apenas removendo o gene de interesse para cada nova rede.

Para a priorização dos alvos comparamos as novas redes com a rede original (uma rede de cada vez) e utilizamos algumas métricas estatísticas como divergência de Jensen-Shannon (mede a similaridade entre duas distribuições de probabilidade - valor que vai de 0 a 1), *Z score* (também chamada de *standard score* mede quantos desvios padrão abaixo ou acima está da média da rede original) e *RWR score* (descrito acima). Além disso, utilizamos *DisGeNet score* para remover genes já previamente associados a doenças cardiovasculares como a aterosclerose. *DisGeNET* integra dados de repositórios como o GWAS, modelos animais e literatura para associar doença e genes ou variantes genéticas¹⁵⁶. Para a priorização dos genes candidatos, por ordem de peso, consideramos se o gene perturbado na rede era um DEG, em seguida consideramos o Jensen-Shannon, *Z score* e *RWR score*, e por fim, *DisGeNET score*.

3.9 Seleção de moléculas alvo usando ChEMBL e OpenTarget

Com os alvos priorizados acima, identificamos quais destes genes já possuíam dados robustos na literatura sobre seus respectivos inibidores (em caso de enzimas) ou antagonistas, usando os bancos de dados *OpenTarget* (<https://www.opentargets.org/>) e *ChEMBL*¹⁵⁷. Em seguida, utilizamos os valores de *K_i* (do inglês *inhibitory constant*) e *IC₅₀* para selecionarmos dessa base de dados moléculas com base nos valores de *K_i* e *IC₅₀*. Para o *K_i* utilizamos um *threshold* de 500nM, de modo semelhante aos valores limites adotados na área de descoberta de fármacos¹⁵⁸. Mais especificamente, o *K_i* reflete a afinidade de ligação da molécula com seu alvo, enquanto o *IC₅₀* corresponde a concentração “total” de inibidor necessária para atingir 50% de inibição do alvo. Em seguida, fizemos a curadoria das moléculas que passaram pelo *threshold* de *K_i*, analisando suas propriedades físico-químicas e tipo celular do ensaio. Dessa forma, selecionamos uma molécula por gene alvo.

3.10 Ensaio de citotoxicidade das moléculas selecionadas

17 DEGs foram identificados com expressão aumentada nas condições patológicas em comparação aos seus controles, presentes nas regiões regulatórias comuns entre os estímulos, que obtiveram um alto *score* quando perturbados nas redes *in silico* (Resultados – 5.3). Assim, 17 moléculas inibitórias ou antagonistas foram selecionadas para um ensaio de citotoxicidade utilizando HAECs em cultura estática com as doses: 10^{-06} e 10^{-08} M. Para tal,

utilizamos o kit LIVE/DEAD® *Viability/Cytotoxicity* (Thermo Fisher Scientific). HAECs cultivadas (EGM2-LONZA) em placas de 96 *wells* (3×10^4 células por *well*), na confluência de 100% foram submetidas as moléculas nas duas concentrações acima por 48h. Após esse período, o meio foi removido cuidadosamente, e adicionamos as sondas fluorescentes para reagir com células vivas (calceína-AM, 2 μM – 488nm de comprimento de onda) e mortas (homodímero-1 de etídio, 4 μM – 555nm de comprimento de onda), juntamente com um marcador de núcleo celular (Hoechst 8,1 μM - 361 comprimento de onda) (Thermo Fisher Scientific) diluído em PBS. As sondas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e em seguida removidas. As células foram fixadas com PFA 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. Por fim, deixamos as células em PBS para aquisição das imagens com o microscópio de fluorescência EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific). Foram tiradas nove fotos por *well* com ampliação de 20x. Utilizamos como controle basal HAECs cultivadas em DMSO (mesmo volume utilizado na concentração à equivalente a dose mais alta 10^{-06} das moléculas) e como controle positivo de morte, células cultivadas em *starving* por 24h.

3.11 High Content Screening para marcadores de função endotelial

Com as moléculas escolhidas para serem avaliadas funcionalmente, alguns marcadores para função endotelial foram mensurados: geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), proliferação celular, expressão proteica do marcador de inflamação ICAM-1 e do marcador de permeabilidade celular VE-caderina.

As HAECs foram plaqueadas em placas de 96 *wells* (3×10^4 células por *well*) para o *screening*. Elas foram pré-incubadas com as 17 moléculas selecionadas diluídas em meio de cultura completo (EGM-2MV) nas concentrações de 10^{-6} e 10^{-8}M por 2 horas. Em seguida, adicionamos ao meio IL-1 β (10ng/mL) e OxPAPC (50 $\mu\text{g/mL}$). As HAECs foram cultivadas por um período de 50 horas (2 horas pré-tratamento + 48 horas de estímulo com IL-1 β e OxPAPC). Utilizamos como controles basais HAECs sem DMSO, com DMSO (mesmo volume utilizado para as drogas na concentração de 10^{-06}M), com IL-1 β e OxPAPC (sem drogas). Adicionalmente, utilizamos PMA (10 μM) e H_2O_2 (200 μM) por 1h antes do término do período de incubação para estimular a

produção de ROS. Para a comparação com as moléculas testadas utilizamos a droga atorvastatina (5 μ M). Seguimos com a mesma abordagem, pré-tratamento com estatinas (5 μ M), seguido por 48h de estímulo com IL-1 β e OxPAPC.

Após o término do experimento as células foram incubadas com a sonda CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific, 5 μ M) por 30 minutos a 37°C para avaliação da geração de ROS. Em seguida, as células foram fixadas com PFA 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguimos com o protocolo de imunofluorescência com permeabilização por 1 hora com Triton (0,1% em PBS), bloqueio com BSA a 5% em PBS por 1 hora e incubação com os anticorpos primários anti-ICAM1 e anti-VE-caderina a 4°C *overnight* (Tabela 3). Após essa incubação, lavamos com PBS (2x) e seguimos com a incubação com DAPI (Thermo Fisher Scientific, 1mg/mL) e com os anticorpos secundários para ICAM-1 e VE-caderina. Por fim, fizemos mais duas lavagens com PBS, e as células foram mantidas em PBS para aquisição das imagens.

Tabela 3. Anticorpos utilizados para imunofluorescência

Anticorpos	Empresa	Diluição
ICAM-1	Cell Signaling#62133	Diluição 1:200
VE-cadherin	Cell Signaling#2500	Diluição 1:200

3.12 Aquisição e análise das imagens

Utilizamos o microscópio de fluorescência EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram obtidas com ampliação de 10x, com 9 imagens por *well*. Em seguida, realizamos uma análise de compilação para uma única imagem por *well* utilizando o software EVOS Cell Imaging Systems (ThermoFisher). Utilizamos os 4 filtros de fluorescência, azul para o DAPI (361nm de comprimento de onda), verde para ROS (488nm de comprimento de onda), laranja para VE-caderina (647nm de comprimento de onda) e vermelho para ICAM-1 (555nm de comprimento de onda). Após a aquisição, as imagens foram submetidas ao software CellProfiler¹⁵⁹. O pipeline de análises das imagens seguiu, inicialmente, com a identificação de objetos primários para identificar o núcleo. Em seguida, fizemos a identificação e a segmentação dos objetos secundários ROS (CM-H₂DCFDA), ICAM-1 e VE-caderina realizadas a

partir das marcações de DAPI. Em seguida, quantificamos a intensidade do sinal para os objetos secundários identificados. Consideramos para análise a mediana da intensidade para ROS, enquanto que para ICAM-1 a mediana da intensidade da borda (*EDGE*). Já para VE-caderina realizamos uma análise de distribuição da intensidade do sinal. A distribuição é medida a partir do centro do objeto, onde o centro é definido como o ponto mais distante de qualquer borda. Utilizamos os objetos primários (núcleo) para o centro e selecionamos duas categorias para serem quantificadas. A categoria 1 é a mais interna (citoplasma), enquanto que 2 é a mais externa (borda/membrana). Consideramos para as análises de VE-caderina a intensidade da borda e a razão da intensidade da membrana/citoplasma, como análise de translocação dessa proteína. Os parâmetros medidos além da intensidade, incluíram área da célula, comprimento e circularidade utilizando o marcador VE-caderina.

3.13 Análises estatísticas

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software R (versão 4.1.0). De acordo com a distribuição dos dados de qPCR, Western blot e dos marcadores ROS, ICAM1 e VE-caderina utilizamos teste t de *Student* ou ANOVA one way, seguido do teste post hoc de BH. Ou teste não paramétrico ANOVA por Ranks de Kruskal-Wallis, seguido por Wilcoxon teste para múltiplas comparações. Significância estatística foi considerada como $p < 0.05$.

4. Resultados e Discussão

Capítulo 1

A ativação das vias proliferativas no endotélio surge pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular: hipóxia, lipídios oxidados, inflamação e fluxo oscilatório

4.10 efeito dos fatores de risco CV no transcriptômica global das células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC)

HCAEC foram submetidas seja ao fluxo laminar (LSS) ou ao oscilatório (OSS) combinados individualmente com hipóxia, lipídios oxidados, inflamação ou simultaneamente a todos os fatores (hipóxia, lipídios oxidados e inflamação) para descobrir a hierarquia entre os estímulos individuais e seu efeito combinado na expressão gênica global. Assim temos os grupos: LSS, LSS&CoCl₂, LSS&IL-1β; LSS&OxPAPC, OSS e OSS&CoCl₂&IL-1β&OxPAPC (Figura 8A). A exposição combinada dos estímulos simula o agrupamento de fatores de risco CV observados em pacientes com doenças cardiovasculares.

Primeiramente, padronizamos o efeito de cada estímulo em HCAEC em condição de cultura estática. Foi verificada a capacidade da hipóxia química (CoCl₂, 150 μM) para ativar HIF-1α; lipídios oxidados (OxPAPC, 50μg/mL) para aumentar a expressão de *ATF3* e reduzir a expressão de *CD36*; inflamação induzida por IL-1β (10ng/mL) para aumentar a expressão proteica de VCAM-1; LSS (20 dinas/cm²) e OSS (+/-5 dinas/cm² a 1Hz) para, respectivamente produzir ou não alinhamento das ECs na direção do fluxo. Conforme mostrado na figura 8 B-E, todos os estímulos utilizados experimentalmente para mimetizar os fatores de risco CV alteraram a estrutura e a função da célula endotelial como esperado.

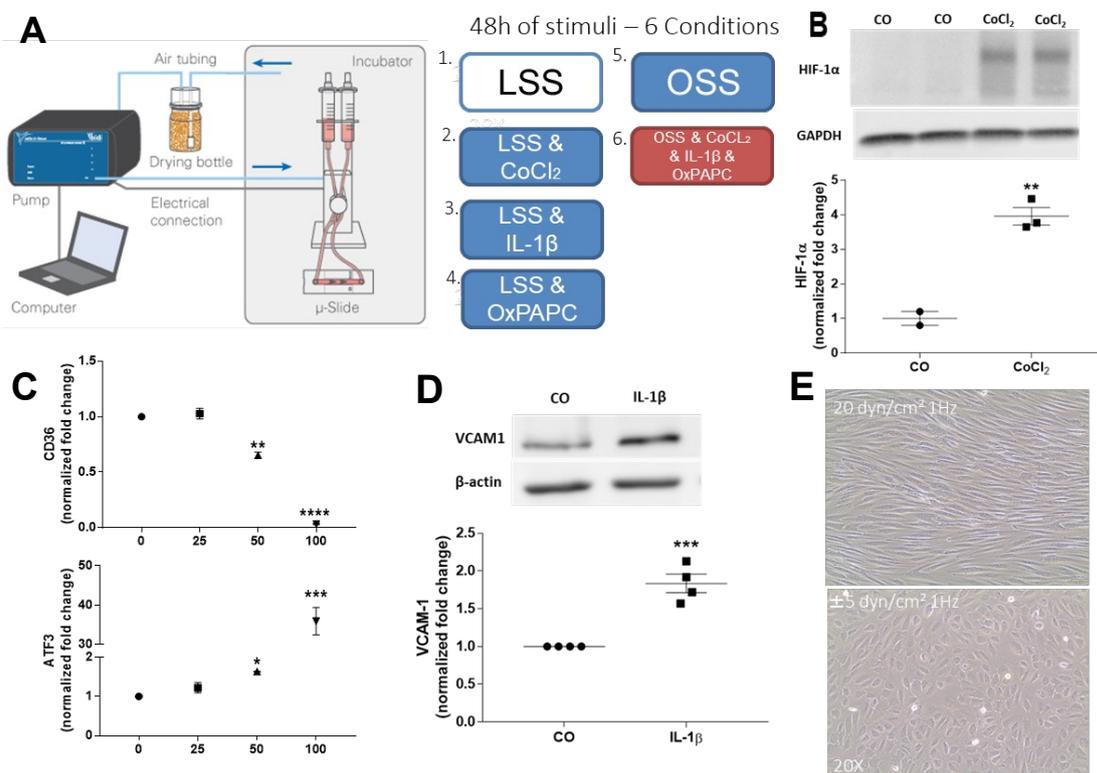


Figura 8. *Shear stress in vitro* no modelo de célula endotelial da artéria coronária humana (HCAEC) e padronização de cada estímulo. **A** desenho geral das HCAEC submetidas ao fluxo LSS ou OSS combinados com os estímulos individuais ou agrupados. **B** HCAEC sob condição estática estimulada com CoCl_2 por 48 h, com expressão da proteína HIF-1 α determinada por Western blot (** P <0,01, vs. controle estático, n = 3), GAPDH usado como proteína referência. **C** HCAEC sob condição estática estimulada por OxPAPC por 48h, seguido de quantificação por PCR em tempo real dos genes *CD36* e *ATF3* usando *GAPDH* como controle interno (** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001 vs. controle estático, n = 2). **D** HCAEC sob condição estática estimulada com IL-1 β e, em seguida, análise de expressão da proteína VCAM1 por Western blot (*** P <0,001 vs. controle estático, n = 4), usando β -actina como proteína referência. **E** HCAEC sob LSS e OSS por 48h mostrando um padrão de células alinhadas em LSS quando comparado a ECs sob OSS. Os dados são apresentados como média \pm DP; Os valores de p foram determinados pelo teste de Wilcoxon (B, D) e Kruskal-Wallis (C).

Os efeitos de cada estímulo individual ou combinado na expressão gênica global de HCAEC foram avaliados por análise de componentes principais (PCA) (Figura 9A). As PC 1 e 2 explicam aproximadamente 37% da variância dos dados de expressão. A PC1 destaca a influência do *shear stress* que está associado a uma separação visual das amostras expostas ao LSS ou ao OSS, enquanto a PC2 mostra a influência da IL-1 β , OxPAPC e os estímulos combinados de todas as outras condições. Examinando ambas, PC1 e PC2, os dados indicam que as amostras dos estímulos combinados se distanciam mais de todos os outros estímulos. As amostras submetidas ao LSS agruparam-se com LSS& CoCl_2 , enquanto LSS&OxPAPC e LSS&IL-1 β agruparam-se em um terceiro grupo, deixando as amostras de OSS em um o quarto grupo separado (Figura 9A). O *heatmap* (Figura 9B) fornece uma visão complementar mostrando a hierarquia entre os diferentes estímulos usando a distância euclidiana como um parâmetro medido. Esta análise nos revela detalhes da contribuição hierárquica de cada condição de acordo com sua distância ao LSS, usado como referência. O gráfico bidimensional representa as amostras dos estímulos combinados como as mais distantes do LSS (amarelo), consistentes com a PCA (Figura 9A). Em seguida, os estímulos individuais que mais se distanciaram do LSS foram OSS e IL-1 β , seguidos pelos estímulos OxPAPC e CoCl_2 . O dado sugere que quanto mais distante as amostras se encontram do LSS, maior é o impacto de cada estímulo em modular o transcriptoma global das HCAEC, indicando que a hierarquia crescente dos estímulos como causadores da disfunção endotelial ocorre na ordem: hipóxia, OxPAPC, IL-1 β , OSS e por fim, os fatores de risco agrupados (Figura 9B).

Em seguida, identificamos os DEGs entre os estímulos combinados (OSS&CoCl₂&OxPAPC&IL-1 β) e o LSS sozinho, uma vez que a análise anterior indicou a maior distância e provavelmente a maior influência dessa condição na alteração da expressão gênica nas HCAECs. Identificamos 620 DEGs comparando essas condições, sendo 296 genes com expressão diminuída e 323 com expressão aumentada (Figura 9C). O gene *NOS3*, responsável pela síntese da enzima que leva à produção do vasodilatador NO¹⁶⁰, foi o DEG com expressão diminuída mais significativa, consistente com a ideia de que a diminuição da produção de NO está associada à disfunção endotelial (Figura 9C). A lista de todos os DEGs está mostrada na Tabela Suplementar 1.

Entre os DEGs, identificamos 40 TFs diferencialmente expressos (14 com expressão diminuída e 26 com expressão aumentada) que podem ser críticos para controlar a resposta induzida por estímulos combinados na HCAEC (Figura 9D). Os TFs sensíveis ao *shear stress* *KLF2* e *KLF4* estão com a expressão diminuída na condição com os fatores de risco agrupados. Os TFs *NFKBIZ*, *NFKB2*, *NFATC2* e *RELB* e suas quimiocinas alvo *CXCL1/3/4/5/6/8* estão com a expressão aumentada na condição com todos os estímulos combinados (Tabela Suplementar 1). *MYC*, conhecido por sua associação à proliferação, crescimento e diferenciação celular¹⁶¹, foi regulado positivamente no grupo de estímulos combinados. *EGR1* foi regulado positivamente e é conhecido por mediar a resposta *downstream* de hipóxia¹⁶². Embora a ativação da expressão do gene *HIF1A* não tenha sido observada, sua proteína se mantém estável a partir do estímulo com CoCl₂ como mostrado na Figura 8C. *ATF3*, conhecido por ser ativado por OxPAPC¹⁶³, foi regulado positivamente no grupo de estímulos combinados de maneira semelhante ao observado quando examinamos a exposição individual a esse lipídio (Figura 8E).

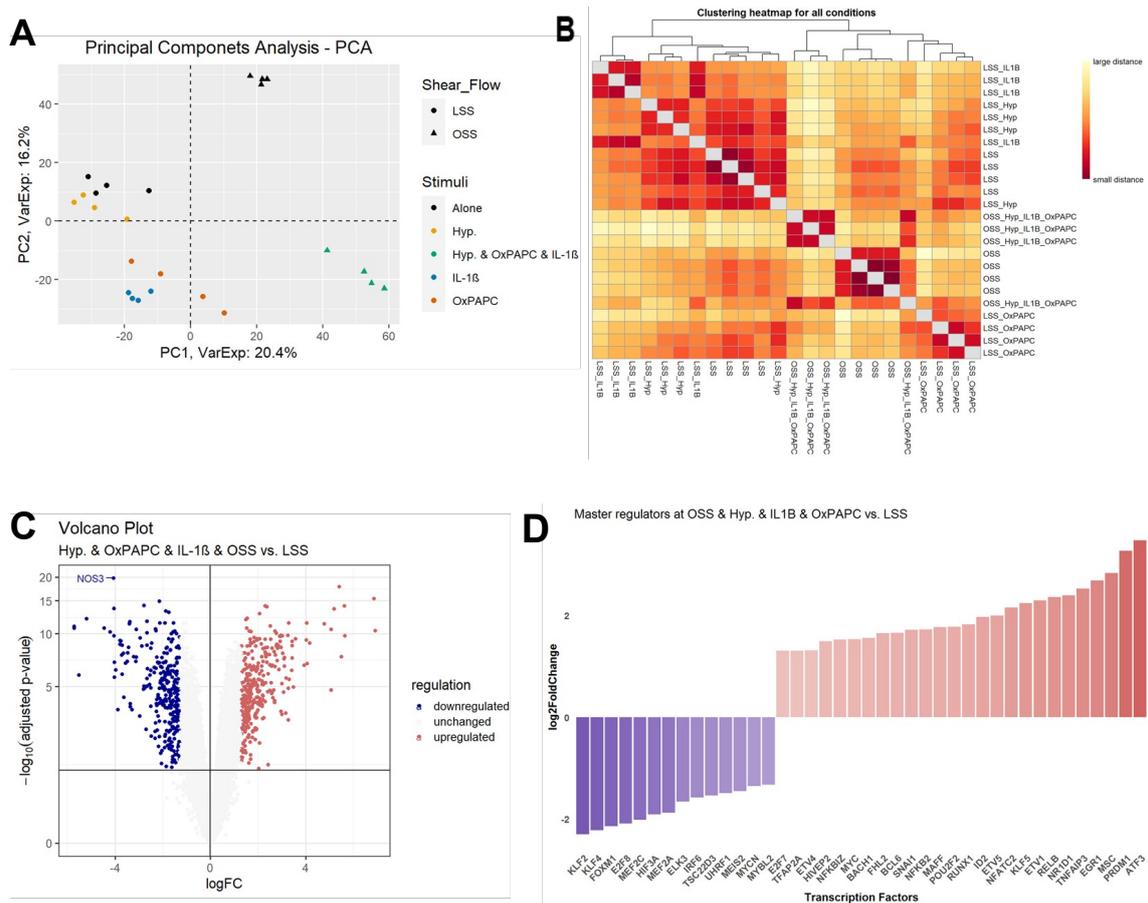


Figura 9. O perfil de expressão gênica revelou a contribuição hierárquica crescente dos fatores de risco CV Hipóxia, OxPAPC, IL-1β e OSS além da modulação de TFs relevantes para a função endotelial quando todos esses fatores de risco estão combinados. A Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil de expressão gênica de cada amostra mostrou que o PC1 explicou 20,4% da variação enquanto o PC2 16,2%. **B** O *heatmap* de agrupamento hierárquico usando a distância euclidiana como um parâmetro revela detalhes da contribuição de cada condição de acordo com sua distância ao LSS. **C** Os genes diferencialmente expressos comparando os fatores de risco agrupados com LSS estão mostrados no *Volcano plot*. Os DEGs foram considerados como valor p ajustado <0.05 e $|\text{Log}_2\text{foldchange}| > 1.3$. **D** TFs identificados entre os DEGs e seus valores de expressão em $\text{Log}_2\text{foldchange}$. Os genes em azul estão regulados negativamente e em vermelho positivamente.

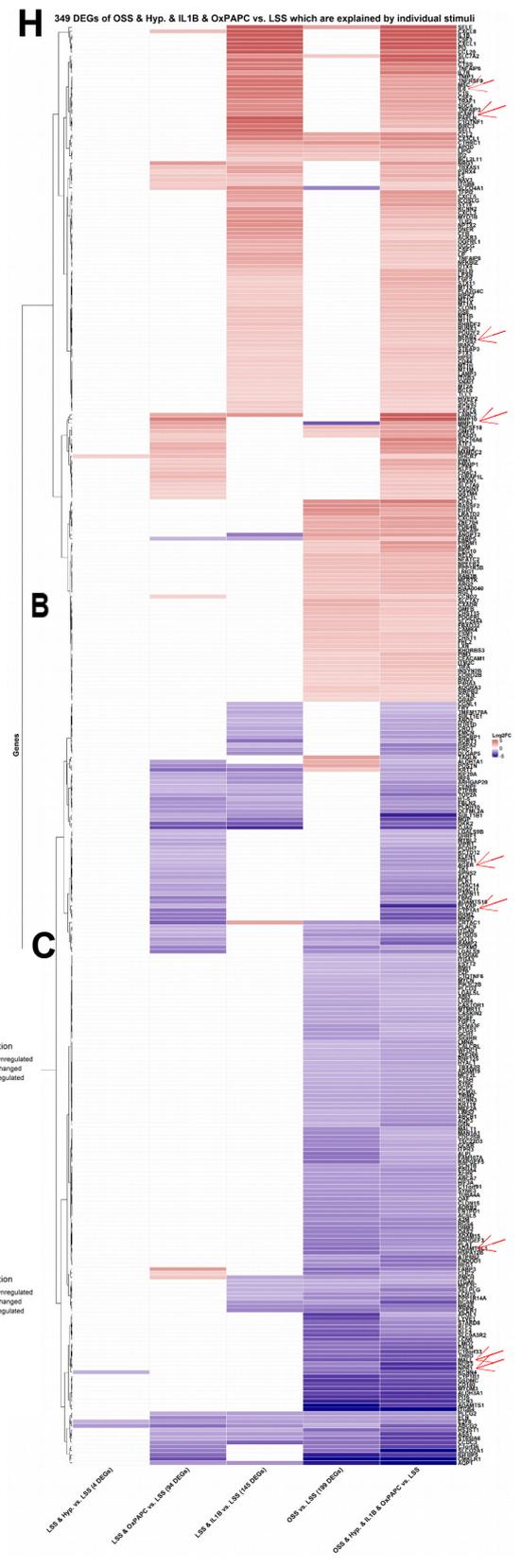
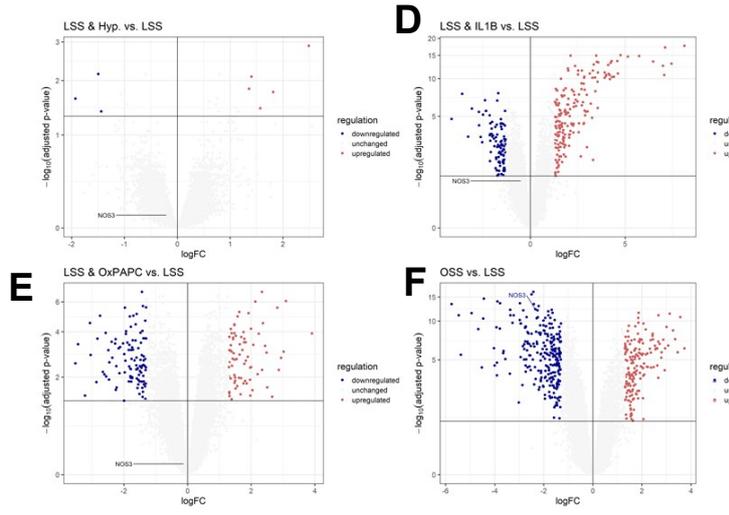
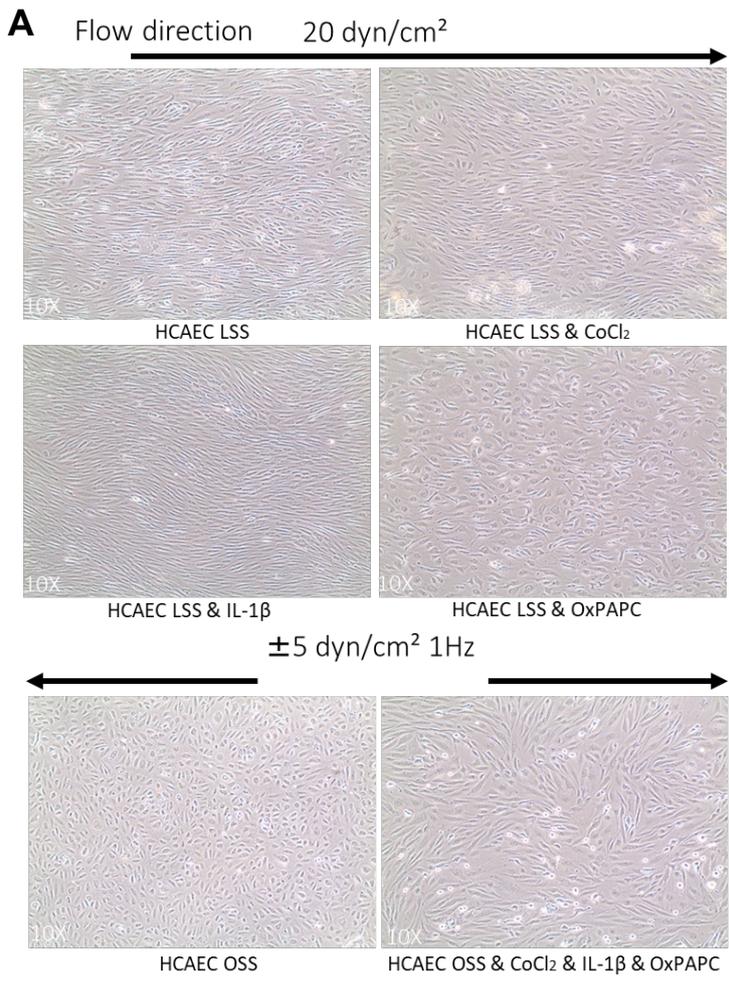
4.2 Os efeitos dos estímulos combinados na expressão gênica global de HCAEC são diferentes da soma dos efeitos individuais

Usando o LSS como referência, comparamos as HCAECs submetidas aos estímulos individuais por 48 horas (Figura 10A-B). Considerando o papel destes estímulos, identificamos 8, 179, 275 e 412 DEGs associados, respectivamente, à hipóxia química (CoCl_2), OxPAPC, inflamação induzida por IL-1β e OSS (Figura D-E). Dentre os 620 DEGs afetados pela condição de estímulos combinados em comparação com o LSS, 349 também foram

afetados por uma ou mais das perturbações individuais (Figura 10G - linha verde tracejada). Todos os 349 DEGs estão descritos na Figura 10H. Em contraste, 271 DEGs foram exclusivamente associados à condição de estímulos combinados. Entre os 349 DEGs comuns aos estímulos individuais, observamos que 37 foram modulados somente por OxPAPC, dentre eles, aumento da expressão do gene *MMP10* e diminuição da expressão dos genes *AGER* e *PLVAP*; 90 DEGs foram unicamente associados ao estímulo de IL-1 β resultando em aumento na expressão dos genes *IL6*, *PTGS2* e *ICAM1* e, 146 DEGs modulados por OSS incluindo a regulação negativa de *NOS3*, *PLAT* e *THBD* (Figura 10A, retângulo com linha verde tracejada e Figura 10H, setas vermelhas).

Como demonstrado na Figura 10B, a influência geral dos estímulos individuais confirma que a contribuição individual da hipóxia para as mudanças na expressão gênica global foi a menor dentre os estímulos analisados. Outra importante característica foi a de que o OxPAPC e OSS tiveram uma influência maior na supressão da expressão gênica, enquanto IL-1 β induziu principalmente aumento da expressão gênica. Curiosamente, os genes *E2F8* e *ABCG2* foram ambos regulados negativamente e são os únicos DEGs afetados por todas as condições examinadas (Figura 10B). O TF E2F8 regula a angiogênese através da ativação de VEGFA em cooperação com HIF-1 α ¹⁶⁴, enquanto ABCG2 está associado ao reparo cardíaco de infarto do miocárdio e sobrevivência de ECs¹⁶⁵.

Em resumo, os fatores individuais não são capazes de recapitular a condição em que todos os estímulos estão combinados, e 44% dos DEGs (271) são exclusivamente associados a essa condição. Esses DEGs são, portanto, considerados emergentes e são provavelmente perdidos quando cada estímulo é avaliado individualmente



acordo com sua pontuação mais alta dentro de cada grupo de termos redundantes. A matriz de similaridade com os termos GO redundantes e seu termo representativo (pai) estão apresentados na Figura 11A como um *heatmap*. Vias canônicas enriquecidas associadas à disfunção endotelial e à formação de placa aterosclerótica foram encontradas. Os termos redundantes se agruparam em processos inflamatórios, proliferativos, produção de ROS e NO além de organização da ECM e adesão de moléculas, os quais são: regulação da produção de quimiocinas, resposta a lipopolissacarídeo (LPS), migração de leucócitos (aglomerado verde); proliferação de células musculares lisas (aglomerados roxos e rosa), regulação da divisão celular e regulação positiva do desenvolvimento da vasculatura (azul); processo metabólico de NO e de ROS (aglomerado azul); adesão célula-substrato e organização da ECM (aglomerados laranja a marrom). Os processos biológicos associados a cada grupo representativo são mostrados na Figura 11B. Na Figura 11C, representamos todos os processos representativos mostrados na parte inferior da figura, os DEGs envolvidos e como eles são afetados apenas por estímulos individuais (azul claro para inflamação, amarelo para o OSS e laranja para OXPAPC), se são comuns a mais de estímulo (cinza) ou se eles são modificados apenas pela condição de estímulos combinados (verde).

4.3.1 Óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS).

A diminuição da biodisponibilidade de NO e o aumento das vias de produção de ROS estão enriquecidos para os DEGs da comparação dos estímulos agrupados vs. LSS, e são uma marca registrada da disfunção endotelial^{127,166} (Figura 11A-C). Para o processo metabólico de NO, *ARG2*, gene regulado positivamente, suprime sua produção por competir com o substrato de L-arginina¹⁶⁷. Adicionalmente, mais abaixo nessa via, a produção de L-arginina também está prejudicada com a regulação negativa da enzima responsável por sua biossíntese: *ASS1*, Arginosuccinato sintase¹⁶⁸. O *NOS3* e seu ativador principal *KLF2* estão regulados negativamente. O *GCH1* associado à regulação positiva da síntese de NO também foi regulado negativamente¹⁶⁹. A expressão diminuída de *CYP1B1* observada aqui, já foi associada ao aumento do estresse oxidativo¹⁷⁰. *ARG2*, *NOS3*, *KLF2* e *CYP1B1* são modulados apenas pelo OSS (Figura 11C de cima para baixo, em amarelo), enquanto *ASS1* (em cinza) é suprimido por OxPAPC, IL-1 β e OSS.

Além disso, a expressão aumentada de genes pró-inflamatórios como *ICAM1*, *TLR2* e, especialmente *PTGS2* com sua atividade peroxidase, está associada à indução de estresse oxidativo e, conseqüentemente, ao aumento da produção de ROS (Figura 11C no topo, em luz azul). Curiosamente, exceto para o gene *ASS1*, a produção de NO é regulada principalmente pelo estímulo OSS (Figura 11C, parte inferior em amarelo), enquanto o estresse oxidativo é modulado pelo estímulo inflamatório IL-1 β (Figura 11C, parte superior em azul claro).

4.3.2 Resposta inflamatória e moléculas de adesão

As ECs respondem ao LPS por meio da ativação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão¹⁷¹, interessante, parte dos 620 DEGs observados em nosso estudo se sobrepõem sobre essa via, sendo a mais significativamente enriquecida. Observamos um aumento de genes pró-inflamatórios críticos, como *IL6*, *CXCL1/3/5/6*, *TLR2*, *NFKB2* e *RIPK2* na condição com estímulos agrupados versus o LSS (Figura 11C, parte superior em azul claro). As moléculas de adesão, como E-selectina (*SELE* - em cinza), *ICAM1*, *CD44*, *SDC4* e *CSF1* foram todas reguladas positivamente, e atuam na adesão e transmigração de leucócitos e, subsequentemente, estão associadas ao crescimento de placas ateroscleróticas^{172,173}, (Figura 11C, em azul claro). Embora a maioria dos DEGs envolvidos nas vias inflamatórias sejam dependentes da presença de IL-1 β , também observamos o papel pró-inflamatório dos estímulos OSS e OxPAPC. *CX3CL1*, *SELE*, *MCP1 (CCL2)*, por exemplo, foram regulados positivamente pelo OSS, enquanto *CXCL8* foi regulado positivamente por OxPAPC (Figura 11C, região central em cinza).

Interessantemente, os genes emergentes envolvidos na adesão célula-substrato, migração de leucócitos e resposta aos termos LPS não estão diretamente relacionados à ativação do sistema imunológico, exceto por *CCL5* e *IL36B*, ambos regulados positivamente (Figura 11C, no topo em verde). Os genes regulados positivamente *ABCA1* e *TRIB1* estão associados ao aumento da captação de colesterol^{174,175}. PD-L2 (*PDCD1LG2*) com expressão aumentada e *CD58* com expressão diminuída estão associados à regulação negativa de respostas imunes mediadas por células T¹⁷⁶ e estimulação de células T, respectivamente^{177,178}, o que sugere feedback negativo sobre a resposta inflamatória das células T. Finalmente, também observamos um fenótipo de sobrevivência celular com regulação aumentada de *DAPK2*, *BCL2*,

MUC4, que conferem principalmente crescimento celular e resistência à apoptose¹⁷⁹⁻¹⁸¹, seguido pela regulação positiva de PI3K (*PIK3CD*, Figura 11C em verde), que está associada ao crescimento, proliferação e metabolismo celular^{182,183}.

Assim, o perfil de expressão dos genes emergentes parece participar da regulação inflamatória e também da captação de lipídios, do crescimento celular e da resistência à apoptose.

4.3.3 Remodelação de vasos e angiogênese

A progressão natural das lesões ateroscleróticas é acompanhada por vários graus de síntese e degradação da matriz e, conseqüentemente, o remodelamento vascular^{184,185}. Nossos dados mostram a desregulação de componentes da ECM e de proteases envolvida com a degradação de matriz, como, por exemplo, a elastina (*ELN*), a fibulina (*FBLN2*) e a fibrilinas (*FBN2*) reguladas negativamente, enquanto que a laminina (*LAMC2*) e o colágeno (*COL27A1*) estão sendo regulados positivamente; metaloproteinases (*MMP1/10*) reguladas positivamente, enquanto a desintegrina e metaloproteinase (*ADAM15/19*) reguladas negativamente. Esses genes foram modulados principalmente por mais de uma condição (Figura 11C, em cinza), exceto por *MMP10* e *FBLN2* que foram modulados unicamente por OxPAPC, enquanto *ADAM15/19* foi modulado apenas por OSS.

O remodelamento expansivo em excesso, o espessamento da íntima e, conseqüentemente, a redução do lúmen e isquemia abrem caminho para o aumento do processo de angiogênese^{62,186}. Em nosso estudo, observamos genes pró-angiogênese (*PGF*, *PTGS2*, *ADM*, *CEACAM1* e *ANGPT2*) regulados positivamente e enriquecidos na via chamada regulação positiva do desenvolvimento da vasculatura (Figura 10D do topo ao meio). O gene *PGF* foi modulado apenas pela combinação dos vários estímulos, enquanto *PTGS2* foi dependente do estímulo por IL-1 β . *ADM* e *CEACAM1* são dependentes do estímulo por OSS, enquanto o *ANGPT2* foi modulado por IL-1 β e OxPAPC. Curiosamente, a regulação da via “regulação positiva do desenvolvimento da vasculatura” foi principalmente modulada por genes dependentes de OSS, onde *CXCR4* e *EGR1* foram regulados positivamente e *NOS3*, *KLF2* e *KLF4* regulados negativamente (Figura 10D em amarelo). De fato, o OSS estimula a angiogênese enquanto o LSS estabiliza a remodelação dos vasos ao inibir o

surgimento da angiogênese^{187,188}. Nossos dados sugerem que o OSS desempenha um papel mais acentuado no remodelamento vascular quando comparado aos outros estímulos.

4.3.4 Cascata de coagulação e trombogênese

A transição das placas ateroscleróticas estáveis para instáveis geralmente está associada com a degradação da ECM, o que leva à erosão ou ruptura da placa, seguido de trombose de sua superfície^{64,189,190}. Três genes importantes associados à cascata de coagulação tiveram a sua expressão aumentada em condições com um ou mais estímulos e foram enriquecidos nos termos denominados regulação positiva do desenvolvimento da vasculatura e adesão célula-substrato, como mostrados na Figura 11C. O fator tecidual (*F3* em cinza), regulado positivamente por OxPAPC e IL-1 β , inicia a coagulação do sangue formando um complexo com o fator circulante VII ou VIIa¹⁹¹; A heparanase (*HPSE* em azul), regulada positivamente por IL-1 β , é um pró-coagulante por aumentar a geração de fator de ativação X na presença de *F3* e fator de ativação VII¹⁹², e finalmente, o *F2RL1*, gene emergente em verde, está envolvido no coagulação do fator X¹⁹³. Por outro lado, genes antitrombogênicos, como a trombomodulina (*THBD*) e o ativador do plasminogênio (*PLAT*), foram regulados negativamente pelo OSS (Figura 11C). Nossos dados sugerem que fatores pró-coagulantes são principalmente ativados por estímulos inflamatórios de IL-1 β , enquanto o OSS suprime genes anticoagulantes.

No geral, esses termos demonstram que a combinação de fatores de risco CV é capaz de modular processos biológicos conhecidos associados à disfunção endotelial, mas com uma visão inédita de identificar e apontar dentro destes processos, quais genes e quais estímulos, sozinhos ou combinados, são responsáveis por sua desregulação.

A

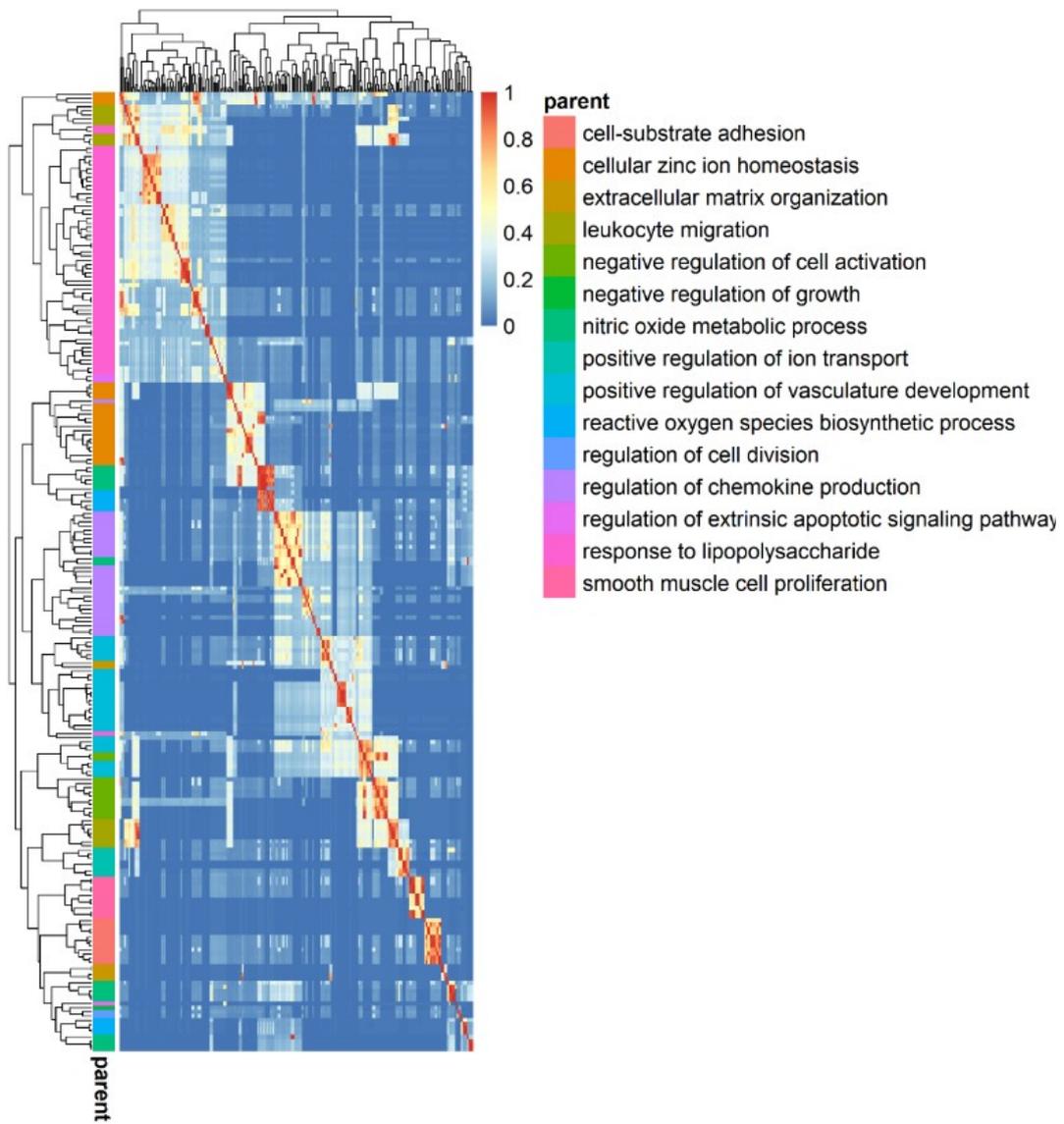


Figura 11. GO dos termos redundantes enriquecidos para os 620 DEGs dos fatores de risco agrupados vs. LSS. A *Heatmap* para a matriz de similaridade de termos GO enriquecidos (processo biológico) para os DEGs identificados com os fatores de risco agrupados. **B** uma análise de enriquecimento de GO seguida de análise de redundância identificou e manteve o termo mais representativo dos termos redundantes. **C** Termos canônicos enriquecidos em OSS & Hyp. & IL1B & OxPAPC vs. LSS (187 - número de DEGs presentes nestes termos) e a fonte do estímulo (individual, comum, mais de um estímulo e emergente). O *score* do gene e *score* do enriquecimento foram calculados por $-\log_{10}$ (valor de *p* ajustado).

4.4 Rede de disfunção endotelial reguladora da transcrição

Para entender melhor a relação funcional entre os efeitos da estimulação combinada e individual em HCAEC, usamos uma rede regulatória a fim de mapear os TFs e seus DEGs alvos com base no banco de dados TRRUST, utilizando apenas dados publicados que mostram evidência dessa interação TF-DEGs¹³⁷. Utilizando os 620 DEGs desregulados na presença de todos os estímulos, identificamos uma rede com 71 DEGs (22 TFs entre eles) e 94 interações (Figura 12A). Os 3 maiores nós conectados foram *EGR1*, *MYC* e *KLF4* com 18, 17 e 11 pares de interações, respectivamente. A grande maioria dos genes pertencentes a esta rede gênica foram modulados pelo OSS, pelos efeitos exclusivos da condição de estímulos combinados (emergentes) e pela inflamação induzida por IL-1 β , incluindo a modulação de 19, 17 e 16 genes, respectivamente (Figura 12B). A rede regulatória de TF-DEGs de cada estímulo individual está demonstrada na Figura 13.

4.4.1 Os TFs *EGR1*, *KLF4* e *KLF2* são nós críticos modulados pelo OSS

Entre os estímulos individuais, o OSS tem um maior efeito na desregulação de genes pertencentes a rede gênica gerada, sendo que os TFs que desempenham um papel substancial são *EGR1*, regulado positivamente e *KLF2* e *KLF4*, ambos regulados negativamente (Figura 13A). Alguns dos alvos do *EGR1* incluem os genes regulados positivamente *PTGS2*, *CCND2*, *TFPI2*, *CXCL8*, *F3*, *HPSE*, *GDF15*, *ATF3* e *IL6*, enquanto os genes regulados negativamente foram *TBXA2R*, *HYAL1*, *FGF2*, *ABCB1* (Figura 13A). No entanto, apenas *CCND2*, *TBXA2R*, *HYAL1* e *ABCB1* são diferencialmente expressos na condição OSS (Figura 12B e Figura 13D). A abordagem aqui empregada mostra de forma interessante quais genes estão sendo efetivamente regulados pelo TF investigado na condição estudada, já que apresentam diferença de expressão quando o TF está desregulado (Figura

13B). De fato, o *EGR1* além de ser o maior *hub* em nossa rede, foi recentemente identificado como o mais enriquecido em regiões de *enchancers* ativos (H3K27ac) em ECs de veias e artérias humanas submetidas a OSS¹⁹⁴, além de predito para atuar como um importante regulador de células endoteliais sob OSS¹⁹⁵.

Além disso, *KLF2* e *KLF4* são os principais reguladores da resposta anti-inflamatória e manutenção da integridade vascular, cuja repressão pode culminar em aumento da permeabilidade, formação de coágulos sanguíneos e consequente alteração do tônus vascular⁴¹. Os alvos inflamatórios do *KLF4*, *LXN*, *IL1B* e *IL6*, estão todos regulados positivamente (Figura 12A), em que apenas *LXN* é modulado por OSS. *CXCR4*, alvo pró-aterogênico do TF *KLF2*, é regulado positivamente enquanto o alvo anti-aterogênico *NOS3* é regulado negativamente, e todos são OSS dependentes (Figura 12 A-B). O gene antitrombogênico *THBD* é regulado por *KLF2* e *KLF4* (Figura 12A). Nossos dados são consistentes com um grande corpo de evidências indicando que *EGR1*, *KLF4* e *KLF2* são reguladores principais das células endoteliais sob o *shear stress*^{41,116,194}. Esses TFs aumentam a expressão de *NOS3*, reduzem o estresse oxidativo e inibem os receptores de quimiocinas como o *CXCR4*. Podemos observar com mais detalhes a rede regulatória individual do OSS na Figura 13D.

4.4.2 Comportamento emergente proliferativo e seu impacto nos estímulos inflamatórios

O nó *MYC* foi descoberto apenas na condição de estimulação combinada. Essa resposta sugere que o agrupamento de fatores de risco causa modula a expressão gênica de forma que não pode ser recapitulado pelas perturbações individuais. Os alvos de *MYC* compreendem *CCND2*, *CCNA2*, *FOXM1* e *BCL2* associados ao ciclo celular e resistência à apoptose^{180,196}, onde *CCND2* e *BCL2* são regulados positivamente e *CCNA2* e *FOXM1* são regulados negativamente (Figura 13A). Dentre eles, *BCL2*, *CCNA2* e *FOXM1* são genes emergentes (Figura 13B). Os *hubs* emergentes incluem *MYC* e *TFAP2A* mostrados em verde na Figura 13B. Os TFs *RUNX1* e *BCL6* estimulados por IL-1 β estão ambos envolvidos na promoção da angiogênese^{197,198} (Figura 13A e 1B). Entre os alvos do TF *RUNX1* estão os genes *CSF1/2* e *PIK3CD* (PI3K) envolvidos na sobrevivência celular,

crescimento celular, proliferação e resposta inflamatória^{182,183}. *CSF1/2* são ativados por IL-1 β , enquanto *PIK3CD* (regulado positivamente) é um gene emergente e um ativador bem conhecido da sinalização da via mTOR^{199,200} (Figura 13A e 13B).

É interessante notar que quando realizamos a rede regulatória TF-DEGs para cada estímulo, a maior rede foi a inflamatória estimulada por IL-1 β , onde o *NFKB1* foi principal *hub*. (Figura 13C). Anteriormente foi demonstrado que HUVEC sob LSS cultivadas simultaneamente com IL-1 β e TNF- α apresentam expressão aumentada de marcadores inflamatórios cruciais, como NF- κ B (*NFKB1*), *ICAM1*, *SELE* e *CXCL8*⁴⁷, e estes genes estão presentes em nossa comparação LSS & IL-1 β vs LSS (Figura 13C). No entanto, nem *NFKB1* e nem vários de seus alvos *BMP2*, *CXCL2*, *LCN2*, *VCAM1*, *IRF1* são diferencialmente expressos na condição agrupada. Além disso, a maioria dos genes alvo do *NFKB1* teve seu valor de expressão (*log2foldchange*) diminuído na condição agrupada quando comparada ao estímulo IL-1 β (Figura 13E).

Estes resultados sugerem que parte dos estímulos inflamatórios é suprimida na condição agrupada e dá espaço a um comportamento mais proliferativo e de sobrevivência celular às ECs. Isso é particularmente interessante porque destaca mudanças em respostas já conhecidas desses fatores de risco que só aparecem quando esses estímulos são combinados, o que provavelmente acontece em um ambiente complexo, tal como ocorre *in vivo*, onde vários fatores de risco CV coexistem.

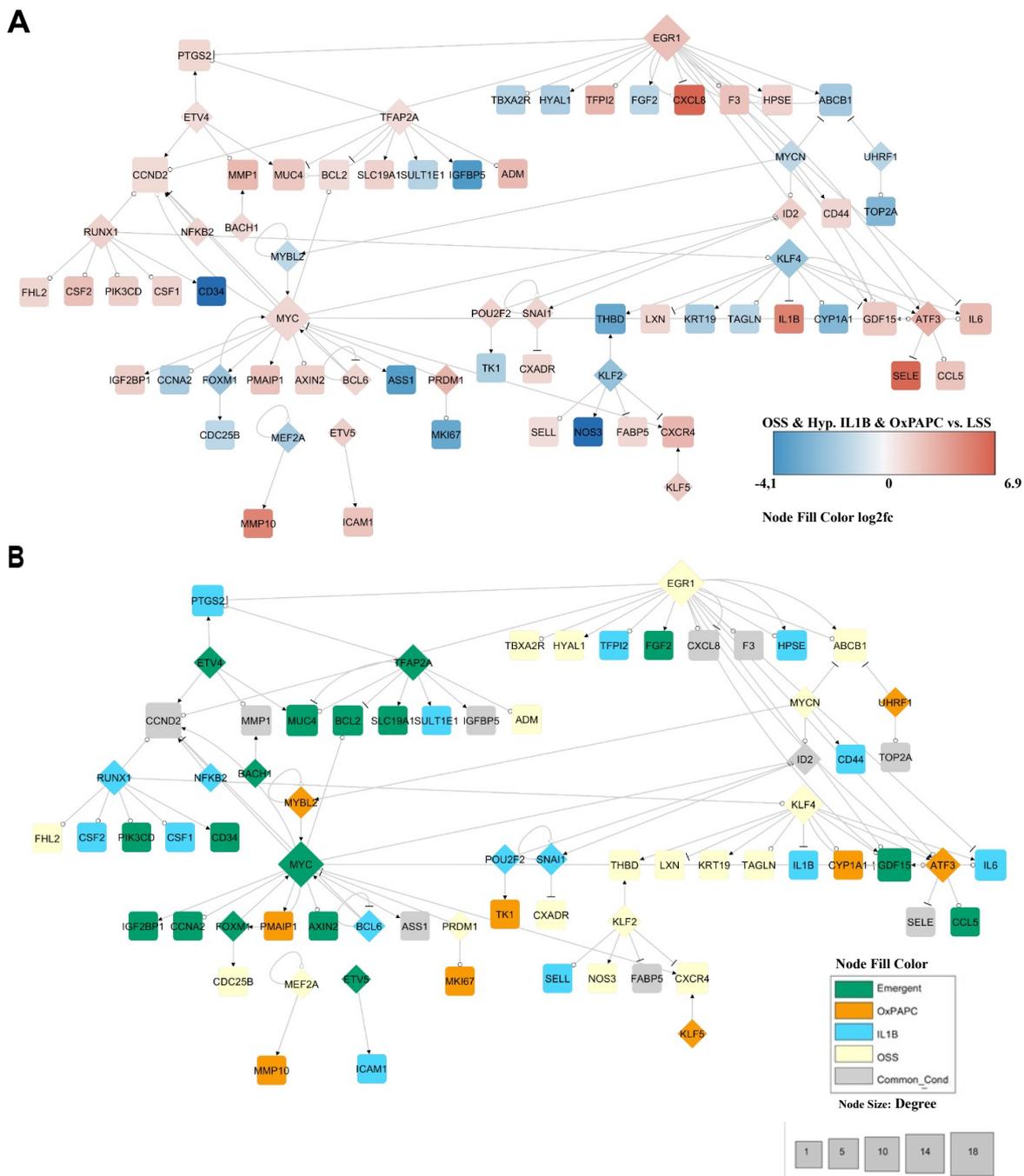


Figura 12. Rede regulatória TF-DEGs obtidas a partir da condição de estímulos combinados. **A** Usando o banco de dados TRRUST (versão 2), os TFs foram mapeados para seus alvos de transcrição previamente publicados. A rede de transcrição identificada foi filtrada adicionalmente com base em se o TF e seus alvos eram um DEG em Hyp. & OxPAPC & IL-1 β & OSS vs. LSS (valor p ajustado ≤ 0.05 e $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1,3$). O formato de diamante indica um TF, enquanto que o quadrado é o seu alvo DEG. As arestas significam: seta (ativação), círculo (desconhecido) e barra (repressão). O tamanho do nó varia de acordo com o grau. Os genes em azul são regulados para baixo, os genes em vermelho são regulados para cima. **B** Rede regulatória TF-DEGs e a condição em que também se encontram diferencialmente expressos. Verde é um gene emergente modulado; Gene modulado por OxPAPC é representado em laranja; Gene modulado por IL-1 β é representado em azul claro; Gene modulado por OSS é representado em amarelo; Quando o gene é modulado em mais de uma condição é representado em cinza.

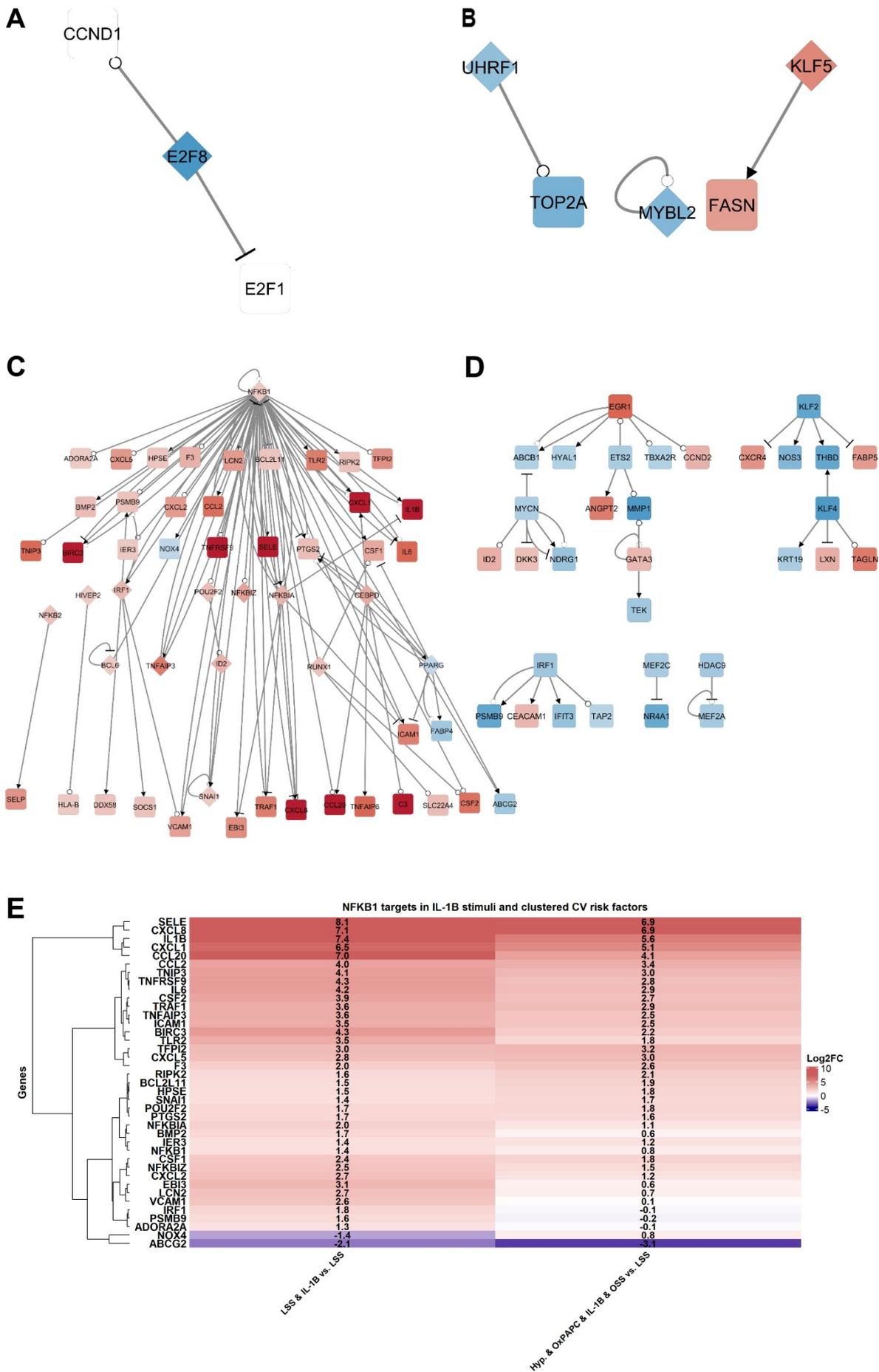


Figura 13. Rede regulatória de TF de cada estímulo. **A** rede regulatória de hipóxia vs. LSS. **B** rede regulatória OxPAPC vs. LSS. **C** rede regulatória de IL-1 β vs. LSS. **D** Rede regulatória OSS vs. LSS. Usando o banco de dados TRRUST (versão 2), TFs foram mapeados para seus alvos de transcrição previamente publicados. A rede de transcrição identificada foi filtrada adicionalmente com base em se o TF e seus alvos eram um DEG (valor p ajustado ≤ 0.05 e $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1,3$). O formato de diamante indica TF e o quadrado seu alvo DEG. As arestas significam seta (ativação), círculo (desconhecido) e barra (repressão). Tamanho do nó varia de acordo com o grau. Os genes em azul são regulados para baixo, os genes em vermelho são regulados para cima. **E** *Heatmap* de 38 DEGs alvos do TF NFKB1 e seu $\log_2\text{foldchange}$ em LSS & IL-1 β vs. LSS e OSS & Hyp. & IL1B & OxPAPC vs. LSS.

4.5 Validação dos dados de HCAEC *in vitro* usando RNASeq de célula única de placa aterosclerótica coronariana humana

Nossos dados *in vitro* indicaram que a condição de estímulos combinados é crítica para descobrir os efeitos emergentes que podem, em última instância, interromper os mecanismos compensatórios das ECs que levam aos estados de doença. Em seguida, avaliamos se esse era o caso em um ambiente de placa aterosclerótica crônica e inflamada. Nós reanalisamos os dados públicos de scRNA-seq de lesões ateroscleróticas da artéria coronária humana (GSE131778)¹³⁹. Analisamos 10.671 células e identificamos 17 agrupamentos de células (Figura 14A e 15A). Identificamos dois clusters de ECs que foram posteriormente confirmados com marcadores bem conhecidos por definir as ECs, que incluíram a expressão do marcador *PECAM1* (CD31) (Figura 15B e Tabela 2 Suplementar). Os tipos celulares de cada *cluster* foram anotados de acordo com os top 10 marcadores principais de cada um (Figura 15C).

Inicialmente nós realizamos uma análise de enriquecimento de vias usando os DEGs identificados em cada *cluster*, em que a análise na identificação desses DEGs é a comparação deste cluster contra todos os clusters restantes (em mais detalhes na seção métodos parte 3.4). Os DEGs do *cluster* EC1 (843) estavam envolvidos principalmente em vias associadas ao ribossomo, *fluid shear stress* na aterosclerose, proteoglicano no câncer e migração transendotelial de leucócitos, enquanto os DEGs do cluster EC2 (644) estavam envolvidos com cascata de coagulação, miocardite viral e diabetes mellitus tipo I (Figura 14B).

Nosso principal objetivo foi identificar como os DEGs obtidos a partir dos fatores de risco agrupados faziam parte do perfil transcriptômico que determina os *clusters* de ECs. Identificamos que 17% de nossos DEGs (103/620 DEGs)

estão dentre os genes diferencialmente expressos que definem os ECs *clusters*. Na figura 15C podemos observar os 103 DEGs e qual estímulo contribui para sua desregulação. Dentre eles, 32 genes são modulados pelo estímulo OSS, 31 genes são emergentes, seguidos por 22 genes que são diferencialmente expressos em mais de uma condição, e 13 e 5 DEGs modulados por IL-1 β e OxPAPC, respectivamente (Figura 14C). Interessantemente, no *heatmap* (Figura 15C) podemos identificar grupos de genes que ajudam a definir cada cluster. Por exemplo, *IGFBP4*, *PLVAP* e *AQP1* são menos expressos no *cluster* EC2 em comparação com EC1, enquanto *ARL15*, *GJA5* e *GJA4* são mais expressos no *cluster* EC2 em comparação ao *cluster* EC1 (Figura 14C, região central e na base do *plot*).

Em seguida, encontramos 673 DEGs ao comparar EC *cluster* 2 vs. 1 (Tabela complementar 3). Mais uma vez, cruzando este dado com nossos 620 DEGs da condição de estímulos combinados, identificamos 71 DEGs, onde 23 eram emergentes. Para entender melhor a contribuição desses 23 DEGs emergentes na placa da artéria coronária humana, nós os plotamos em cada EC *cluster* (Figura 14D e lista completa 15D). Dentre eles, identificamos *IGFBP4*, *SPHK1*, *STC2*, *TESC*, *HLA-DRB1* e *NOSTRIN* regulados positivamente em EC1 em comparação com EC2. Estes genes estão envolvidos com funções celulares muito distintas. *IGFBP4* e *STC2*, por exemplo, estão associados ao crescimento celular e absorção de glicose²⁰¹, e indução de angiogêneses²⁰², respectivamente²⁰³. Já *SPHK1* está associado com a permeabilidade endotelial²⁰⁴, enquanto *TESC* com a hipertrofia de cardiomiócitos²⁰⁵. *HLA-DRB1* está associado com disfunção endotelial em pacientes com artrite reumatoide²⁰⁶, e *NOSTRIN*, por outro lado, está associada à diminuição da atividade da eNOS²⁰⁷ (Figura 14D). *MYC* foi regulado positivamente em EC1 somente na comparação contra todos os outros clusters (Figura 15E).

Em contraste, observamos que *GJA4*, *CD58*, *TSPAN2*, *AIF1L* e *ARL15* estão regulados positivamente em EC2. *GJA4* e *CD58* estão associados com aumento da junção célula-célula e migração de leucócitos, e *ARL15* mostrou efeito protetor no endotélio, aumentando a produção de NO e diminuindo a produção de ROS²⁰³. *TSPAN2* parece desempenhar um papel na migração das ECs e SMCs²⁰⁸ e foi fortemente associado à aterosclerose em grandes

artérias²⁰⁹. No entanto, o papel do *TSPAN2* ainda precisa ser elucidado²⁰⁸. *AIF1L* está associado com o aumento do núcleo necrótico e, sendo um marcador de vulnerabilidade da placa²¹⁰.

As funções biológicas do cluster EC1 e EC2 tornam-se mais evidentes quando avaliamos os genes previamente associados à contribuição de estímulos individuais. *PLAT* e *THBD* (OSS) e *AQP1* (OxPAPC & IL-1 β & OSS) estão regulados negativamente no *cluster* EC2 em comparação com o cluster EC1 (Figura 16E), o que sugere que essas ECs são mais suscetíveis à trombose, consistente com os dados mostrados na Figura 15B. A diminuição da expressão de genes associados à junção célula-célula em EC1, como *GJA4* (emergente) e *GJA5* (OxPAPC & IL-1 β), e a expressão aumentada de *IL6* (IL-1 β), corroboram achados obtidos na análise de enriquecimento de vias, onde a via adesão e migração de leucócitos está enriquecida no cluster EC1 (Figura 14B e 15E).

Nossos dados mostram que ECs sob os fatores de risco agrupados recapitulavam parte das vias canônicas desreguladas em ambiente de placa aterosclerótica coronariana humana *in vivo* usando resolução de RNA-seq de célula única. Os 103 DEGs de nosso experimento *in vitro* sobrepostos a DEGs de ECs de placa aterosclerótica humana permitiu identificar quais vias a nossa condição simulada *in vitro* é capaz de recapitular. O cluster EC1 mais inflamado e fenótipo proliferativo propenso a aumento da migração de leucócitos, enquanto o EC2 predisposto à trombose (Figura 14E).

Este resultado sugere que o desenvolvimento de um sistema com propriedades emergentes é necessário, principalmente porque estamos perdendo informações biológicas que raramente serão atribuídas a componentes isolados. Vias e funções emergentes que podem nos ajudar a entender melhor como estes fatores de risco contribuem para a arquitetura da disfunção endotelial.

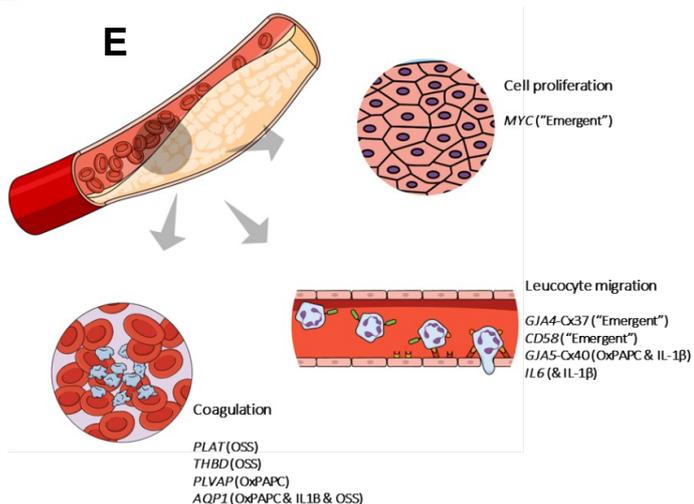
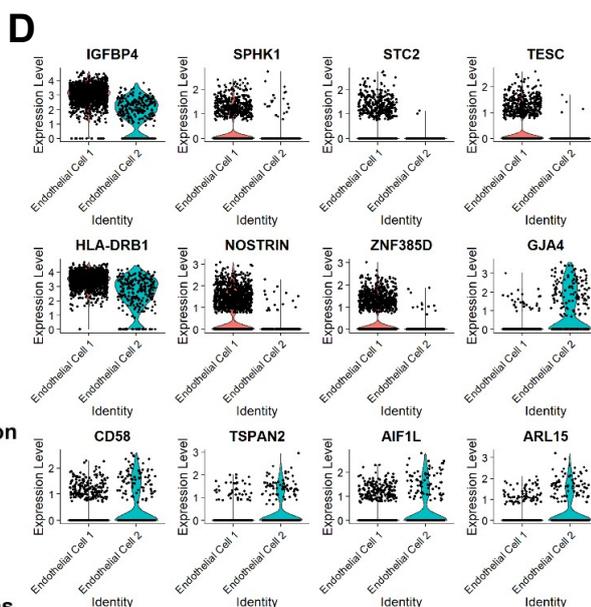
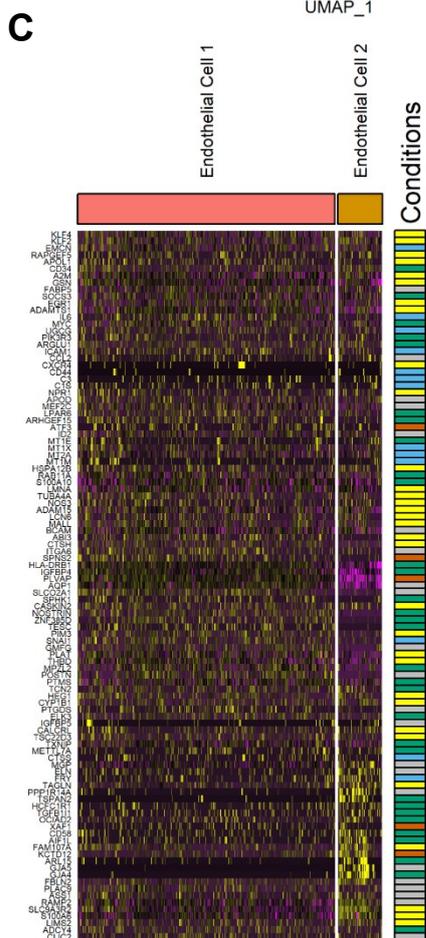
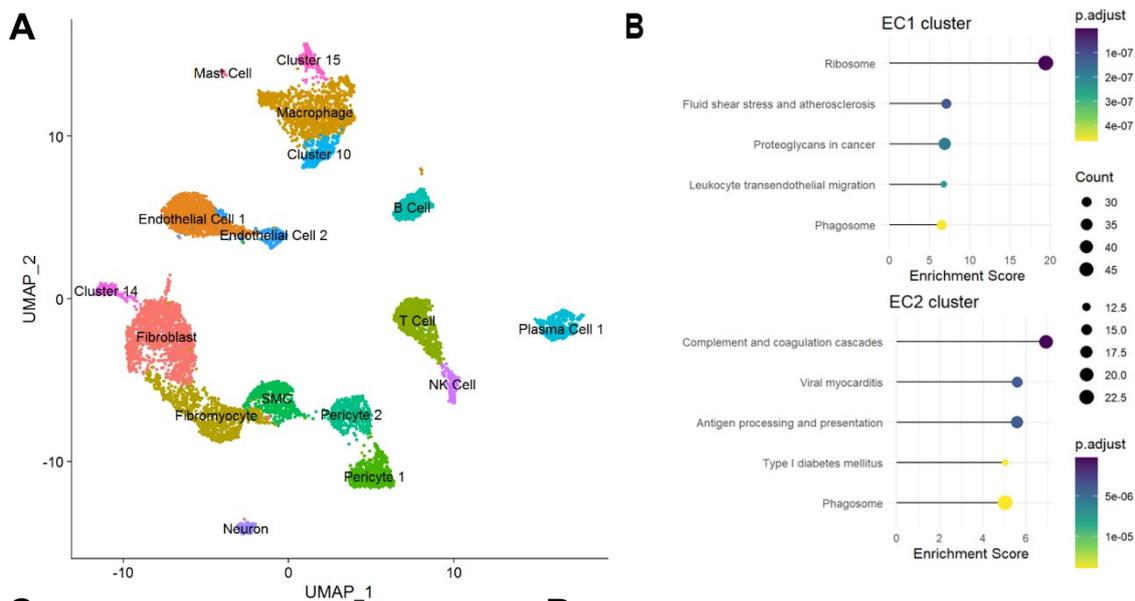
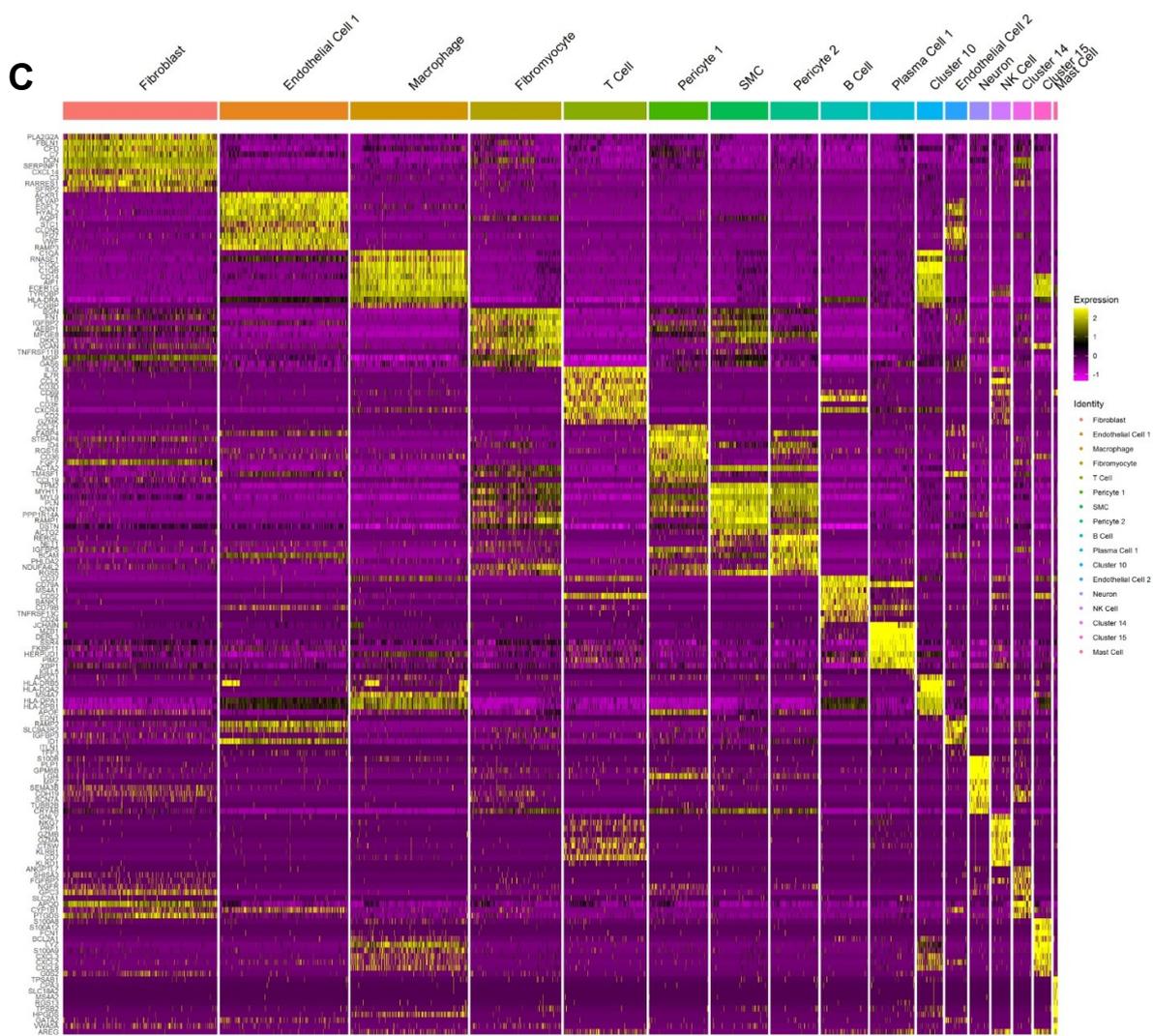
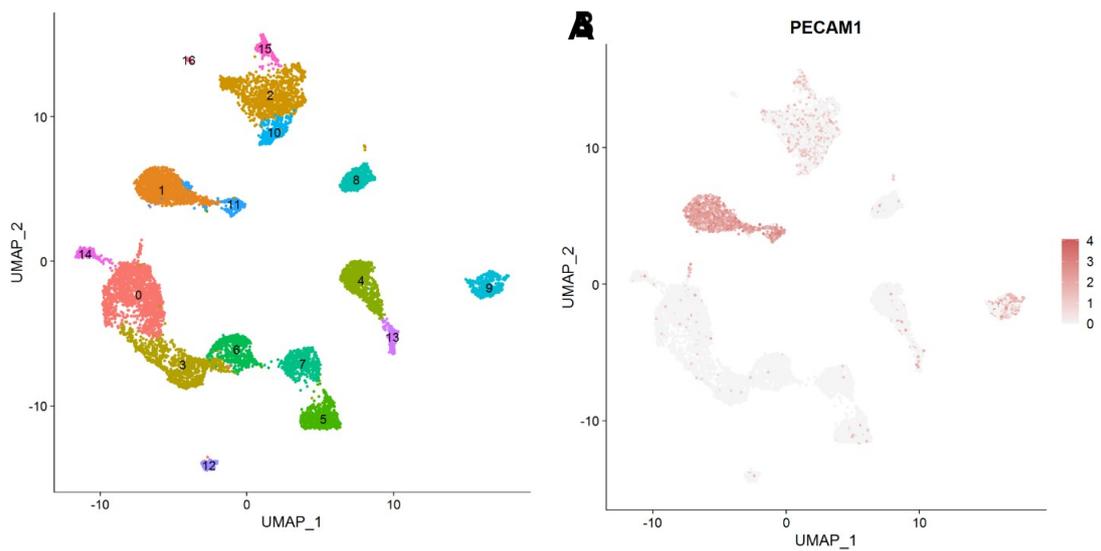


Figura 14. Validação em ECs de placa aterosclerótica da artéria coronária humana dos DEGs identificados pela combinação de fatores de risco CV. A visualização UMAP das 17 populações de células identificadas (n = 10.671 células). **B** Análise de enriquecimento dos dois clusters de ECs usando os DEGs que definem cada um. DEG foram considerados com p valor ajustado ≤ 0.05 e valor absoluto de $|\text{Log}_2\text{foldchange}| \geq 0.25$. **C** *Heatmap* dos 103 DEGs que se sobrepõem nas condições onde os fatores de risco CV estão agrupados e os DEGs que definem os *clusters* de ECs. **D** Gráfico de violino dos DEGs emergentes que são diferencialmente expressos em EC2 vs EC1. **E** Esquema ilustrando as principais vias moduladas em que os DEGs validados são recapitulados na placa aterosclerótica humana.



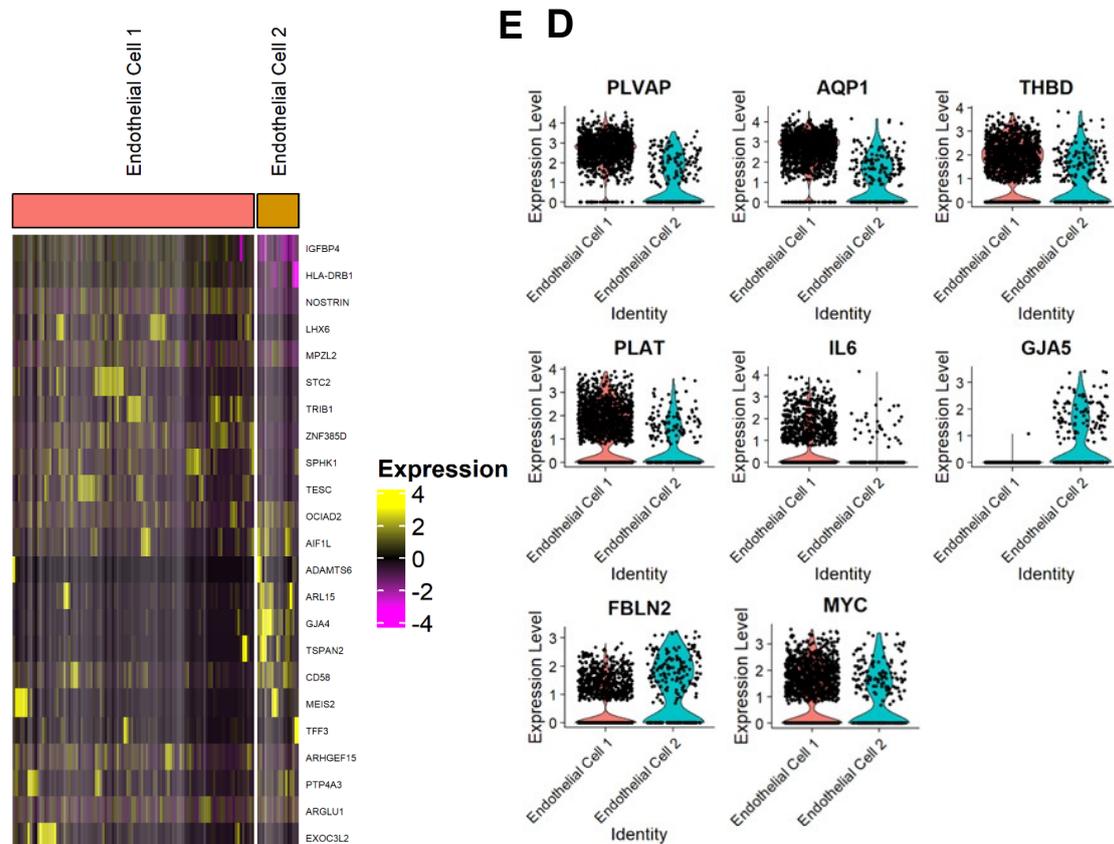


Figura 15. Identificação dos clusters celulares, seus top 10 genes que o definem, seguido da expressão dos DEGs emergentes validados. A UMAP identificou 17 populações de células ($n = 10.671$ células) usando os DEGs encontrados com a função FindAllMarkers(). DEG foram considerados com p valor ajustado ≤ 0.05 e valor absoluto de $|Log_2foldchange| \geq 0.25$. **B** Expressão de PECAM1 (CD31) identificando as ECs. **C** Heatmap com a expressão gênica dos top 10 genes para cada *cluster* celular identificado. **D** 23 DEGs emergentes e suas respectivas expressões em cada cluster de ECs. **E** Gráfico de violino de DEGs canônicos, identificados na condição com fatores de risco agrupados, que ajudam a definir as principais vias em que os *clusters* de ECs estão envolvidos.

Capítulo 2

Perturbação sistemática *in silico* de grandes redes multi-ômicas identificou novos genes candidatos para prevenir a disfunção endotelial vascular

5.1 Análise de dados públicos de ATAC-seq, ChIP-seq e RNA-seq de células endoteliais da aorta humana (HAEC) submetidas ao OSS, IL-1 β , TNF- α e OxPAPC

A fim de adicionar camadas extras de informação aos estímulos aqui estudados e criar uma rede regulatória mais robusta, e por fim dar pesos a genes que possam ter um papel de causalidade para a disfunção endotelial, nós utilizamos dados públicos obtidos com células endoteliais de artéria aorta humana (HAEC) submetidas ao fluxo laminar (LSS) e oscilatório (OSS) por 24h (GSE112340)¹⁴¹, e aos estímulos IL-1 β , TNF- α , e OxPAPC por 4h (GSE89970)¹⁴².

O desenho esquemático com as reanálises dos dados públicos, integração dos dados de ATAC-seq, ChIP-seq e RNA-seq para gerar as redes gênicas, seguido pelas perturbações *in silico* e identificação de genes alvos candidatos para a disfunção endotelial, está representado na Figura 16.

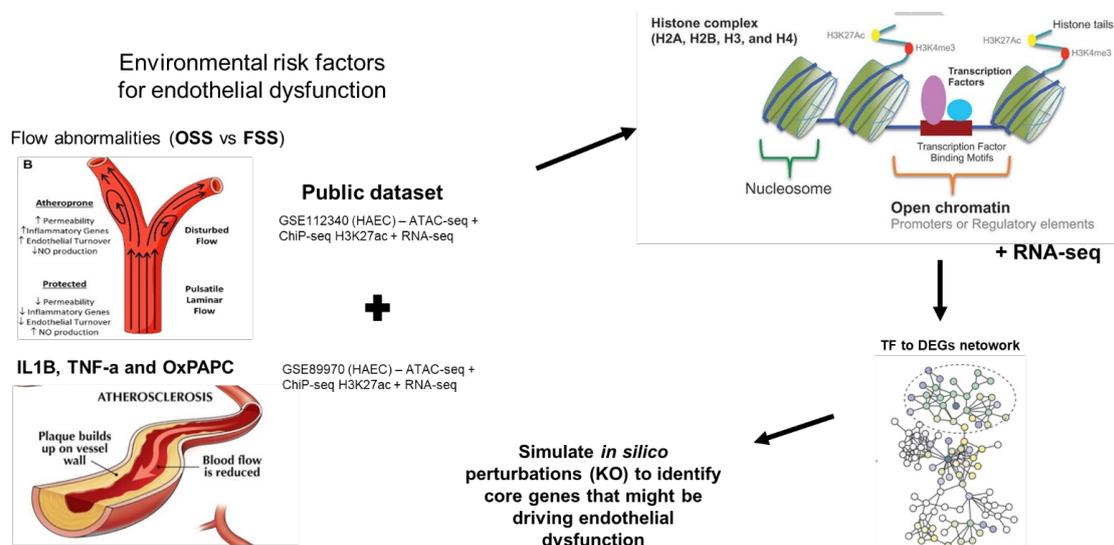


Figura 16. Análise integrativa de dados ômicos para inferir uma rede de sinalização de disfunção endotelial.

De acordo com os resultados apresentados no capítulo 1, sabemos que a somatória dos estímulos individuais não recapitula a condição em que todos os estímulos estão combinados e, conseqüentemente, qualquer padrão emergente dificilmente será recapitulado com o dado público aqui analisado. Dessa forma seguimos uma abordagem diferente e nossa hipótese é de que genes, vias ou regiões regulatórias que sejam modulados por mais de estímulo, podem ser ótimos alvos terapêuticos, já que independente do estímulo, o alvo

(um gene, uma proteína ou uma via) estará sempre modulado em alguma das condições patológicas para o endotélio.

Assim, inicialmente identificamos as regiões de cromatina aberta (ATAC-seq) quando as HAEC foram submetidas aos estímulos IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α , e selecionamos apenas as regiões de cromatina aberta comum a todas as condições. Usando essa abordagem, identificamos 17.483 regiões em todo o genoma (Figura 17A). Em seguida, a fim de selecionar somente as regiões de cromatina abertas que possivelmente estão ativas transcricionalmente, utilizamos o dado de ChIP-seq e identificamos as regiões de *enhancers* ativos dos estímulos individuais e as regiões em comum entre eles, obtendo um total de 14.149 regiões (Figura 17B). Em seguida, nós realizamos a sobreposição dos dados de ChIP-seq com os dados de ATAC-seq e identificamos 6630 regiões de cromatina aberta com maiores chances de estarem ativas transcricionalmente (Figura 17C).

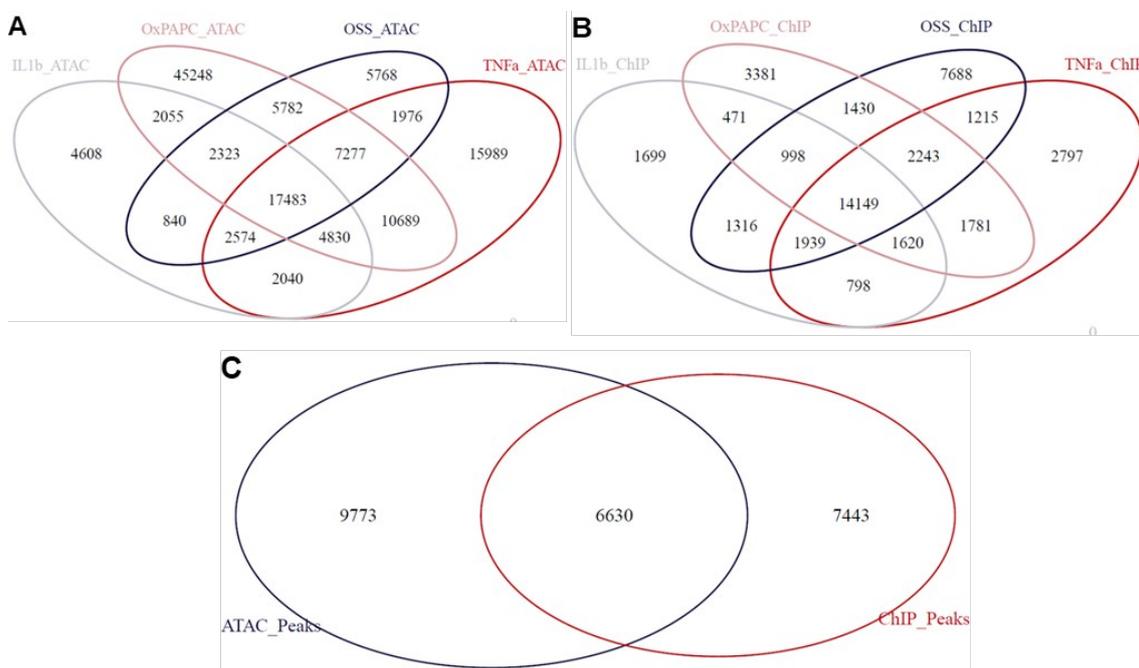


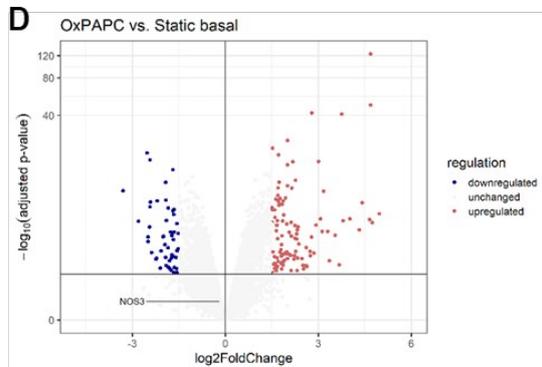
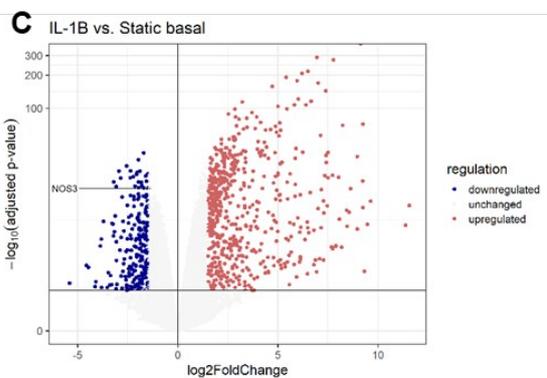
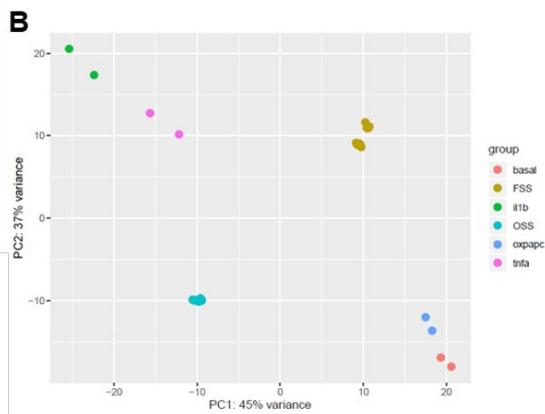
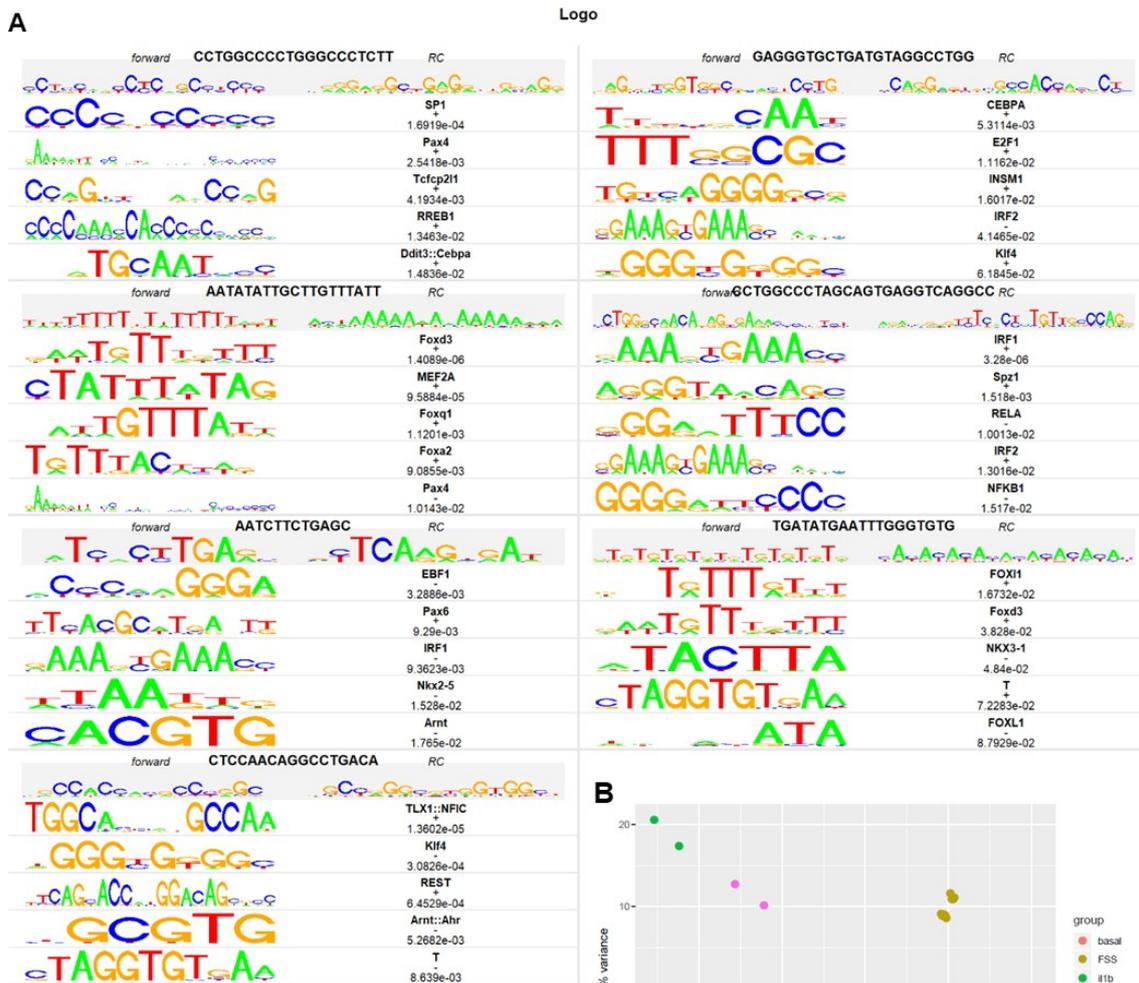
Figura 17. Sobreposição de regiões de cromatina aberta e *enhancers* ativos entre os estímulos IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α . **A** diagrama de Venn dos picos ATAC-seq. **B** diagrama de Venn dos picos ChIP-seq. **C** diagrama de Venn dos picos sobrepostos de ATAC-seq e ChIP-seq

5.2 TFs enriquecidos em regiões regulatórias comuns aos estímulos IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α e integração com o dado de RNA-seq

Para gerar as redes gênicas regulatórias, nós realizamos o enriquecimento de TFs nas 6630 regiões regulatórias em comum a todos os estímulos. A análise *de novo motifs*, utilizando o banco de dados JASPAR, identificou 7 *motifs* e foi capaz de prever a ligação de 29 TFs, dentre eles os mais significativos são: Foxd3, IRF1, EBF1, TLX1::NFIC, SP1, FOXI1 e CEBPA (Figura 18A). Os TFs no topo de cada grupo são os mais significativos estatisticamente e com maior probabilidade de se ligarem aos *motifs* identificados (sequência abaixo do RC - do inglês *reverse complement*) (Figura 18A).

Estes TFs são associados com regulação e modulação de uma grande quantidade de genes. Dentre alguns deles temos o IRF1, associado com resposta inflamatória e regulação de interferon²¹¹; o EBF1, que está associado no desenvolvimento de podócitos e envolve a regulação de VEGF-A (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor A*), direcionando a migração de ECs para formar capilares nos glomérulos em desenvolvimento²¹²; o SP1, que participa de uma grande quantidade de vias, como diferenciação celular, crescimento celular, apoptose, respostas imunes, resposta a danos no DNA e remodelação da cromatina^{213,214}. A grande capacidade de modular centenas a milhares de genes e se envolver com diferentes vias e processos os caracterizam como genes *masters*²¹⁵.

Em relação ao dado de RNA-seq, após correção de *batch effects*, realizamos análise de PCA, de forma semelhante à realizada nos dados apresentados no capítulo 1. A análise de PCA conseguiu explicar 82% da variação destes dados com apenas duas componentes, 45% com a PC1 e 37% com a PC2. Quatro grupos distintos foram agrupados: o grupo LSS; o grupo controle estático juntamente com HAECs estimuladas com OxPAPC; o grupo OSS; e finalmente, o grupo formado por IL-1 β e TNF- α (Figura 18B).



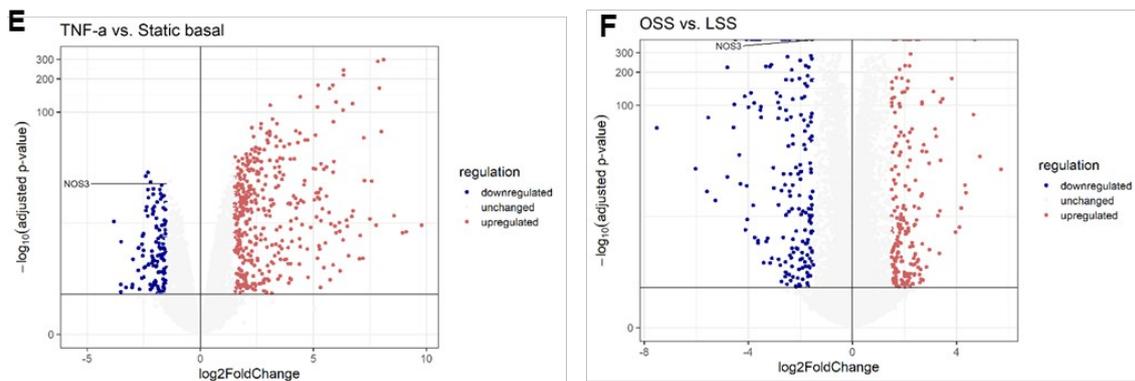


Figure 18. Motifs enriquecidos nas regiões regulatórias comuns IL-1 β , OxPAPC, OSS e TNF- α e análise integrada com o dado de RNA-seq. A TFs enriquecidos e suas sequências *motifs* seguidos pelo p-valores da análise de enriquecimento. **B** PCA do perfil de expressão gênica de cada amostra mostrou que o PC1 explicou 45% da variação enquanto o PC2 37%. **C-F** Volcano plot mostrando os DEGs ao comparar cada estímulo com seu controle basal. Os DEGs foram considerados como valor de p ajustado <0.05 e $|Log2foldchange| > 1.5$ destacando a expressão do NOS3. Genes em azul estão com a expressão diminuída e em vermelho com a expressão aumentada.

Com a identificação das 6630 regiões regulatórias comuns aos estímulos investigados, e aos TFs enriquecidos nessas regiões, nós utilizamos o dado de RNA-seq para identificar quais genes diferencialmente expressos estão localizados nessas regiões. A análise de expressão diferencial foi feita com os respectivos controles dentro de cada *dataset*. Para o dado (GSE112340), nós comparamos OSS vs. LSS. Já para o dado (GSE89970), nós comparamos os tratamentos IL-1 β , TNF- α e OxPAPC com o controle basal estático. Os dados de RNA-seq para cada condição revelaram 928 (IL-1 β), 186 (OxPAPC), 594 (TNF- α), e 578 (OSS) DEGs (Figura 19 C-F). Dentre os DEGs identificados acima, 84 estavam presentes nas 6630 regiões regulatórias. Já dentre os 29 TFs enriquecidos nas 6630 regiões regulatórias, encontramos evidências, utilizando o banco de dados TRRUST, de que 17 deles estavam associados à regulação destes 84 DEGs.

5.3 In silico KO nas redes TF-DEGs regulatórias identificou 17 possíveis alvos terapêuticos para a disfunção endotelial

As redes de PPI foram construídas com os 17 TFs (enriquecidos nos motivos) e 84 DEGs, totalizando 101 genes (genes *seeds* - em mais detalhes na seção métodos 3.8). Aplicando o algoritmo RWR⁸⁰ foi gerado uma rede com 2068 nós. O diferencial dessa abordagem foi o cálculo do peso das arestas baseado na similaridade semântica de vários bancos de dados como Intact¹⁵², Signor¹⁵³, PhosphoSitePlus¹⁵⁴ e OmniPath¹⁵⁵, aumentando assim as chances do

algoritmo RWR de “andar” pela rede conectando os genes com maior afinidade funcional. Foi identificado 270 genes com alto RWR score a partir da rede de 2068 nós, onde os 101 genes estavam inclusos. Nós simulamos o KO *in silico* destes 270 genes para identificar quais genes são relevantes para a rede e, conseqüentemente, para disfunção endotelial.

A fim de visualizar parte da rede original composta de 2068 nós e extrair informações relevantes da interação destes genes, geramos uma rede reduzida com os 101 TF-DEGs e suas principais interações (Figura 19A). A rede foi organizada do núcleo à membrana com 395 nós e 679 interações, que incluem moléculas pequenas já desenvolvidas para alguns alvos e se já são utilizadas para tratar doenças (Figura 19A). É interessante observar que a maioria dessas moléculas tem como alvos genes presentes na membrana ou na região extracelular (Figura 19A). Além disso, em mais detalhes (Figura 19B), observamos genes já conhecidos por estarem associados à disfunção endotelial, tais como *ANGPT2*, *VCAM1* e *CXCR4*, que apresentaram expressão aumentada, e o gene *THBD*, com expressão diminuída. Da mesma forma, podemos observar que o gene *RIPK2* é alvo de duas moléculas, apesar de não ser utilizado como alvo terapêutico para nenhuma doença, enquanto que o gene *CXCR4* é alvo de cinco moléculas e é alvo terapêutico para tratar cânceres em geral. Assim, essa rede regulatória TF-DEGs integrada também as doenças e pequenas moléculas que agem sob alguns dos genes identificados, nos auxiliando identificar novos alvos terapêuticos ou reposicionar drogas já utilizadas para genes associados à disfunção endotelial ou aterosclerose.

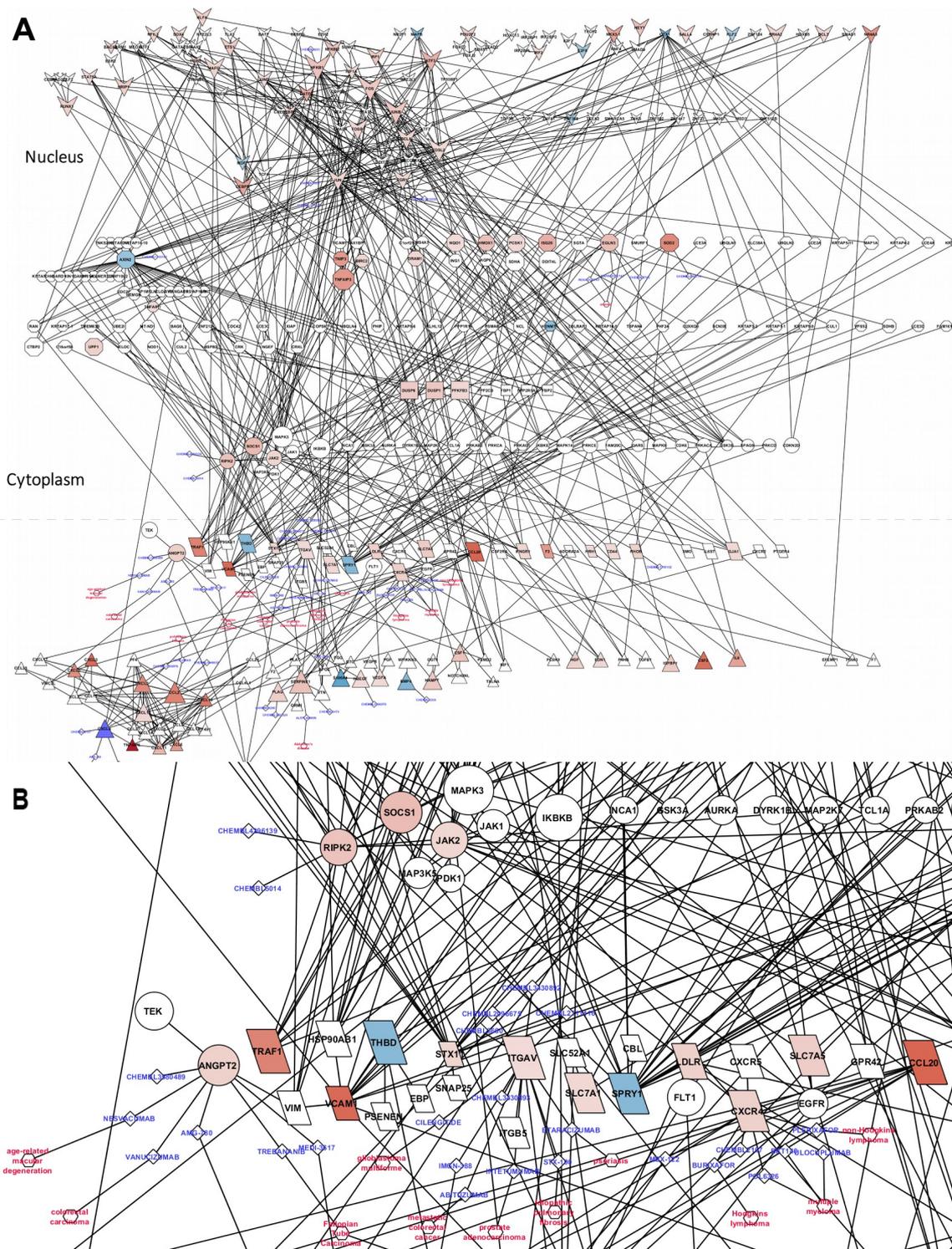


Figura 19. 101 TF-DEGs rede regulatória reduzida com a presença de moléculas e doenças. A TF-DEGs com 395 nós com 679 interações. Formato V são TFs; hexágonos com proteínas com outras funções (checar métodos 3.8); quadrados com fosfatases; círculos com quinases; paralelogramo com proteínas de membrana; e triângulo com proteínas secretadas. Diamante com letras azuis para moléculas pequenas identificadas no OpenTarget e ChEMBL banco de dados; hexágono com letras vermelhas alvos para doenças já conhecidas. **B** TF-DEGs ampliada na região das proteínas de membrana

Após os KO *in silico*, nós priorizamos os alvos comparando as 270 novas redes com a rede original (uma rede de cada vez) utilizando as métricas estatísticas, divergência de Jensen-Shannon, Z score e RWR score (detalhes em métodos 3.8). Surpreendentemente, o gene *RIPK2* teve um score de 1 para o Jensen-Shannon score, sendo que o segundo gene com maior score foi o gene *DDIT4L* com score igual a 0.002224, indicando que a rede gerada sem *RIPK2* é totalmente diferente da rede original, onde ela foi praticamente “destruída”, caindo de 2086 nós para 750 nós. Este é um DEG presente nas HCAECs com todos os estímulos e está enriquecido entre as principais vias inflamatórias, como descrito no capítulo 1 (Figura 11C).

Além disso, utilizando o DisGeNet score para identificar genes já previamente associados a doenças cardiovasculares como aterosclerose, nós removemos genes que já eram alvos terapêuticos para doenças cardiovasculares. Combinando todas estas variáveis e considerando se o gene é diferencialmente expresso ou não, nós selecionamos 17 moléculas candidatas para validação, onde seus genes alvos estão descritos na Tabela 4. Para mais detalhes sobre a seleção das moléculas, checar métodos 3.9.

Dentre os 17 genes alvos para as moléculas selecionadas, temos o *RIPK2*, *RUNX1*, *UGCG*, *CXCR4*, *PTGS2*, *CXCL8*, *F3*, *IL6* e *CCL2* que também são DEGs que tiveram expressão aumentada na condição com a presença dos estímulos combinados nas HCAECs quando comparado ao LSS sozinho (capítulo 1, Figura 11C). Interessantemente, nenhum destes genes pertencem ao grupo dos genes emergentes, o que corrobora com nossa hipótese no capítulo 1 de que mesmo integrando as partes individuais de um sistema complexo não somos capazes de identificar os efeitos emergentes quando estas partes individuais são combinadas.

Tabela 4. Genes alvos selecionados após as perturbações *in silico* nas redes TF-DEGs

Gene ID	Disease	IC50 (nM)	Log2 Fold Change				
			OSS&CoCl2 & OxPAPC&IL- 1 β (HCAEC)	OSS (HAEC)	TNF α (HAEC)	IL1B (HAEC)	OxPAP C (HAEC)
RIPK2	NA	4.6	2.06	-	2.69	3.22	-
JUN	NA	6.9	-	-	-	-	1.76
STAT5A	NA	5	-	-	1.77	1.59	-
NQO1	Friedreich ataxia	2.6	-	-	-	-	1.52
CXCL12	NA	25	-	1.87	-	-	-
ITGAV	metastatic colorectal cancer	0.13	-	-	-	1.68	-
RUNX1	NA	257	1.82	-	-	2.1	-
UGCG	Gaucher disease	2	1.90	-	-	1.99	-
CXCR4	multiple myeloma	5	3.09	2.19	-	-	-
DUSP1	NA	460	-	-	-	2.46	2.86
NAMPT	NA	0.3	-	-	-	2.58	-
PTGS2	injury	1	1.62	-	3.97	7.16	3.67
CXCL8	chronic bronchitis	8	6.92	3.22	5.34	7.17	3.54
F3	NA	0.94	2.56	-	5.24	7.28	3.35
IL6	rheumatoid arthritis	4.2	2.87	-	2.97	6.61	-
CCL2	cutulmonar fibrosis	0.23	3.43	-	6.32	6.67	-
EGLN3	anemia	450	-	4.7	-	-	1.65

Genes em vermelho foram validados no *microarray* de expressão gênica das HACEC descrito nos resultados do capítulo 1. DEGs sempre comparados com seus controles basais sem estímulo (métodos 3.6).

5.4 High content screening (HCS) baseado em imagens identificou alvos terapêuticos promissores para a disfunção endotelial

Para validar nossos resultados realizamos um ensaio de HCS utilizando 17 compostos antagonistas ou inibidores para os 17 genes candidatos (Tabela 4), obtidos comercialmente. O fluxo de experimentos e análises está descrito na Figura 20A. Como as análises integrativas foram realizadas utilizando HAEC, nós seguimos com o mesmo modelo celular, mas submetendo as aos estímulos de forma combinada com IL-1 β (10ng/mL) e OxPAPC (50 μ g/mL) na condição estática. Como observado na tabela 4, todos os genes alvos modulado por TNF- α também foram modulados por IL-1 β , nos levando utilizar somente uma única citocina pró-inflamatória. Também não realizamos o experimento sob OSS devido a limitação da plataforma IBIDI para *screening* com muitas moléculas. Nós quantificamos marcadores críticos para disfunção endotelial, como a presença de ROS, expressão de ICAM1 e de VE-caderina.

Inicialmente, fizemos um teste de viabilidade celular para os compostos analisando duas concentrações (10⁻⁰⁶M e 10⁻⁰⁸M), sendo uma dose mais alta para aumentarmos a chance de inibição do alvo (1 μ M - 10⁻⁰⁶) e uma dose 100x menor a fim de atingir concentrações mais próximas a presentes na corrente sanguínea (0.01 μ M - 10⁻⁰⁸M). Nenhuma das doses foi citotóxica, como observamos na Figura 20B. Apesar de o inibidor de EGLN3 na concentração de 10⁻⁰⁶M promover uma porcentagem maior de células mortas, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada quando comparamos ao controle com ou sem DMSO. Além disso, nem a concentração de DMSO utilizada para diluir as moléculas foi citotóxica quando comparada às células cultivadas em *starving* por 24h (Figura 20B-C).

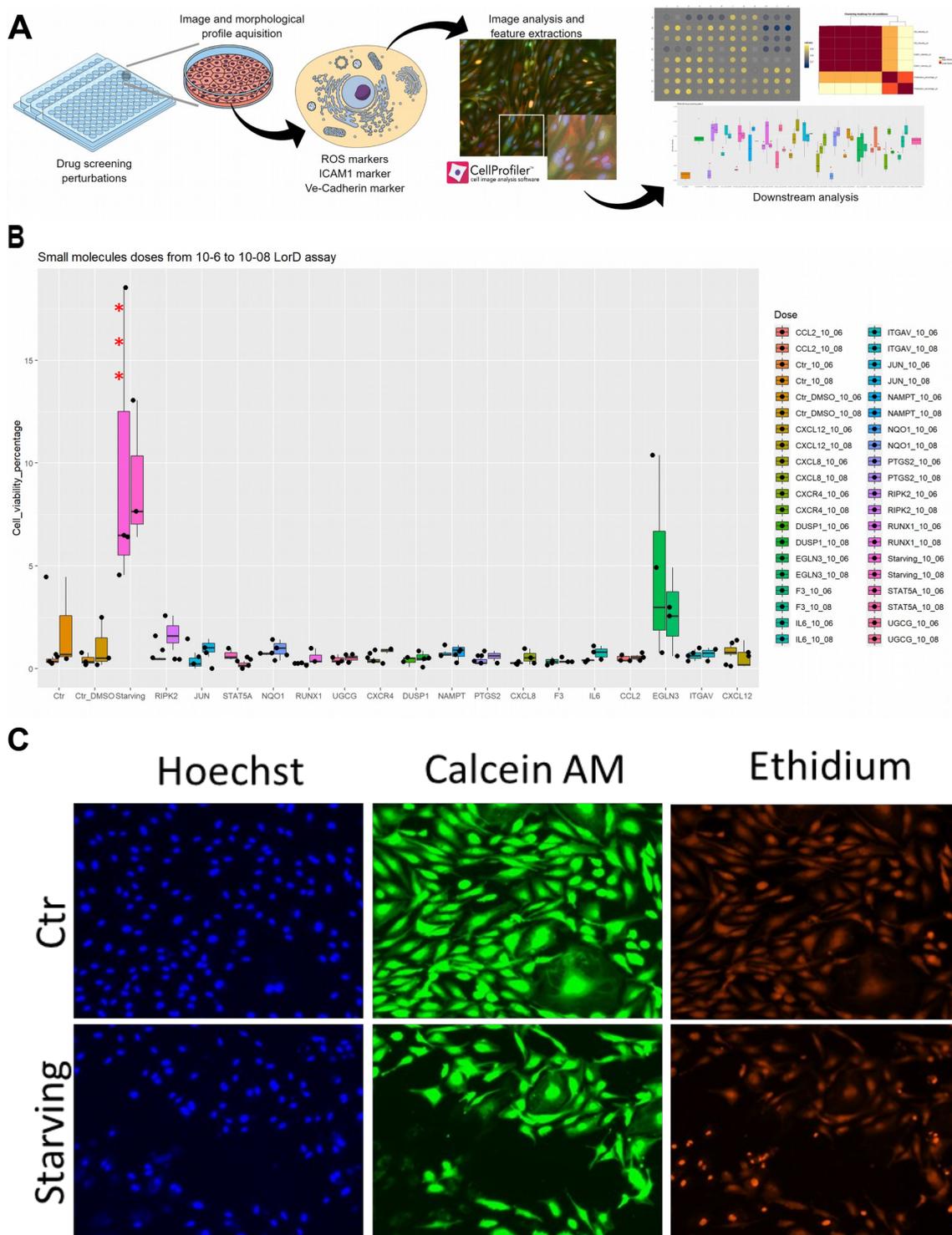


Figura 20. Fluxograma do HCS e viabilidade celular. **A** O ensaio de HCS foi realizado em placas de 96 *wells*. As HAECs foram pré-tratadas por 2h com as moléculas, e em seguida IL-1 β (10ng/mL) e OxPAPC (50 μ g/mL) foram adicionados por 48h. Após esse período quantificamos por meio de reações de fluorescência ROS, ICAM1 e VE-Caderina. 9 fotos por *well* foram tiradas com uma objetiva de 10x. Imagens foram analisadas no programa CellProfiler. Depois seguimos com as análises sempre comparando cada dose ao grupo tratado com IL-1 β e OxPAPC. **B** Ensaio de viabilidade celular com duas doses por alvo 10⁻⁶M e 10⁻⁸M (***) P < 0.001 Starving vs. todos os outros grupos, n = 3) Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Wilcoxon para múltiplas comparações. **C** Imagem de fluorescência mostrando células vivas (calceína-verde), enquanto que o etídio (vermelho) para células mortas com maior intensidade no núcleo. Núcleo marcado em azul (Hoechst).

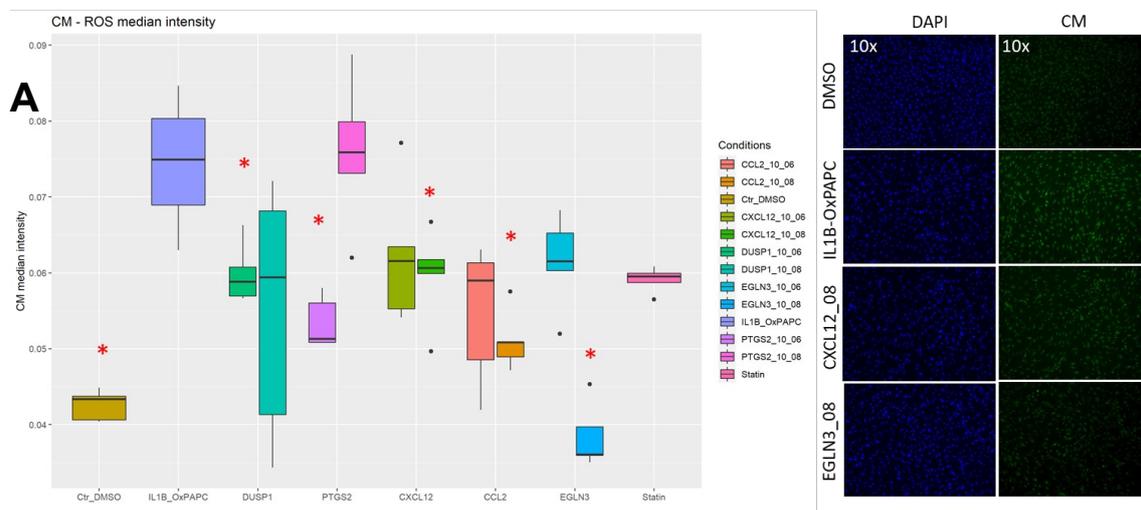
No presente *screening* utilizamos a droga atorvastatina (5 μ M) como modelo comparativo às nossas moléculas, já que é uma droga amplamente utilizada para doenças cardiovasculares e, portanto, um ótimo comparativo para os *readouts* de disfunção endotelial aqui investigados. Estatinas são inibidores farmacológicos de hidroximetilglutaril-coenzima A redutase e são utilizadas como primeira linha para tratar hipercolesterolemia e CVDs²¹⁶. As estatinas possuem ações de proteção cardiovascular que incluem a melhora da função endotelial; estabilização de placas vulneráveis; e efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitrombóticos²¹⁷.

Em relação a produção de ROS, das 17 moléculas testadas, as que inibiram DUSP1, PTGS2, CXCL12, CCL2 e EGLN3 diminuíram significativamente a produção de ROS nas HAECs sob estímulo de IL-1 β e OxPAPC. (Figura 21A). As estatinas também reduziram a produção de ROS quando comparadas ao estímulo combinado de IL-1 β e OxPAPC. A inibição de DUSP1 e PTGS2 apresentaram esse efeito nas doses 10⁻⁰⁶, enquanto que os inibidores de CXCL12, CCL2, EGLN3 nas doses mais baixas 10⁻⁰⁸ (Figura 21A). O inibidor de EGLN3 foi o que apresentou a resposta mais significativa na supressão de ROS.

Na avaliação do marcador inflamatório ICAM1, observamos que a inibição de CXCR4, NAMPT, DUSP1, CXCL12, EGLN3 e ITGAV diminuiu a intensidade de ICAM1 na membrana (*edge*) em comparação as HAECs tratadas somente com IL-1 β e OxPAPC (Figura 21B). É interessante notar que novamente DUSP1, CXCL12 e EGLN3, quando inibidas, estão modulando outro marcador importante para a disfunção endotelial. A intensidade de ICAM1 não foi estatisticamente significativa para as HAECs tratadas com estatinas em comparação ao grupo IL-1 β e OxPAPC. Exceto por ITGAV, todas as outras moléculas reduziram a intensidade do marcador ICAM1 na membrana celular nas duas doses (Figura 21B).

Para o marcador de permeabilidade celular VE-caderina, nós fizemos duas análises, uma de intensidade da borda (*edge*) e outra com relação a razão da intensidade da borda/intensidade do citoplasma (detalhes nos métodos 3.11). A intensidade da borda de VE-caderina não é significativamente diferente entre HAECs tratadas com DMSO e tratadas com IL-1 β e OxPAPC (Figura 22C *boxplot* abaixo), no entanto, observamos que existe uma diferença

da translocação de VE-caderina do citoplasma para a membrana nessa comparação (Figura 22C *boxplot* acima). Com relação a intensidade de VE-caderina na borda, a inibição de JUN, STAT5A, NQO1, UGCG, IL6 e EGLN3 resultou no aumento da intensidade de VE-caderina na borda quando comparados ao grupo tratado IL-1 β e OxPAPC (Figura 22C *boxplot* abaixo). Já relacionado a translocação da proteína para a membrana, a inibição de STAT5A, NQO1, UGCG e PTGS2 possibilitou a reversão da localização da VE-caderina para a membrana, quando comparada ao grupo tratado com IL-1 β e OxPAPC (Figura 22C acima). Interessantemente, HAECs tratadas com estatinas foi o grupo que VE-caderina estava mais expressa no citoplasma. STAT5A e NQO1, inibidas nas doses de 10^{-08} , e UGCG, na dose de 10^{-06} , não só translocam a proteína para a membrana como aumentam a intensidade dela na borda (Figura 22C). Já PTGS2 somente transloca a proteína para a borda na dose de 10^{-06} , enquanto que JUN, IL6 e EGLN3 aumentam sua intensidade na borda nas doses 10^{-08} .



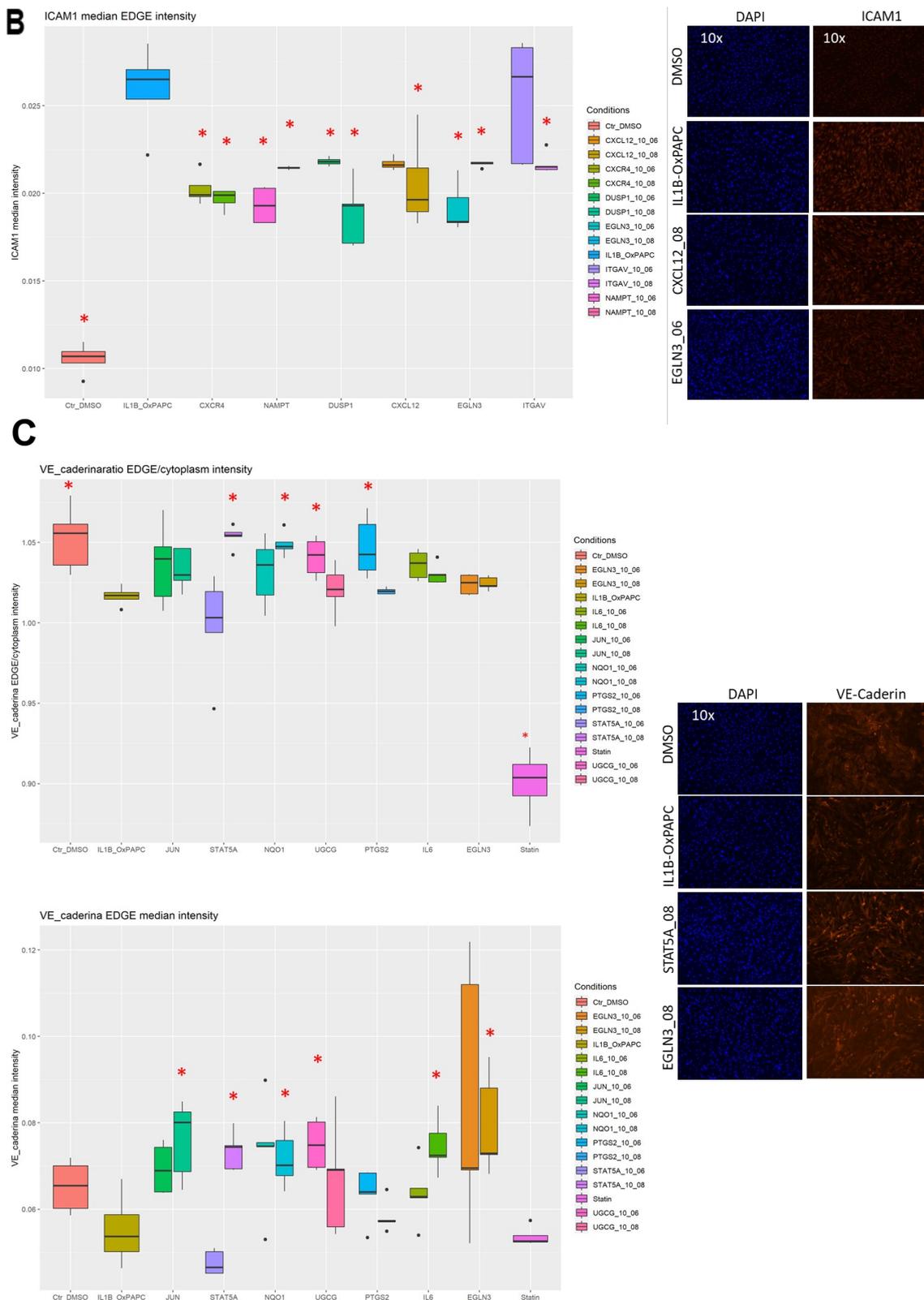


Figura 21. Quantificação de marcadores de disfunção endotelial quando modulados por moléculas pequenas. A inibição de DUSP1, PTGS2, CXCL12, CCL2 e EGLN3 diminuem a produção de ROS quando tratadas com tratadas IL-1 β e OxPAPC, com imagem de fluorescência do controle DMSO, com IL-1 β e OxPAPC, CXCL12 e EGLN3. Núcleos, em azul, marcados em DAPI, e ROS marcado em verde com a sonda fluorescente (488) CM-H₂DCFDA. **B** inibição de CXCR4, NAMPT1, DUSP1, CXCL12, EGLN3 e ITGAV diminuem a intensidade de

ICAM1 em HAECs quando tratadas com IL-1 β e OxPAPC, com imagem de fluorescência do controle DMSO, com IL-1 β e OxPAPC, CXCL12 e EGLN3. Núcleos, em azul, marcados em DAPI e ICAM1 marcado em vermelho (Alexa Fluor 555). C inibição de JUN, STAT5A, NQO1, UGCG, PTGS2, IL6 e EGLN3 modulam a translocação ou intensidade de Ve-caderina na membrana de HAECs quando tratadas com IL-1 β e OxPAPC, com imagem de fluorescência do controle DMSO, com IL-1 β e OxPAPC, STAT5A e EGLN3. Núcleos, em azul, marcados com DAPI e Ve-caderina marcado em laranja (Alexa Fluor 647). A significância apresentada é sempre da comparação de todos os grupos vs. HAECs tratadas somente com IL-1 β e OxPAPC. (* P <0.05, n=5). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Wilcoxon para múltiplas comparações.

Com uma abordagem de biologia de sistemas, este trabalho mostrou que a integração de diferentes *datasets* para gerar grandes redes gênicas regulatórias associadas a drogas e doenças pode nos ajudar a identificar alvos relevantes para um fenótipo ou uma doença. Nossos resultados validaram alguns desses alvos identificados a partir de um *screening* prévio *in silico*. A quantificação de marcadores chaves de disfunção endotelial quando estes alvos eram modulados, nos ajudou a identificar quais destes se mostraram promissores para melhorar a função do endotélio. Por exemplo, um dos candidatos mais interessantes, o EGLN3, quando inibido em HAECs tratadas com IL-1 β e OxPAPC, mostrou atividade antioxidante e anti-inflamatória suprimindo a produção de ROS e intensidade de ICAM1, além de diminuir a permeabilidade celular com aumento da produção de VE-caderina na membrana. Além disso, diversos alvos que compõem vias inflamatórias, como CXCL12, CXCR4, CCL2, STAT5A e IL6, modularam alguns *readouts* de disfunção endotelial investigados aqui. Dentre as proteínas inibidas, as únicas que apresentaram atividade anti-inflamatória foram CXCL12 e CXCR4. Além disso, a inibição de CXCL12 foi capaz de provocar a diminuição da produção de ROS.

A proteína EGLN3 (do inglês *Prolyl hydroxylase Egl nine homolog 3*), também conhecida como PHD3, HPH1, e SM-20, atua na hidroxilação de resíduos de prolina em proteínas alvo, como PKM, TELO2, ATF4 e HIF-1 α ^{73,218,219}. Inibidores de PHD (PHD1/2/3) estabilizam HIF-1 α inibindo sua degradação²²⁰. Chega ser contra intuitivo, já que a ativação de HIF-1 α está associado à disfunção endotelial e formação de placas ateroscleróticas²²¹, mas tem sido mostrado que o acúmulo da proteína HIF-1 α no cérebro via inibição de PHD tem sido eficaz para acidente vascular cerebral isquêmico devido às suas propriedades antioxidantes²²² e anti-inflamatórias²²³, como observado neste estudo com redução da produção de ROS e ICAM1. Os inibidores de

PHD apenas bloqueiam a hidroxilação de HIF-1 α e, portanto, somente fornecem um efeito parcial no acúmulo de HIF-1 α ²²⁴, onde é importante enfatizar que a inibição da hidroxilase de HIF-1 α não significa ativação do mesmo^{225,226}.

Embora, como descrito acima, a alta expressão de HIF-1 α tenha efeitos tipicamente adversos no desenvolvimento da aterosclerose, foi mostrado que a terapia com inibidor de PHD2, FG-4497, resultou na diminuição de placas ateroscleróticas, taxas de colesterol sérico e redução do número de agregados de macrófagos em camundongos⁷⁶. Também foi mostrado redução de lesões causadas por isquemia-reperfusão (I/R) miocárdica com a depleção de PHD^{227,228}. Lesões causadas por I/R estão associadas a quantidades elevadas de ROS no coração reduzindo a estabilidade de HIF-1 α ²²⁹. O uso de inibidores de PHD em doenças cardiovasculares ainda está em nível de animais, mas o uso terapêutico de inibidores de PHD já está avançado em ensaios clínicos em fase final^{220,230} no tratamento de anemia associada a doenças crônicas²²⁰. O que permite chances potenciais de reposicionamento desse fármaco para CVDs.

CXCL12 (do inglês *C-X-C motif chemokine 12*) liga-se ao receptor CXCR4 (do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4*)²³¹ e CXCR7 (do inglês *C-X-C chemokine receptor type 7*)²³² induzindo vias de sinalização com amplos efeitos na quimiotaxia, proliferação celular, migração e expressão gênica²³³. CXCR4 parece ter um efeito protetor para a disfunção endotelial e aterosclerose. Por exemplo, CXCR4 promoveu a reendotelização após a desnudação endotelial durante a formação da neointima²³⁴. A deleção de CXCR4 em ECs aumentou significativamente a formação de lesões ateroscleróticas em camundongos hiperlipidêmicos, além do comprometer a barreira endotelial desestabilizando complexos juncionais com VE-caderina²³⁵. No entanto, não se observou este efeito protetor quando foi realizado a deleção de CXCL12 em ECs. Pelo contrário, foi observada a diminuição do tamanho das lesões nas aortas, bem como nos arcos aórticos, em conjunto com o aumento do conteúdo de colágeno nas lesões. Este resultado foi observado junto com uma diminuição sistêmica dos níveis circulantes de CXCL12 levando a conclusão de que CXCL12 derivado de ECs promove aterosclerose²³⁶. A inibição de CXCR4 parece levar a descompensação de um mecanismo de

sobrevivência do endotélio disfuncional, todavia, a inibição de seu ativador CXCL12 parece não ter o mesmo efeito, além de se mostrar um alvo interessante para disfunção endotelial e aterosclerose.

Melhorar a função de permeabilidade endotelial é extremamente importante para reduzir o influxo de células do sistema imune para a neointima e, portanto, a modulação de proteínas que melhorem a barreira endotelial podem ser ótimos alvos terapêuticos para a disfunção endotelial^{129,237}. STAT5A (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 5A*) está entre os alvos inibidos aqui capaz de aumentar a intensidade de VE-caderina na membrana além de translocar ela do citoplasma para membrana. Recentemente, foi mostrado que o tratamento com o inibidor de STAT5 suprimiu significativamente a aterosclerose em camundongos ApoE -/- induzida por HFD (do inglês *High-fat diet*) via diminuição da inflamação²³⁸. Além disso, foi demonstrado que a inibição de STAT5 poderia diminuir a inflamação induzida por oxLDL. STAT5A é um TF que regula a transcrição de diversos genes ligados a resposta imune²³⁹, mas a ligação com a melhora da barreira endotelial através do aumento de VE-caderina parece ser inédito, apesar de sua inibição não ter apresentado efeito anti-inflamatório.

Está segunda parte do trabalho mostrou a possibilidade de utilizar uma grande quantidade de dados integrados em redes gênicas regulatórias associadas a drogas e doenças para identificar novos alvos terapêuticos ou reposicionar drogas já existentes. No entanto, ela reitera a ideia que não conseguimos identificar propriedades emergentes de fatores de risco CV agindo em conjunto a partir da integração de resultados obtidos dos estímulos aplicados individualmente.

A combinação de ambas abordagens nos mostra não só detalhes moleculares da disfunção endotelial, como identifica possíveis alvos que podem ser modulados de forma a tratar ou reduzir a progressão da doença. Além disso, o presente trabalho oferece evidências que a utilização de abordagens *in silico* é capaz de identificar alvos interessantes para reposição clínica, e que a validação *in vitro* é essencial para priorizar quais destes alvos necessitam estudos investigativos mais avançados sobre seus mecanismos protetores no endotélio.

6. Considerações finais

6.1 Abordagem reducionista versus holística

Nosso estudo mostra uma visão inédita das interações de estímulos clássicos que simulam fatores de risco CV na disfunção endotelial. Até onde sabemos, HCAEC submetidos a *shear stress* (LSS ou OSS) em combinação com hipóxia química (CoCl₂), lipídios oxidados (OxPAPC) e inflamação (IL-1β), ainda não foi relatado. Nossos dados confirmam que a soma dos insultos acima não é capaz recapitular os efeitos de quando eles estão aplicados em conjunto, o que nos permite identificar processos biológicos que só surgem nessa condição, como o perfil endotelial proliferativo. Nossos achados também sugerem uma hierarquia desses estímulos na modulação do perfil transcriptômico frente a insultos com fatores de risco CV, observando um aumento da quantidade de DEGs indo de hipóxia para OxPAPC, IL-1β, OSS e todos os insultos agrupados. Finalmente, nosso experimento *in vitro* demonstra que os fatores de risco CV agrupados recapitulam processos de disfunção endotelial conhecidos, observados em dados de scRNA-seq de placa aterosclerótica em coronária humana *in vivo*, validando DEGs envolvidos na proliferação celular, adesão de leucócitos e vias de trombose.

Utilizamos aqui uma combinação de uma abordagem reducionista e holística, onde segregamos os estímulos individuais para identificar características únicas que os definem e as características comuns entre os mesmos, ao mesmo tempo que investigamos qual a contribuição de todos os estímulos combinados e suas especificidades. Os dados de scRNA-seq das placas da artéria coronária humana fornecem o ambiente ideal para estudar as propriedades emergentes, onde múltiplas interações não lineares e feedbacks estão acontecendo nas ECs, assim como sua interação com outros tipos celulares. Os 103 DEGs de nosso experimento *in vitro* sobrepostos aos DEGs de ECs de placa de artéria coronária humana mostram que os genes identificados *in vitro* recapitulam *in vivo* as vias celulares associadas a processos importantes da disfunção endotelial como adesão leucocitária, trombogênese e proliferação celular. Importante destacar que os genes associados aos processos proliferativos só puderam ser identificados com a combinação dos estímulos *in vitro* e representam uma propriedade emergente que não é observada quando os estímulos são examinados individualmente.

Na segunda parte deste trabalho, mesmo utilizando os dados dos estímulos isolados, como OSS, IL-1 β , TNF- α e OxPAPC, tentamos uma abordagem integrativa (holística) para criar um ambiente celular complexo *in silico* integrando 4 camadas ômicas, epigenômica (ATAC-seq e CHIP-seq), transcriptômica (RNA-seq), proteômica e fosfoproteômica (redes de PPI), representado em uma rede com mais de dois mil nós. Abordagem essa que nos permitiu identificar promissores alvos terapêuticos para a disfunção endotelial e aterosclerose. No entanto, ainda assim não foi possível recapitular as propriedades emergentes somente com a análise integrada (soma linear) dos estímulos aqui investigados. Portanto, estas propriedades emergentes têm implicações importantes para as investigações básicas sobre a (dis)função endotelial, onde um entendimento mais profundo das múltiplas interações entre os componentes vitais que levam e mantêm o estado disfuncional do endotélio pode nos ajudar com abordagens mais bem-sucedidas para novas terapias.

Em conjunto, os dados mostram que os fatores de risco cardiovascular exercem efeitos específicos sobre a DE e a combinação de estímulos, como observada em grande número de pacientes, resulta em efeitos emergentes que vão além da soma dos efeitos individuais e que foram validados em amostras de placas ateroscleróticas de coronária. Finalmente, a abordagem *in silico* identificou 17 alvos que afetam redes gênicas associadas a DE que poderão ser alvos terapêuticos como ilustrado pela inibição do EGLN3. Assim, os dados desta tese fornecem elementos críticos para entendimento da base molecular da disfunção endotelial e potenciais alvos terapêuticos para disfunções cardiovasculares.

7. Referências

1. Boulanger, C. M. Endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2016) doi:10.1161/ATVBAHA.116.306940.
2. Davis, G. E. & Senger, D. R. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circulation Research* (2005) doi:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3.
3. Lüscher, T. F. & Barton, M. Biology of the endothelium. *Clin. Cardiol.* (1997) doi:9422846.
4. Kolte, D., McClung, J. A. & Aronow, W. S. Vasculogenesis and Angiogenesis. in *Translational Research in Coronary Artery Disease: Pathophysiology to Treatment* (2015). doi:10.1016/B978-0-12-802385-3.00006-1.
5. Niklason, L. & Dai, G. Arterial Venous Differentiation for Vascular Bioengineering. 433–449 (2018) doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-121231.
6. Mudau, M., Genis, A., Lochner, A. & Strijdom, H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc. J. Afr.* **23**, 222–31 (2012).
7. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol.* **219**, 382–408 (2017).
8. Cyron, C. J. & Humphrey, J. D. Vascular homeostasis and the concept of mechanobiological stability. *Int. J. Eng. Sci.* (2014) doi:10.1016/j.ijengsci.2014.08.003.
9. Árnadóttir, J. & Chalfie, M. Eukaryotic Mechanosensitive Channels. *Annu. Rev. Biophys.* (2010) doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125836.
10. Anishkin, A., Loukin, S. H., Teng, J. & Kung, C. Feeling the hidden mechanical forces in lipid bilayer is an original sense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014) doi:10.1073/pnas.1313364111.
11. Leckband, D. E. & de Rooij, J. Cadherin Adhesion and Mechanotransduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2014) doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013212.
12. Wehrle-Haller, B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 569–581 (2012).
13. Jufri, N. F., Mohamedali, A., Avolio, A. & Baker, M. S. Mechanical stretch: Physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells. *Vasc. Cell* **7**, 1–12 (2015).
14. Birukov, K. G. Cyclic Stretch, Reactive Oxygen Species, and Vascular Remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* (2009) doi:10.1089/ars.2008.2390.
15. Hu, Z. *et al.* Acute Mechanical Stretch Promotes eNOS Activation in Venous Endothelial Cells Mainly via PKA and Akt Pathways. *PLoS One* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0071359.
16. Anwar, M. A., Shalhoub, J., Lim, C. S., Gohel, M. S. & Davies, A. H. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *Journal of Vascular Research* (2012) doi:10.1159/000339151.
17. Van Engeland, N. C. A. *et al.* A biomimetic microfluidic model to study signalling between endothelial and vascular smooth muscle cells under hemodynamic conditions. *Lab Chip* **18**, 1607–1620 (2018).
18. Naruse, K., Yamada, T. & Sokabe, M. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am. J. Physiol.* (1998) doi:10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1532.
19. Thodeti, C. K. *et al.* TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling. *Circ. Res.* (2009) doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.192930.
20. Suzuki, M. *et al.* Up-regulation of integrin beta 3 expression by cyclic stretch in human umbilical endothelial cells. *Biochem. Biophys Commun* (1997) doi:10.1006/bbrc.1997.7364.
21. Katsumi, A., Naoe, T., Matsushita, T., Kaibuchi, K. & Schwartz, M. A. Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J. Biol. Chem.* (2005) doi:10.1074/jbc.C400455200.
22. Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y. & Newman, P. J. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.* (2016).
23. Huang, B., Yang, F., Shu, W., Chen, Z. & Chen, M. Functional Roles of Shear Stress in Vascular Endothelial. **3**, 64–67 (2017).
24. Davies, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* (1995) doi:10.1152/physrev.1995.75.3.519.
25. Wang, C., Baker, B. M., Chen, C. S. & Schwartz, M. A. Endothelial cell sensing of flow direction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2013) doi:10.1161/ATVBAHA.113.301826.
26. Timmins, L. H. *et al.* Oscillatory wall shear stress is a dominant flow characteristic affecting lesion progression patterns and plaque vulnerability in patients with coronary artery disease. *J. R. Soc. Interface* **14**, 20160972 (2017).
27. Fernandes, D. C., Araujo, T. L. S., Laurindo, F. R. M. & Tanaka, L. Y. Hemodynamic Forces in the Endothelium: From Mechanotransduction to Implications on Development of Atherosclerosis. *Endothel. Cardiovasc. Dis. Vasc. Biol. Clin. Syndr.* 85–95 (2018) doi:10.1016/B978-0-12-812348-5.00007-6.
28. Paszkowiak, J. J. & Dardik, A. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc. Endovascular Surg.* (2003) doi:10.1177/153857440303700107.
29. Papaioannou, T. G. & Stefanadis, C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hell. J. Cardiol.* **46**, 9–15 (2005).
30. Sinha, R. *et al.* Endothelial cell alignment as a result of anisotropic strain and flow induced shear stress combinations. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).

31. Tkachenko, E. *et al.* The nucleus of endothelial cell as a sensor of blood flow direction. *Biol. Open* **2**, 1007–1012 (2013).
32. Cells, E., Ngai, C. Y. & Yao, X. Vascular Responses to Shear Stress : The Involvement of Mechanosensors in Vascular Responses to Shear Stress : The Involvement of Mechanosensors in Endothelial Cells. (2016) doi:10.2174/1877382601003010085.
33. Barquera, S. *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch. Med. Res.* **46**, 328–338 (2015).
34. Stylianou, I. M., Bauer, R. C., Reilly, M. P. & Rader, D. J. Genetic basis of atherosclerosis: Insights from mice and humans. *Circ. Res.* **110**, 337–355 (2012).
35. Lusis, A. J., Fogelman, A. M. & Fonarow, G. C. Genetic basis of atherosclerosis: Part I. New genes and pathways. *Circulation* **110**, 1868–1873 (2004).
36. Peiffer, V., Sherwin, S. J. & Weinberg, P. D. Does low and oscillatory wall shear stress correlate spatially with early atherosclerosis? A systematic review. *Cardiovasc. Res.* **99**, 242–250 (2013).
37. Karki, P. & Birukov, K. G. Lipid mediators in the regulation of endothelial barriers. *Tissue Barriers* **6**, 1–16 (2018).
38. Urschel, K., Tauchi, M., Achenbach, S. & Dietel, B. Investigation of Wall Shear Stress in Cardiovascular Research and in Clinical Practice — From Bench to Bedside. (2021).
39. Fontijn, R. D. *et al.* Expression of nitric oxide-transporting aquaporin-1 is controlled by KLF2 and marks non-activated endothelium in vivo. *PLoS One* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0145777.
40. Fledderus, J. O. *et al.* Prolonged shear stress and KLF2 suppress constitutive proinflammatory transcription through inhibition of ATF2. *Blood* **109**, 4249–4257 (2007).
41. Sangwung, P. *et al.* KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight* **2**, e91700 (2017).
42. Pfnninger, A. *et al.* Shear stress modulates the expression of the atheroprotective protein Cx37 in endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2012) doi:10.1016/j.yjmcc.2012.05.011.
43. Wong, C. W. *et al.* Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat. Med.* (2006) doi:10.1038/nm1441.
44. Merino, H., Parthasarathy, S. & Singla, D. K. Partial ligation-induced carotid artery occlusion induces leukocyte recruitment and lipid accumulation—A shear stress model of atherosclerosis. *Mol. Cell. Biochem.* (2013) doi:10.1007/s11010-012-1468-7.
45. Sucosky, P., Balachandran, K., Elhammali, A., Jo, H. & Yoganathan, A. P. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF- β 1-dependent pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 254–260 (2009).
46. Soehnlein, O. & Libby, P. Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* **0123456789**.
47. Sheikh, S. *et al.* Differing mechanisms of leukocyte recruitment and sensitivity to conditioning by shear stress for endothelial cells treated with tumour necrosis factor- α or interleukin-1 β . *Br. J. Pharmacol.* **145**, 1052–1061 (2005).
48. Depuydt, M. A. C. *et al.* Microanatomy of the Human Atherosclerotic Plaque by Single-Cell Transcriptomics. *Circ. Res.* 1437–1455 (2020) doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316770.
49. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V., Myasoedova, V. A. & Orekhov, A. N. Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Experimental and Molecular Pathology* (2018) doi:10.1016/j.yexmp.2018.01.008.
50. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* (2007) doi:10.1038/nri2156.
51. Anderson, N. R., Buffone, A. & Hammer, D. A. T lymphocytes migrate upstream after completing the leukocyte adhesion cascade. *Cell Adhes. Migr.* (2019) doi:10.1080/19336918.2019.1587269.
52. Watson, A. D. *et al.* Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J. Biol. Chem.* (1997) doi:10.1074/jbc.272.21.13597.
53. Emert, B. *et al.* HDL inhibits the effects of oxidized phospholipids on endothelial cell gene expression via multiple mechanisms. *J. Lipid Res.* **55**, 1678–1692 (2014).
54. Lee, S. *et al.* Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. *Circ. Res.* **111**, 778–799 (2012).
55. Springstead, J. R. *et al.* Evidence for the importance of OxPAPC interaction with cysteines in regulating endothelial cell function. *J. Lipid Res.* **53**, 1304–1315 (2012).
56. Navab, M. *et al.* Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* (1991) doi:10.1172/JCI115532.
57. Liu, W., Yin, Y., Zhou, Z., He, M. & Dai, Y. OxLDL-induced IL-1 β secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflamm. Res.* (2014) doi:10.1007/s00011-013-0667-3.
58. Chai, Y. C., Binion, D. G., Macklis, R. & Chisolm, G. M. Smooth muscle cell proliferation induced by oxidized LDL-borne lysophosphatidylcholine: Evidence for FGF-2 release from cells not extracellular matrix. *Vascul. Pharmacol.* (2002) doi:10.1016/S1537-1891(02)00173-8.
59. Liu, J., Ren, Y., Kang, L. & Zhang, L. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *Int. J. Mol. Med.* (2014) doi:10.3892/ijmm.2014.1681.
60. Bekkering, S. *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler.*

- Thromb. Vasc. Biol.* (2014) doi:10.1161/ATVBAHA.114.303887.
61. Wang, H. H., Hsieh, H. L., Wu, C. Y. & Yang, C. M. Oxidized low-density lipoprotein-induced matrix metalloproteinase-9 expression via PKC- δ /p42/p44 MAPK/Elk-1 cascade in brain astrocytes. *Neurotox. Res.* (2010) doi:10.1007/s12640-009-9077-2.
 62. Sluimer, J. C. *et al.* Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated With Intraplaque Angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2008) doi:10.1016/j.jacc.2007.12.025.
 63. Abe, H., Semba, H. & Takeda, N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of. **1**, 884–894 (2017).
 64. Burke, A. P. & Virmani, R. Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction. *Medical Clinics of North America* (2007) doi:10.1016/j.mcna.2007.03.005.
 65. Ferdinand, P. & Roffe, C. Hypoxia after stroke: A review of experimental and clinical evidence. *Exp. Transl. Stroke Med.* (2016) doi:10.1186/s13231-016-0023-0.
 66. Singhal, A. K., Symons, J. D., Boudina, S., Jaishy, B. & Shiu, Y.-T. E. Role of Endothelial Cells in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Vasc. Dis. Prev.* (2014) doi:10.2174/1874120701007010001.
 67. Tawakol, A. *et al.* HIF-1 α and PFKFB3 mediate a tight relationship between proinflammatory activation and anerobic metabolism in atherosclerotic macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2015) doi:10.1161/ATVBAHA.115.305551.
 68. Cantelmo, A. R. *et al.* Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* (2016) doi:10.1016/j.ccell.2016.10.006.
 69. Poels, K. *et al.* Inhibition of PFKFB3 Hampers the Progression of Atherosclerosis and Promotes Plaque Stability. *Front. Cell Dev. Biol.* (2020) doi:10.3389/fcell.2020.581641.
 70. Akhtar, S. *et al.* Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1 α Promotes Atherosclerosis and Monocyte Recruitment by Upregulating MicroRNA-19a. *Hypertension* (2015) doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05886.
 71. Cruys, B. *et al.* Glycolytic regulation of cell rearrangement in angiogenesis. *Nat. Commun.* (2016) doi:10.1038/ncomms12240.
 72. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine* (2011) doi:10.1038/nm.2507.
 73. Appelhoff, R. J. *et al.* Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* (2004) doi:10.1074/jbc.M406026200.
 74. Epstein, A. C. R. *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* (2001) doi:10.1016/S0092-8674(01)00507-4.
 75. Howangyin, K. Y. *et al.* HIF-prolyl hydroxylase 2 inhibition enhances the efficiency of mesenchymal stem cell-based therapies for the treatment of critical limb ischemia. *Stem Cells* (2014) doi:10.1002/stem.1540.
 76. Rahtu-Korpela, L. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor Prolyl 4-Hydroxylase-2 Inhibition Protects Against Development of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2016) doi:10.1161/ATVBAHA.115.307136.
 77. Marsch, E. *et al.* Deficiency of the oxygen sensor prolyl hydroxylase 1 attenuates hypercholesterolaemia, atherosclerosis, and hyperglycaemia. *Eur. Heart J.* (2016) doi:10.1093/eurheartj/ehw156.
 78. Hasin, Y., Seldin, M. & Lusis, A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* **18**, 1–15 (2017).
 79. Karczewski, K. J. & Snyder, M. P. Integrative omics for health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 299–310 (2018).
 80. Lin, L. *et al.* Gene gravity-like algorithm for disease gene prediction based on phenotype-specific network. *BMC Syst. Biol.* **11**, 121 (2017).
 81. Zhou, G. *et al.* NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* (2019) doi:10.1093/nar/gkz240.
 82. Li, N., Li, L. & Chen, Y. The Identification of Core Gene Expression Signature in Hepatocellular Carcinoma. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 3478305 (2018).
 83. Reyes-Palomares, A. *et al.* Remodeling of active endothelial enhancers is associated with aberrant gene-regulatory networks in pulmonary arterial hypertension. *Nat. Commun.* **11**, 1–14 (2020).
 84. Li, H. *et al.* An Integrated Systems Genetics and Omics Toolkit to Probe Gene Function. *Cell Syst.* **6**, 90–102.e4 (2018).
 85. Simmons, R. D., Kumar, S., Thabet, S. R., Sur, S. & Jo, H. Omics-based approaches to understand mechanosensitive endothelial biology and atherosclerosis. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 378–401 (2016).
 86. Peaston, A. E. & Whitelaw, E. Epigenetics and phenotypic variation in mammals. *Mammalian Genome* (2006) doi:10.1007/s00335-005-0180-2.
 87. Gratkowska-Zmuda, D. M. *et al.* The SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodeling complex in arabidopsis responds to environmental changes in temperature-dependent manner. *Int. J. Mol. Sci.* (2020) doi:10.3390/ijms21030762.
 88. Laybourn, P. Chromatin: Structure and Function . A. Wolffe . *Q. Rev. Biol.* (1999) doi:10.1086/394147.
 89. Hansen, J. C., Tse, C. & Wolffe, A. P. Structure and function of the core histone N-termini: More

- than meets the eye. *Biochemistry* (1998) doi:10.1021/bi982409v.
90. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* (2007) doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
 91. Fyodorov, D. V., Zhou, B. R., Skoultchi, A. I. & Bai, Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018) doi:10.1038/nrm.2017.94.
 92. Melgar, M. F., Collins, F. S. & Sethupathy, P. Discovery of active enhancers through bidirectional expression of short transcripts. *Genome Biol.* (2011) doi:10.1186/gb-2011-12-11-r113.
 93. Pradeepa, M. M. Causal role of histone acetylations in enhancer function. *Transcription* (2017) doi:10.1080/21541264.2016.1253529.
 94. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* (2015) doi:10.1002/0471142727.mb2129s109.
 95. Kim, T. H. & Dekker, J. ChIP-seq. *Cold Spring Harb. Protoc.* (2018) doi:10.1101/pdb.prot082644.
 96. Höllbacher, B., Balázs, K., Heinig, M. & Uhlenhaut, N. H. Seq-ing answers : Current data integration approaches to uncover mechanisms of transcriptional regulation. **18**, 1330–1341 (2020).
 97. Sakabe, N. J., Savic, D. & Nobrega, M. A. Transcriptional enhancers in development and disease. *Genome Biology* (2012) doi:10.1186/gb-2012-13-1-238.
 98. Hu, Z. & Tee, W. W. Enhancers and chromatin structures: Regulatory hubs in gene expression and diseases. *Bioscience Reports* (2017) doi:10.1042/BSR20160183.
 99. Hu, Z. & Tee, W.-W. Enhancers and chromatin structures: regulatory hubs in gene expression and diseases. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20160183 (2017).
 100. Lambert, S. A. *et al.* The Human Transcription Factors. *Cell* (2018) doi:10.1016/j.cell.2018.01.029.
 101. Boon, R. a & Horrevoets, a J. G. Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress Shear stress. *Mol. Cell* 39–43 (2009) doi:09010039 [pii].
 102. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2017) doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
 103. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1998) doi:10.1016/S0959-437X(98)80016-6.
 104. Semenza, G. L. A compendium of proteins that interact with HIF-1α. *Exp. Cell Res.* (2017) doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.041.
 105. Zamanighomi, M., Lin, Z., Wang, Y., Jiang, R. & Hung Wong, W. Predicting transcription factor binding motifs from DNA-binding domains, chromatin accessibility and gene expression data. *Nucleic Acids Res.* (2017) doi:10.1093/nar/gkx358.
 106. Azofeifa, J. G. *et al.* Enhancer RNA profiling predicts transcription factor activity. *Genome Res.* (2018) doi:10.1101/gr.225755.117.
 107. Cava, C. & Castiglioni, I. In silico perturbation of drug targets in pan-cancer analysis combining multiple networks and pathways. *Gene* **698**, 100–106 (2019).
 108. Dorel, M. *et al.* Modelling signalling networks from perturbation data. *Bioinformatics* **34**, 4079–4086 (2018).
 109. Zaffaroni, G., Okawa, S., Morales-Ruiz, M. & del Sol, A. An integrative method to predict signalling perturbations for cellular transitions. *Nucleic Acids Res.* **47**, e72–e72 (2019).
 110. Khan, S. *et al.* EndoDB: A database of endothelial cell transcriptomics data. *Nucleic Acids Res.* (2019) doi:10.1093/nar/gky997.
 111. Lee, D. & Cho, K.-H. Signal flow control of complex signaling networks. *Sci. Rep.* **9**, 1–18 (2019).
 112. Zhang, W., Chien, J., Yong, J. & Kuang, R. Network-based machine learning and graph theory algorithms for precision oncology. *npj Precis. Oncol.* **1**, (2017).
 113. Luecken, M. D. & Theis, F. J. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* (2019) doi:10.15252/msb.20188746.
 114. Williams, J. W. *et al.* Single Cell RNA Sequencing in Atherosclerosis Research. *Circ. Res.* (2020) doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315940.
 115. Hill, C. A., Fernandez, D. M. & Giannarelli, C. Single cell analyses to understand the immune continuum in atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2021) doi:10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.003.
 116. Andueza, A. *et al.* Endothelial Reprogramming by Disturbed Flow Revealed by Single-Cell RNA and Chromatin Accessibility Study. *Cell Rep.* (2020) doi:10.1016/j.celrep.2020.108491.
 117. Pan, H. *et al.* Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation* (2020) doi:10.1161/circulationaha.120.048378.
 118. Alsaigh, T., Evans, D., Frankel, D. & Torkamani, A. Decoding the transcriptome of atherosclerotic plaque at single-cell resolution. (2020) doi:10.1101/2020.03.03.968123.
 119. Kalucka, J. *et al.* Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell* **180**, 764–779.e20 (2020).
 120. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* (2004) doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016.
 121. Alexander, J. S. *et al.* Multiple sclerosis and cerebral endothelial dysfunction: Mechanisms. *Pathophysiology* (2011) doi:10.1016/j.pathophys.2010.04.002.

122. Halasz, M., Kholodenko, B. N., Kolch, W. & Santra, T. Integrating network reconstruction with mechanistic modeling to predict cancer therapies. *Sci. Signal.* **9**, (2016).
123. Mattiazzi Usaj, M. *et al.* High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends Cell Biol.* **26**, 598–611 (2016).
124. Caicedo, J. C. *et al.* Data-analysis strategies for image-based cell profiling. *Nat. Methods* **14**, 849–863 (2017).
125. Vincent, F. *et al.* Developing predictive assays : The phenotypic screening “ rule of 3 ”. 1–5.
126. Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S. & Zuckerbraun, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics* (2020) doi:10.1016/j.ccc.2019.12.009.
127. Incalza, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology* (2018) doi:10.1016/j.vph.2017.05.005.
128. Tutkun, L. *et al.* The relation between lead exposure and inflammation / endothelial dysfunction. *Med. Sci. | Int. Med. J.* (2020) doi:10.5455/medscience.2020.08.9249.
129. Dejana, E., Orsenigo, F. & Lampugnani, M. G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* (2008) doi:10.1242/jcs.017897.
130. Lai, Y. C. *et al.* Nitrite-mediated S-nitrosylation of caspase-3 prevents hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction. *Circ. Res.* (2011) doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.256479.
131. Xu, S. *et al.* Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol. Rev.* **73**, 924–967 (2021).
132. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 39. Livak and Schmittgen, 2001. *Methods* (2001).
133. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* (2012) doi:10.1038/nmeth.2089.
134. Kauffmann, A., Gentleman, R. & Huber, W. arrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* (2009) doi:10.1093/bioinformatics/btn647.
135. Ritchie, M. E. *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* (2015) doi:10.1093/nar/gkv007.
136. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* (2012) doi:10.1089/omi.2011.0118.
137. Han, H. *et al.* TRRUST v2: An expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res.* (2018) doi:10.1093/nar/gkx1013.
138. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* (2003) doi:10.1101/gr.1239303.
139. Wirka, R. C. *et al.* Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat. Med.* **25**, 1280–1289 (2019).
140. Butler, A. and R. S. Seurat - Documentation. *Bioconductor* (2017).
141. Krause, M. D. *et al.* Genetic variant at coronary artery disease and ischemic stroke locus 1p32 . 2 regulates endothelial responses to hemodynamics. (2018) doi:10.1073/pnas.1810568115.
142. Hogan, N. T. *et al.* Transcriptional networks specifying homeostatic and inflammatory programs of gene expression in human aortic endothelial cells. 1–28 (2017) doi:10.7554/eLife.22536.
143. Lawrence, M., Gentleman, R. & Carey, V. rtracklayer: An R package for interfacing with genome browsers. *Bioinformatics* (2009) doi:10.1093/bioinformatics/btp328.
144. Lawrence, M. *et al.* Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput. Biol.* (2013) doi:10.1371/journal.pcbi.1003118.
145. Yu, G., Wang, L. G. & He, Q. Y. ChIP seeker: An R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* (2015) doi:10.1093/bioinformatics/btv145.
146. Love, M. I., Anders, S., Kim, V. & Huber, W. RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research* **4**, 1070 (2015).
147. Zhu, L. J. *et al.* ChIPpeakAnno: A Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics* (2010) doi:10.1186/1471-2105-11-237.
148. Mercier, E. *et al.* An integrated pipeline for the genome-wide analysis of transcription factor binding sites from ChIP-Seq. *PLoS One* (2011) doi:10.1371/journal.pone.0016432.
149. Fornes, O. *et al.* JASPAR 2020: Update of the open-Access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* (2020) doi:10.1093/nar/gkz1001.
150. Fang, H. & Gough, J. The ‘dnet’ approach promotes emerging research on cancer patient survival. *Genome Med.* (2014) doi:10.1186/s13073-014-0064-8.
151. Wu, X., Pang, E., Lin, K. & Pei, Z. M. Improving the Measurement of Semantic Similarity between Gene Ontology Terms and Gene Products: Insights from an Edge- and IC-Based Hybrid Method. *PLoS One* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0066745.
152. Kerrien, S. *et al.* The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic Acids Res.* (2012) doi:10.1093/nar/gkr1088.
153. Surdo, P. Lo, Calderone, A., Cesareni, G. & Perfetto, L. SIGNOR: A database of causal relationships between biological entities—a short guide to searching and browsing. *Curr. Protoc. Bioinforma.* (2017) doi:10.1002/cpbi.28.
154. Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* (2015) doi:10.1093/nar/gku1267.
155. Türei, D., Korcsmáros, T. & Saez-Rodriguez, J. OmniPath: Guidelines and gateway for literature-curated signaling pathway resources. *Nature Methods* (2016) doi:10.1038/nmeth.4077.
156. Piñero, J. *et al.* DisGeNET: A discovery platform for the dynamical exploration of human diseases

- and their genes. *Database* (2015) doi:10.1093/database/bav028.
157. Willighagen, E. L. *et al.* The ChEMBL database as linked open data. *J. Cheminform.* (2013) doi:10.1186/1758-2946-5-23.
 158. Zhu, T. *et al.* Hit identification and optimization in virtual screening: Practical recommendations based on a critical literature analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* (2013) doi:10.1021/jm301916b.
 159. McQuin, C. *et al.* CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol.* (2018) doi:10.1371/journal.pbio.2005970.
 160. Gkaliagkousi, E. & Ferro, A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front. Biosci.* (2011) doi:10.2741/3828.
 161. Boxer, L. M. & Dang, C. V. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* (2001) doi:10.1038/sj.onc.1204595.
 162. Sperandio, S. *et al.* The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1 α gene during hypoxia. *Mol. Carcinog.* (2009) doi:10.1002/mc.20454.
 163. Aung, H. H. *et al.* Induction of ATF3 Gene Network by Triglyceride-Rich Lipoprotein Lipolysis Products Increases Vascular Apoptosis and Inflammation. 2088–2096 (2013) doi:10.1161/ATVBAHA.113.301375.
 164. Weijts, B. G. M. W. *et al.* E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J.* (2012) doi:10.1038/emboj.2012.231.
 165. Higashikuni, Y. *et al.* The ATP-binding cassette transporter ABCG2 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by promoting angiogenesis and antioxidant response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2012) doi:10.1161/ATVBAHA.111.240341.
 166. Münzel, T., Daiber, A., Ullrich, V. & Mülsch, A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the CGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1551–1557 (2005).
 167. Pandey, D. *et al.* Transcriptional regulation of endothelial arginase 2 by histone deacetylase 2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2014) doi:10.1161/ATVBAHA.114.303685.
 168. Gyeong, I. M., Kim, I. S., Lee, B. H. & Yong, C. B. Endothelial argininosuccinate synthetase 1 regulates nitric oxide production and monocyte adhesion under static and laminar shear stress conditions. *J. Biol. Chem.* (2011) doi:10.1074/jbc.M110.180489.
 169. Gao, H., Wu, G., Spencer, T. E., Johnson, G. A. & Bazer, F. W. Select nutrients in the ovine uterine lumen. V. Nitric oxide synthase, GTP cyclohydrolase, and ornithine decarboxylase in ovine uteri and peri-implantation conceptuses. *Biol. Reprod.* (2009) doi:10.1095/biolreprod.108.075473.
 170. Pei, J. *et al.* Indoxyl sulfate stimulates angiogenesis by regulating reactive oxygen species production via CYP1B1. *Toxins (Basel)*. (2019) doi:10.3390/toxins11080454.
 171. Menden, H., Tate, E., Hogg, N. & Sampath, V. LPS-mediated endothelial activation in pulmonary endothelial cells: Role of Nox2-dependent IKK- β phosphorylation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* (2013) doi:10.1152/ajplung.00261.2012.
 172. Okamoto, T. *et al.* Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
 173. Muller, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Veterinary Pathology* (2013) doi:10.1177/0300985812469883.
 174. Stamatikos, A. *et al.* ABCA1 Overexpression in Endothelial Cells in Vitro Enhances ApoAI-Mediated Cholesterol Efflux and Decreases Inflammation. *Hum. Gene Ther.* **30**, 236–248 (2019).
 175. Johnston, J. M. *et al.* Myeloid Tribbles 1 induces early atherosclerosis via enhanced foam cell expansion. *bioRxiv* **1**, (2019).
 176. Rodig, N. *et al.* Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* (2003) doi:10.1002/eji.200324270.
 177. Savage, C. O. S., Hughes, C. C. W., McIntyre, B. W., Picard, J. K. & Pober, J. S. Human CD4+ T cells proliferate to HLA-DR+ allogeneic vascular endothelium: Identification of accessory interactions. *Transplantation* (1993) doi:10.1097/00007890-199307000-00024.
 178. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Endothelial Cell Costimulation of T Cell Activation Through CD58-CD2 Interactions Involves Lipid Raft Aggregation. *J. Immunol.* (2001) doi:10.4049/jimmunol.167.8.4378.
 179. Szyniarowski, P. *et al.* A comprehensive siRNA screen for kinases that suppress macroautophagy in optimal growth conditions. *Autophagy* (2011) doi:10.4161/auto.7.8.15770.
 180. Ruvolo, P. P., Deng, X. & May, W. S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* (2001) doi:10.1038/sj.leu.2402090.
 181. Carraway, K. L., Theodoropoulos, G., Kozloski, G. A. & Carothers Carraway, C. A. Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncology* (2009) doi:10.2217/fon.09.125.
 182. Kumar, A. & Carrera, A. C. New functions for PI3K in the control of cell division. *Cell Cycle* (2007) doi:10.4161/cc.6.14.4492.
 183. Di-Luoffo, M., Ben-Meriem, Z., Lefebvre, P., Delarue, M. & Guillermet-Guibert, J. PI3K functions as a hub in mechanotransduction. *Trends in Biochemical Sciences* (2021) doi:10.1016/j.tibs.2021.05.005.
 184. Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P. & Laurent, S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol. Rev.* **97**, 1555–1617 (2017).
 185. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–24 (2011).

186. De Vries, M. R. & Quax, P. H. A. Plaque angiogenesis and its relation to inflammation and atherosclerotic plaque destabilization. *Current Opinion in Lipidology* (2016) doi:10.1097/MOL.0000000000000339.
187. Tressel, S. L., Huang, R. & Jo, H. Oscillatory shear stress promotes endothelial cell migration and angiogenesis. *FASEB J.* (2006) doi:10.1096/fasebj.20.4.a289.
188. Tressel, S. L., Huang, R. P., Tomsen, N. & Jo, H. Laminar shear inhibits tubule formation and migration of endothelial cells by an angiopoietin-2-dependent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2007) doi:10.1161/ATVBAHA.107.150920.
189. Viridis, A., Ghiadoni, L., Giannarelli, C. & Taddei, S. Endothelial dysfunction and vascular disease in later life. *Maturitas* (2010) doi:10.1016/j.maturitas.2010.04.006.
190. Vaughan, D. E. PAI-1 and atherothrombosis. in *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2005). doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01420.x.
191. Bogdanov, V. Y. *et al.* Alternatively spliced human tissue factor: A circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat. Med.* (2003) doi:10.1038/nm841.
192. Ziliotto, N. *et al.* Expression profiles of the internal jugular and saphenous veins: Focus on hemostasis genes. *Thromb. Res.* (2020) doi:10.1016/j.thromres.2020.04.039.
193. Keshava, S. *et al.* Endothelial cell protein C receptor opposes mesothelioma growth driven by tissue factor. *Cancer Res.* (2013) doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1690.
194. Bondareva, O. *et al.* Identification of atheroprone shear stress responsive regulatory elements in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **115**, 1487–1499 (2019).
195. Ajami, N. E. *et al.* Systems biology analysis of longitudinal functional response of endothelial cells to shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 201707517 (2017).
196. Bouchard, C., Marquardt, J., Brás, A., Medema, R. H. & Eilers, M. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* (2004) doi:10.1038/sj.emboj.7600279.
197. Buchberger, E. *et al.* Inhibition of the transcriptional repressor complex Bcl-6/BCoR induces endothelial sprouting but does not promote tumor growth. *Oncotarget* (2017) doi:10.18632/oncotarget.13477.
198. Whitmore, H. A. B. *et al.* TNF- α signaling regulates RUNX1 function in endothelial cells. *FASEB J.* (2021) doi:10.1096/fj.202001668R.
199. Keppler-Noreuil, K. M., Parker, V. E. R., Darling, T. N. & Martinez-Agosto, J. A. Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics* (2016) doi:10.1002/ajmg.c.31531.
200. Akhoondi, S. *et al.* Identification of Fat4 as a candidate tumor suppressor gene in breast cancers. *Nature* **9**, 1–3 (2014).
201. Giannini, S., Cresci, B., Manuelli, C., Pala, L. & Rotella, C. M. Diabetic microangiopathy: IGF1P control endothelial cell growth by a common mechanism in spite of their species specificity and tissue peculiarity. *Journal of Endocrinological Investigation* (2006) doi:10.1007/BF03344189.
202. Law, A. Y. S. & Wong, C. K. C. Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2013) doi:10.1016/j.mce.2013.04.024.
203. Shen, J. *et al.* ARL15 overexpression attenuates high glucose-induced impairment of insulin signaling and oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* (2019) doi:10.1016/j.lfs.2019.01.030.
204. Tauseef, M. *et al.* Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circ. Res.* (2008) doi:10.1161/01.RES.0000338501.84810.51.
205. Kobayashi, S., Nakamura, T. Y. & Wakabayashi, S. Calcineurin B homologous protein 3 negatively regulates cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of glycogen synthase kinase 3 phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2015) doi:10.1016/j.yjmcc.2015.04.018.
206. Gonzalez-Gay, M. A., Gonzalez-Juanatey, C. & Ollier, W. E. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: Influence of HLA-DRB1 alleles. *Autoimmunity Reviews* (2004) doi:10.1016/j.autrev.2003.10.006.
207. Kovacevic, I. *et al.* The F-BAR Protein NOSTRIN Dictates the Localization of the Muscarinic M3 Receptor and Regulates Cardiovascular Function. *Circ. Res.* (2015) doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306187.
208. Zhang, Y. *et al.* Migrasome and Tetraspanins in Vascular Homeostasis: Concept, Present, and Future. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2020) doi:10.3389/fcell.2020.00438.
209. Rosand, J. *et al.* Loci associated with ischaemic stroke and its subtypes (SiGN): A genome-wide association study. *Lancet Neurol.* (2016) doi:10.1016/S1474-4422(15)00338-5.
210. Zhang, Y., Tedgui, A. & Ait-Oufella, H. Allograft inflammatory factor-1, a multi-target regulator of atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2019) doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.008.
211. Garcia-Diaz, A. *et al.* Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.04.031.
212. Fretz, J. A. *et al.* Early B-cell factor 1 is an essential transcription factor for postnatal glomerular maturation. *Kidney Int.* (2014) doi:10.1038/ki.2013.433.
213. Olofsson, B. A., Kelly, C. M., Kim, J., Hornsby, S. M. & Azizkhan-Clifford, J. Phosphorylation of Sp1 in response to DNA damage by ataxia telangiectasia-mutated kinase. *Mol. Cancer Res.* (2007) doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0374.
214. Hsu, M. C., Chang, H. C. & Hung, W. C. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK

- via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. *J. Biol. Chem.* (2006) doi:10.1074/jbc.M510937200.
215. Whyte, W. A. *et al.* Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* (2013) doi:10.1016/j.cell.2013.03.035.
 216. Stancu, C. & Sima, A. Statins: Mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med.* (2001) doi:10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x.
 217. Oesterle, A., Laufs, U. & Liao, J. K. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circulation Research* (2017) doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308537.
 218. Xie, L. *et al.* PHD3-dependent hydroxylation of HCLK2 promotes the DNA damage response. *J. Clin. Invest.* (2012) doi:10.1172/JCI62374.
 219. Luo, W. *et al.* Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.03.054.
 220. Joharapurkar, A. A., Pandya, V. B., Patel, V. J., Desai, R. C. & Jain, M. R. Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Breakthrough in the Therapy of Anemia Associated with Chronic Diseases. *J. Med. Chem.* **61**, 6964–6982 (2018).
 221. Abe, H., Semba, H. & Takeda, N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb* **24**, 884–894 (2017).
 222. Kunze, R. *et al.* Neuron-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knockout reduces brain injury after transient cerebral ischemia. *Stroke* (2012) doi:10.1161/STROKEAHA.112.669598.
 223. Scholz, C. C. *et al.* Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1309718110.
 224. Badawi, Y. & Shi, H. Relative contribution of prolyl hydroxylase-dependent and -independent degradation of HIF-1 α by proteasomal pathways in cerebral ischemia. *Front. Neurosci.* (2017) doi:10.3389/fnins.2017.00239.
 225. Mikhaylova, O. *et al.* The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein and Egl-9-Type Proline Hydroxylases Regulate the Large Subunit of RNA Polymerase II in Response to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* (2008) doi:10.1128/mcb.01231-07.
 226. Karuppagounder, S. S. & Ratan, R. R. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: Robust new target or another big bust for stroke therapeutics. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (2012) doi:10.1038/jcbfm.2012.28.
 227. Vogler, M. *et al.* Pre- and post-conditional inhibition of prolyl-4-hydroxylase domain enzymes protects the heart from an ischemic insult. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* (2015) doi:10.1007/s00424-014-1667-z.
 228. Sen Banerjee, S. *et al.* HIF-prolyl hydroxylases and cardiovascular diseases. *Toxicology Mechanisms and Methods* (2012) doi:10.3109/15376516.2012.673088.
 229. Neckář, J. *et al.* Infarct size-limiting effect of epoxyeicosatrienoic acid analog EET-B is mediated by hypoxia-inducible factor-1 α via downregulation of prolyl hydroxylase 3. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* (2018) doi:10.1152/ajpheart.00726.2017.
 230. Tanaka, T. & Eckardt, K. U. HIF Activation Against CVD in CKD: Novel Treatment Opportunities. *Seminars in Nephrology* (2018) doi:10.1016/j.semnephrol.2018.02.006.
 231. Döring, Y., Pawig, L., Weber, C. & Noels, H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* (2014) doi:10.3389/fphys.2014.00212.
 232. Luker, K. E., Gupta, M. & Luker, G. D. Bioluminescent CXCL12 fusion protein for cellular studies of CXCR4 and CXCR7. *Biotechniques* (2009) doi:10.2144/000113126.
 233. Gao, J. H., Yu, X. H. & Tang, C. K. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: An underlying therapeutic target. *Clinica Chimica Acta* (2019) doi:10.1016/j.cca.2019.05.022.
 234. Noels, H. *et al.* Deficiency of endothelial Cxcr4 reduces reendothelialization and enhances neointimal hyperplasia after vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1209–1220 (2014).
 235. Döring, Y. *et al.* Vascular CXCR4 limits atherosclerosis by maintaining arterial integrity: Evidence from mouse and human studies. *Circulation* (2017) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027646.
 236. Jansen, Y. CXCL12 Derived From Endothelial Cells Promotes Atherosclerosis to Drive Coronary Artery Disease. 1338–1340 (2019) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037953.
 237. Weber, C., Fraemohs, L. & Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 467–477 (2007).
 238. Wang, X. *et al.* STAT5 inhibitor attenuates atherosclerosis via inhibition of inflammation: The role of STAT5 in atherosclerosis. *Am. J. Transl. Res.* **13**, 1422–1431 (2021).
 239. Surbek, M., Tse, W., Moriggl, R. & Han, X. A centric view of JAK/STAT5 in intestinal homeostasis, infection, and inflammation. *Cytokine* (2021) doi:10.1016/j.cyto.2020.155392.

8. Anexo – Material suplementar

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação e caracterização de genes relevantes à biologia vascular: análise integrada de dados ômicos para investigar novos mecanismos moleculares associados à função endotelial.

Pesquisador: Jose Eduardo Krieger

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14404919.6.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.809.097

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado cujo objetivo é identificar as bases da regulação genética da função endotelial, utilizando dados de marcações epigenéticas de histonas e expressão gênica, integrando dados de imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (ChIP-seq) e RNA-seq.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo é identificar as bases da regulação genética da função endotelial, utilizando dados de marcações epigenéticas de histonas e expressão gênica, integrando dados de imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (ChIP-seq) e RNA-seq.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Projeto não envolve seres humanos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

sem comentários

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi solicitada dispensa do TCLE. O projeto não contempla recrutamento de pacientes/participação de indivíduos. A pesquisa será feita em modelos celulares de células endoteliais: HUVEC (Lonza)(célula endotelial de veia umbilical humana) e a célula endotelial de artéria coronária humana –

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 3.809.097

HCAEC (Lonza) que serão adquiridas pela empresa Lonza.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Protocolo de Pesquisa não apresenta pendências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1335361.pdf	06/09/2019 16:46:27		Aceito
Outros	form_fmusp_revisado.docx	06/09/2019 16:46:00	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_resposta.docx	06/09/2019 16:45:01	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Orcamento_ProjetoEZH2.xls	23/05/2019 17:27:13	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	REGULAMENTO_DE_BIORREPOSITO RIO.doc	23/05/2019 17:26:33	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_EZH2project_24_01_19.docx	23/05/2019 17:26:08	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_pos.pdf	23/05/2019 17:25:59	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	FORM_CEP_FMUSP_ASSINADO.pdf	23/05/2019 17:25:11	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	FR_SGP_ASSINADA.pdf	23/05/2019 17:24:54	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Folha de Rosto	FR_PB_ASSINADA.pdf	23/05/2019 17:24:42	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.809.097

SAO PAULO, 24 de Janeiro de 2020

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador(a))**

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

Tabela Suplementar 1. DEGs identificados a partir da comparação de OSS & Hyp. & IL1B & OxPAPC vs. LSS (620 no total)

SYMBOL	GENENAME	logFC	P,Value	adj,P,Val
NOS3	nitric oxide synthase 3	-4,069	7,03E-25	1,84E-20
SLC7A2	solute carrier family 7 member 2	5,405	1,04E-22	1,37E-18
SELE	selectin E	6,861	4,22E-20	3,69E-16
ADAM15	ADAM metallopeptidase domain 15	-2,143	1,58E-19	1,04E-15
ATP8B2	ATPase phospholipid transporting 8B2	-2,785	1,21E-18	6,35E-15
LRIG1	leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1	2,293	1,96E-18	8,11E-15
CSF3	colony stimulating factor 3	5,630	2,16E-18	8,11E-15
ST6GAL1	ST6 beta-galactoside alpha-2;6-sialyltransferase 1	2,361	3,18E-18	1,04E-14
CCN3	cellular communication network factor 3	-4,041	7,58E-18	2,21E-14
PI3	peptidase inhibitor 3	5,196	9,61E-18	2,52E-14
MEF2A	myocyte enhancer factor 2A	-1,875	2,52E-17	6,02E-14
LMNA	lamin A/C	-1,742	4,40E-17	9,63E-14
RIPK2	receptor interacting serine/threonine kinase 2	2,062	7,59E-17	1,53E-13
SLC41A1	solute carrier family 41 member 1	1,549	4,03E-16	7,56E-13
ITGB4	integrin subunit beta 4	-5,191	5,07E-16	8,87E-13
MARCHF3	membrane associated ring-CH-type finger 3	1,497	6,89E-16	1,13E-12
HEG1	heart development protein with EGF like domains 1	-2,661	1,29E-15	2,00E-12
MALL	mal; T cell differentiation protein like	-3,380	1,72E-15	2,50E-12
CTSS	cathepsin S	4,038	2,73E-15	3,46E-12
LIMS2	LIM zinc finger domain containing 2	-1,903	2,75E-15	3,46E-12
IL1A	interleukin 1 alpha	3,287	2,93E-15	3,46E-12
CAPRN2	caprin family member 2	-1,544	2,98E-15	3,46E-12
TINAGL1	tubulointerstitial nephritis antigen like 1	-2,132	3,23E-15	3,53E-12
THBD	thrombomodulin	-3,398	4,63E-15	4,68E-12
C3	complement C3	4,781	5,34E-15	5,19E-12
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	2,510	1,03E-14	9,68E-12
AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	-5,727	1,19E-14	1,08E-11
SULT1B1	sulfotransferase family 1B member 1	-4,460	2,13E-14	1,82E-11
TRAF3	TNF receptor associated factor 3	1,532	2,16E-14	1,82E-11
SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family member 2A1	-5,728	2,21E-14	1,82E-11
KLF2	Kruppel like factor 2	-2,301	2,96E-14	2,35E-11
KCNN4	potassium calcium-activated channel subfamily N member 4	-3,112	3,47E-14	2,68E-11
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	5,068	3,76E-14	2,82E-11

GSN	gelsolin	-2,294	5,47E-14	3,99E-11
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	6,912	5,68E-14	4,03E-11
SDC4	syndecan 4	2,718	6,68E-14	4,61E-11
ANP32A	acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A	-1,497	7,39E-14	4,85E-11
ARHGEF28	Rho guanine nucleotide exchange factor 28	1,629	7,61E-14	4,87E-11
RHBDF2	rhomboid 5 homolog 2	1,710	8,76E-14	5,48E-11
PLVAP	plasmalemma vesicle associated protein	-4,203	1,02E-13	6,08E-11
ITPR3	inositol 1;4;5-trisphosphate receptor type 3	-1,562	1,09E-13	6,37E-11
MN1	MN1 proto-oncogene; transcriptional regulator	-2,667	1,35E-13	7,55E-11
CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	2,766	1,52E-13	8,29E-11
PTMS	parathyrosin	-1,641	1,80E-13	9,62E-11
RAB11A	RAB11A; member RAS oncogene family	-1,415	1,85E-13	9,73E-11
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5	2,970	3,03E-13	1,56E-10
RASSF2	Ras association domain family member 2	3,248	3,36E-13	1,69E-10
IL1B	interleukin 1 beta	5,635	3,97E-13	1,92E-10
NPR1	natriuretic peptide receptor 1	-4,040	4,17E-13	1,92E-10
SYT9	synaptotagmin 9	3,024	4,25E-13	1,92E-10
PDE4B	phosphodiesterase 4B	2,902	4,99E-13	2,11E-10
MYPN	myopalladin	2,965	5,12E-13	2,13E-10
S100A10	S100 calcium binding protein A10	-1,300	6,29E-13	2,54E-10
CSF1	colony stimulating factor 1	1,822	7,28E-13	2,89E-10
LMO7	LIM domain 7	-2,957	9,11E-13	3,46E-10
OSGIN2	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2	1,936	1,08E-12	4,02E-10
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	3,575	1,10E-12	4,02E-10
CD58	CD58 molecule	-1,749	1,10E-12	4,02E-10
RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator like 1	2,058	1,24E-12	4,45E-10
CACHD1	cache domain containing 1	2,306	1,36E-12	4,81E-10
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	2,531	1,39E-12	4,88E-10
BCL6	BCL6 transcription repressor	1,659	1,47E-12	5,02E-10
TMEM50B	transmembrane protein 50B	-1,585	1,47E-12	5,02E-10
CPA3	carboxypeptidase A3	4,019	1,73E-12	5,82E-10
DSE	dermatan sulfate epimerase	1,960	1,81E-12	6,03E-10
ST8SIA6	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2;8-sialyltransferase 6	-3,793	1,97E-12	6,46E-10
ASS1	argininosuccinate synthase 1	-3,760	2,19E-12	7,10E-10
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	3,436	2,54E-12	8,09E-10
TRAF1	TNF receptor associated factor 1	2,929	2,56E-12	8,09E-10
CALCRL	calcitonin receptor like receptor	-1,640	2,89E-12	9,03E-10
ARRDC3	arrestin domain containing 3	1,836	3,08E-12	9,39E-10
CHST1	carbohydrate sulfotransferase 1	1,691	4,12E-12	1,23E-09
IL7R	interleukin 7 receptor	4,160	4,36E-12	1,29E-09

SLC9A3R2	SLC9A3 regulator 2	-2,475	4,57E-12	1,33E-09
ZDHC14	zinc finger DHHC-type containing 14	1,735	4,60E-12	1,33E-09
PLA2G4C	phospholipase A2 group IVC	2,130	5,73E-12	1,63E-09
ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1	-3,793	6,45E-12	1,82E-09
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9	2,790	6,51E-12	1,82E-09
MYOM3	myomesin 3	-3,698	8,36E-12	2,26E-09
MSC	musculin	2,837	8,52E-12	2,28E-09
ENDOD1	endonuclease domain containing 1	-2,655	8,77E-12	2,28E-09
TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6	3,429	9,90E-12	2,55E-09
MT2A	metallothionein 2A	1,647	1,05E-11	2,67E-09
GSTO1	glutathione S-transferase omega 1	-1,346	1,08E-11	2,74E-09
ICOSLG	inducible T cell costimulator ligand	2,764	1,13E-11	2,77E-09
OGFRL1	opioid growth factor receptor like 1	1,900	1,15E-11	2,77E-09
MAML2	mastermind like transcriptional coactivator 2	1,304	1,15E-11	2,77E-09
NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	1,547	1,15E-11	2,77E-09
LCN6	lipocalin 6	-2,885	1,23E-11	2,90E-09
TUBA4A	tubulin alpha 4a	-1,824	1,65E-11	3,79E-09
LPXN	leupaxin	2,385	1,68E-11	3,83E-09
ADM	adrenomedullin	2,959	1,69E-11	3,83E-09
ESYT2	extended synaptotagmin 2	-1,429	1,78E-11	3,99E-09
BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	-3,438	1,82E-11	4,04E-09
CA8	carbonic anhydrase 8	2,294	1,91E-11	4,22E-09
HSPA2	heat shock protein family A (Hsp70) member 2	-2,496	2,34E-11	4,91E-09
MAT2A	methionine adenosyltransferase 2A	-1,858	2,36E-11	4,91E-09
S100A6	S100 calcium binding protein A6	-1,310	2,41E-11	4,97E-09
FGF5	fibroblast growth factor 5	2,578	2,47E-11	5,06E-09
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	2,213	2,61E-11	5,30E-09
ADCY4	adenylate cyclase 4	-1,676	3,62E-11	7,21E-09
IGFBP4	insulin like growth factor binding protein 4	-1,691	4,20E-11	8,23E-09
GMFB	glia maturation factor beta	1,744	5,39E-11	1,02E-08
C1S	complement C1s	2,672	5,66E-11	1,07E-08
RAB3B	RAB3B; member RAS oncogene family	2,288	6,39E-11	1,18E-08
GSDMC	gasdermin C	-3,465	8,13E-11	1,43E-08
VANGL1	VANGL planar cell polarity protein 1	-1,948	8,28E-11	1,45E-08
TLE1	TLE family member 1; transcriptional corepressor	1,431	8,41E-11	1,46E-08
SCN1B	sodium voltage-gated channel beta subunit 1	-1,823	9,64E-11	1,65E-08
NAV2	neuron navigator 2	1,334	9,81E-11	1,67E-08
TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3	3,042	1,02E-10	1,71E-08
CCDC3	coiled-coil domain containing 3	-3,656	1,03E-10	1,71E-08

SPHK1	sphingosine kinase 1	1,604	1,10E-10	1,81E-08
GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	1,584	1,21E-10	1,98E-08
RELB	RELB proto-oncogene; NF-kB subunit	2,365	1,29E-10	2,07E-08
ARL4C	ADP ribosylation factor like GTPase 4C	2,469	1,32E-10	2,10E-08
MUC4	mucin 4; cell surface associated	2,324	1,44E-10	2,26E-08
C3orf36	chromosome 3 open reading frame 36	-3,727	1,51E-10	2,34E-08
RASD1	ras related dexamethasone induced 1	2,732	1,62E-10	2,48E-08
RAMP2	receptor activity modifying protein 2	-3,226	2,28E-10	3,40E-08
STX11	syntaxin 11	2,338	2,33E-10	3,42E-08
MMP10	matrix metalloproteinase 10	5,490	2,33E-10	3,42E-08
P2RX4	purinergic receptor P2X 4	2,158	2,47E-10	3,60E-08
PALM	paralemmin	-3,118	2,61E-10	3,78E-08
STARD8	StAR related lipid transfer domain containing 8	-2,244	2,69E-10	3,86E-08
APOD	apolipoprotein D	3,112	2,96E-10	4,13E-08
CXXC5	CXXC finger protein 5	-2,043	2,98E-10	4,13E-08
MYOF	myoferlin	-1,312	3,00E-10	4,13E-08
ITGA3	integrin subunit alpha 3	-1,380	3,11E-10	4,22E-08
SEMA3F	semaphorin 3F	-1,404	3,29E-10	4,45E-08
SLC43A1	solute carrier family 43 member 1	1,475	3,50E-10	4,64E-08
TNFSF15	TNF superfamily member 15	3,436	3,56E-10	4,69E-08
MAN1A1	mannosidase alpha class 1A member 1	-1,425	3,94E-10	5,15E-08
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	1,778	4,09E-10	5,31E-08
NRG1	neuregulin 1	3,091	4,38E-10	5,58E-08
GRAP	GRB2 related adaptor protein	1,420	6,49E-10	7,92E-08
ZNF704	zinc finger protein 704	2,797	6,69E-10	8,13E-08
MERTK	MER proto-oncogene; tyrosine kinase	2,199	7,86E-10	9,46E-08
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)	-3,135	8,09E-10	9,70E-08
KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	-1,867	8,23E-10	9,82E-08
C19orf33	chromosome 19 open reading frame 33	-3,486	8,42E-10	9,96E-08
ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	-1,401	1,05E-09	1,22E-07
KCNN2	potassium calcium-activated channel subfamily N member 2	2,362	1,06E-09	1,23E-07
KLF4	Kruppel like factor 4	-2,221	1,07E-09	1,23E-07
ADRB2	adrenoceptor beta 2	-1,889	1,07E-09	1,23E-07
ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family member A1	-4,038	1,07E-09	1,23E-07
HSPA12B	heat shock protein family A (Hsp70) member 12B	-2,151	1,13E-09	1,28E-07
SYNE3	spectrin repeat containing nuclear envelope family member 3	-1,985	1,20E-09	1,33E-07

PIK3CD	phosphatidylinositol-4;5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta	2,007	1,25E-09	1,37E-07
MGP	matrix Gla protein	-3,560	1,29E-09	1,40E-07
H2AC14	H2A clustered histone 14	-2,186	1,31E-09	1,42E-07
ADARB1	adenosine deaminase RNA specific B1	-1,400	1,38E-09	1,47E-07
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	4,061	1,47E-09	1,55E-07
COL27A1	collagen type XXVII alpha 1 chain	1,496	1,74E-09	1,81E-07
PAPLN	papilin; proteoglycan like sulfated glycoprotein	2,497	1,87E-09	1,93E-07
CTSK	cathepsin K	2,596	2,10E-09	2,13E-07
SLC16A6	solute carrier family 16 member 6	3,934	2,17E-09	2,19E-07
SLC39A6	solute carrier family 39 member 6	1,643	2,21E-09	2,23E-07
CASKIN2	CASK interacting protein 2	-1,516	2,34E-09	2,34E-07
ELK3	ETS transcription factor ELK3	-1,656	2,48E-09	2,46E-07
PIM3	Pim-3 proto-oncogene; serine/threonine kinase	2,162	2,61E-09	2,57E-07
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	2,563	2,65E-09	2,58E-07
ESM1	endothelial cell specific molecule 1	1,804	2,70E-09	2,63E-07
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	3,098	2,72E-09	2,64E-07
TRIM2	tripartite motif containing 2	-1,751	2,74E-09	2,64E-07
ID2	inhibitor of DNA binding 2	1,972	2,88E-09	2,76E-07
ZCCHC7	zinc finger CCHC-type containing 7	1,652	2,89E-09	2,76E-07
CSF2	colony stimulating factor 2	2,711	2,94E-09	2,79E-07
ARHGEF3	Rho guanine nucleotide exchange factor 3	-2,090	3,01E-09	2,83E-07
EPHA4	EPH receptor A4	-2,042	3,58E-09	3,33E-07
DNM3	dynamins 3	-2,365	3,71E-09	3,43E-07
SNAI1	snail family transcriptional repressor 1	1,718	3,87E-09	3,55E-07
KIAA1549	KIAA1549	1,549	3,92E-09	3,59E-07
OAF	out at first homolog	-1,796	4,25E-09	3,87E-07
PTPRR	protein tyrosine phosphatase receptor type R	-2,287	4,37E-09	3,94E-07
MT1A	metallothionein 1A	1,971	4,65E-09	4,12E-07
CAPN11	calpain 11	-2,652	5,08E-09	4,43E-07
MT1B	metallothionein 1B	1,882	5,55E-09	4,78E-07
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	1,776	5,69E-09	4,87E-07
PLAC9	placenta associated 9	-1,805	6,11E-09	5,17E-07
ATP1B1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1	1,438	6,19E-09	5,21E-07
IL6	interleukin 6	2,874	6,26E-09	5,25E-07
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2	1,726	6,61E-09	5,51E-07
CCNG2	cyclin G2	1,404	6,67E-09	5,54E-07
PI16	peptidase inhibitor 16	-3,977	6,86E-09	5,64E-07
ZNF385D	zinc finger protein 385D	3,411	7,50E-09	6,13E-07
SELPLG	selectin P ligand	-2,494	7,53E-09	6,14E-07
TCN2	transcobalamin 2	-1,638	7,81E-09	6,35E-07

NFATC2	nuclear factor of activated T cells 2	2,160	7,92E-09	6,42E-07
SIGIRR	single Ig and TIR domain containing	-1,558	8,18E-09	6,59E-07
STEAP3	STEAP3 metalloreductase	1,912	8,87E-09	7,08E-07
CHN1	chimerin 1	-1,402	8,91E-09	7,09E-07
KCNN3	potassium calcium-activated channel subfamily N member 3	-1,782	9,73E-09	7,70E-07
C11orf91	chromosome 11 open reading frame 91	-1,960	9,92E-09	7,82E-07
ANKRD36C	ankyrin repeat domain 36C	-1,533	9,95E-09	7,82E-07
TGFB111	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	1,335	1,02E-08	8,02E-07
GPBR1	G protein-coupled estrogen receptor 1	-2,359	1,14E-08	8,76E-07
KRT19	keratin 19	-1,836	1,18E-08	8,88E-07
TMEM150C	transmembrane protein 150C	-2,089	1,41E-08	1,04E-06
USP31	ubiquitin specific peptidase 31	1,610	1,49E-08	1,09E-06
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	1,529	1,54E-08	1,11E-06
ZNF608	zinc finger protein 608	-1,904	1,57E-08	1,13E-06
LRATD2	LRAT domain containing 2	2,432	1,62E-08	1,15E-06
FGF2	fibroblast growth factor 2	-1,448	1,63E-08	1,16E-06
SLC7A7	solute carrier family 7 member 7	2,065	1,65E-08	1,17E-06
CD180	CD180 molecule	-3,708	1,67E-08	1,18E-06
SLFN11	schlafen family member 11	-1,688	1,70E-08	1,20E-06
CRYBB3	crystallin beta B3	-1,790	1,70E-08	1,20E-06
FHL2	four and a half LIM domains 2	1,657	1,79E-08	1,24E-06
CDC25B	cell division cycle 25B	-1,412	1,81E-08	1,25E-06
PPIF	peptidylprolyl isomerase F	1,663	1,91E-08	1,30E-06
FIGNL2	figletin like 2	-1,407	2,05E-08	1,39E-06
CMKLR1	chemerin chemokine-like receptor 1	-5,523	2,08E-08	1,40E-06
BACH1	BTB domain and CNC homolog 1	1,561	2,08E-08	1,40E-06
AIF1L	allograft inflammatory factor 1 like	-2,540	2,21E-08	1,47E-06
NUAK2	NUAK family kinase 2	2,233	2,35E-08	1,54E-06
ADAMTS6	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 6	-1,904	2,81E-08	1,80E-06
SLC43A2	solute carrier family 43 member 2	1,553	2,89E-08	1,85E-06
CD34	CD34 molecule	-4,030	3,16E-08	2,01E-06
FAT4	FAT atypical cadherin 4	-1,606	3,23E-08	2,05E-06
POPDC3	popeye domain containing 3	3,172	3,83E-08	2,39E-06
EXOC3L2	exocyst complex component 3 like 2	-2,030	4,36E-08	2,64E-06
PPP1R14A	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 14A	-2,665	4,40E-08	2,66E-06
LRIG3	leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 3	1,486	4,61E-08	2,76E-06
AHSA2P	activator of HSP90 ATPase homolog 2; pseudogene	-1,357	4,63E-08	2,77E-06
ELFN1	extracellular leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 1	-1,919	4,71E-08	2,81E-06

QPCTL	glutaminy-peptide cyclotransferase like	1,549	5,11E-08	3,00E-06
RUNX1	RUNX family transcription factor 1	1,825	5,12E-08	3,00E-06
CLEC1A	C-type lectin domain family 1 member A	2,003	5,33E-08	3,10E-06
F2RL1	F2R like trypsin receptor 1	3,304	5,34E-08	3,10E-06
C1QTNF1	C1q and TNF related 1	2,065	5,59E-08	3,22E-06
MEIS2	Meis homeobox 2	-1,455	5,70E-08	3,28E-06
MTMR11	myotubularin related protein 11	-1,475	5,73E-08	3,29E-06
ZSWIM4	zinc finger SWIM-type containing 4	1,581	5,89E-08	3,37E-06
EPHA2	EPH receptor A2	1,790	5,97E-08	3,41E-06
IRAK2	interleukin 1 receptor associated kinase 2	1,573	6,02E-08	3,42E-06
TRIB1	tribbles pseudokinase 1	1,650	6,15E-08	3,49E-06
AGER	advanced glycosylation end- product specific receptor	-2,000	6,41E-08	3,60E-06
PGF	placental growth factor	1,496	6,50E-08	3,63E-06
E2F8	E2F transcription factor 8	-2,091	6,57E-08	3,66E-06
ZNF326	zinc finger protein 326	-1,470	6,81E-08	3,79E-06
SRSF8	serine and arginine rich splicing factor 8	-1,834	6,97E-08	3,85E-06
NPFFR2	neuropeptide FF receptor 2	2,179	7,38E-08	4,04E-06
MALT1	MALT1 paracaspase	-1,517	8,85E-08	4,74E-06
ITGA6	integrin subunit alpha 6	-1,477	8,93E-08	4,75E-06
CCM2L	CCM2 like scaffold protein	-1,762	8,98E-08	4,77E-06
CCNJL	cyclin J like	1,374	9,38E-08	4,94E-06
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	1,902	9,44E-08	4,96E-06
POU2F2	POU class 2 homeobox 2	1,777	9,44E-08	4,96E-06
ARHGAP20	Rho GTPase activating protein 20	-2,106	9,94E-08	5,21E-06
APEH	acylaminoacyl-peptide hydrolase	1,333	1,00E-07	5,24E-06
TMEM163	transmembrane protein 163	2,311	1,04E-07	5,36E-06
BCL2	BCL2 apoptosis regulator	1,320	1,06E-07	5,47E-06
SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family member 2B1	2,549	1,07E-07	5,52E-06
BIVM	basic; immunoglobulin-like variable motif containing	-1,361	1,09E-07	5,56E-06
RELN	reelin	2,202	1,09E-07	5,57E-06
ACSL5	acyl-CoA synthetase long chain family member 5	-1,828	1,10E-07	5,60E-06
GMFG	glia maturation factor gamma	3,000	1,20E-07	6,04E-06
DOCK10	dedicator of cytokinesis 10	1,608	1,34E-07	6,48E-06
DAPK2	death associated protein kinase 2	1,582	1,40E-07	6,78E-06
MYO1B	myosin IB	2,179	1,45E-07	6,99E-06
GDF15	growth differentiation factor 15	2,226	1,48E-07	7,10E-06
MRAS	muscle RAS oncogene homolog	-2,558	1,49E-07	7,15E-06
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	-2,017	1,58E-07	7,49E-06
BAMBI	BMP and activin membrane bound inhibitor	1,686	1,61E-07	7,54E-06
ZNF436	zinc finger protein 436	-1,537	1,69E-07	7,87E-06

SLC19A1	solute carrier family 19 member 1	1,823	1,72E-07	7,97E-06
MT1L	metallothionein 1L; pseudogene	1,965	1,79E-07	8,23E-06
GGT5	gamma-glutamyltransferase 5	-2,656	2,07E-07	9,38E-06
HS3ST1	heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 1	-2,796	2,08E-07	9,38E-06
GPR157	G protein-coupled receptor 157	1,977	2,10E-07	9,44E-06
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1	-1,947	2,16E-07	9,66E-06
ZC3H12C	zinc finger CCCH-type containing 12C	1,473	2,17E-07	9,68E-06
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	1,631	2,19E-07	9,77E-06
ARHGEF15	Rho guanine nucleotide exchange factor 15	-1,508	2,31E-07	1,02E-05
REPS2	RALBP1 associated Eps domain containing 2	1,701	2,37E-07	1,03E-05
CDC42EP5	CDC42 effector protein 5	1,331	2,39E-07	1,04E-05
ATF3	activating transcription factor 3	3,482	2,45E-07	1,06E-05
TSC22D3	TSC22 domain family member 3	-1,539	2,53E-07	1,09E-05
DNMBP	dynamin binding protein	1,348	2,55E-07	1,09E-05
ARSJ	arylsulfatase family member J	1,724	2,62E-07	1,11E-05
AMOTL1	angiomin like 1	-1,450	2,81E-07	1,19E-05
PTGDS	prostaglandin D2 synthase	-2,500	2,90E-07	1,22E-05
TOP2A	DNA topoisomerase II alpha	-2,761	2,90E-07	1,22E-05
PLAT	plasminogen activator; tissue type	-2,037	2,94E-07	1,23E-05
PRDM1	PR/SET domain 1	3,276	3,05E-07	1,27E-05
PRICKLE1	prickle planar cell polarity protein 1	-2,146	3,06E-07	1,27E-05
NHSL2	NHS like 2	-1,960	3,12E-07	1,29E-05
TBXA2R	thromboxane A2 receptor	-1,557	3,43E-07	1,39E-05
LGALS	galectin like	-1,332	3,68E-07	1,48E-05
TIFA	TRAF interacting protein with forkhead associated domain	1,961	3,72E-07	1,49E-05
CRTAC1	cartilage acidic protein 1	-2,813	3,73E-07	1,49E-05
MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	-1,620	3,74E-07	1,49E-05
CLDN15	claudin 15	-1,894	3,79E-07	1,51E-05
BAIAP2	BAR/IMD domain containing adaptor protein 2	1,468	3,94E-07	1,56E-05
RNF19B	ring finger protein 19B	1,651	4,03E-07	1,59E-05
ZRANB2	zinc finger RANBP2-type containing 2	-1,427	4,08E-07	1,61E-05
C1QTNF6	C1q and TNF related 6	-1,484	4,14E-07	1,62E-05
PIM1	Pim-1 proto-oncogene; serine/threonine kinase	2,662	4,23E-07	1,64E-05
LAMC2	laminin subunit gamma 2	5,072	4,33E-07	1,68E-05
RRAGD	Ras related GTP binding D	1,642	4,40E-07	1,70E-05
ARGLU1	arginine and glutamate rich 1	-1,417	4,43E-07	1,71E-05
CLEC3B	C-type lectin domain family 3 member B	-1,345	4,48E-07	1,72E-05

MYC	MYC proto-oncogene; bHLH transcription factor	1,536	4,48E-07	1,72E-05
ABCA7	ATP binding cassette subfamily A member 7	-1,923	4,51E-07	1,73E-05
HYAL1	hyaluronidase 1	-1,748	4,54E-07	1,74E-05
CXADR	CXADR Ig-like cell adhesion molecule	1,614	4,72E-07	1,79E-05
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	2,491	4,88E-07	1,85E-05
VPS37C	VPS37C subunit of ESCRT-I	1,315	4,89E-07	1,85E-05
PPP1R3B	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B	2,058	5,01E-07	1,89E-05
RND3	Rho family GTPase 3	1,691	5,06E-07	1,90E-05
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor 5	-1,681	5,08E-07	1,91E-05
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	2,044	5,14E-07	1,93E-05
SLC25A37	solute carrier family 25 member 37	1,331	5,22E-07	1,95E-05
RNF125	ring finger protein 125	-1,671	5,31E-07	1,97E-05
TNFRSF25	TNF receptor superfamily member 25	-1,307	5,55E-07	2,05E-05
ANKRD36	ankyrin repeat domain 36	-1,342	5,79E-07	2,13E-05
UCP2	uncoupling protein 2	-1,745	5,84E-07	2,15E-05
NAV3	neuron navigator 3	2,023	5,87E-07	2,15E-05
PDE7B	phosphodiesterase 7B	1,986	5,88E-07	2,16E-05
SLC29A4	solute carrier family 29 member 4	1,548	5,94E-07	2,17E-05
NR1D1	nuclear receptor subfamily 1 group D member 1	2,397	6,05E-07	2,20E-05
PLCD3	phospholipase C delta 3	-1,467	6,19E-07	2,24E-05
CMTM8	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 8	1,552	6,33E-07	2,28E-05
ANGPT2	angiopoietin 2	3,076	6,43E-07	2,31E-05
LAMP3	lysosomal associated membrane protein 3	1,574	6,82E-07	2,43E-05
SNCAIP	synuclein alpha interacting protein	2,585	7,10E-07	2,52E-05
ATP8B1	ATPase phospholipid transporting 8B1	-1,508	7,49E-07	2,63E-05
F3	coagulation factor III; tissue factor	2,559	7,95E-07	2,76E-05
FAM107A	family with sequence similarity 107 member A	-1,673	8,41E-07	2,89E-05
CLDN14	claudin 14	1,717	8,87E-07	3,02E-05
TNFAIP8	TNF alpha induced protein 8	1,660	9,39E-07	3,18E-05
ZNF844	zinc finger protein 844	1,682	9,86E-07	3,32E-05
ARL15	ADP ribosylation factor like GTPase 15	-2,202	1,03E-06	3,45E-05
ABI3	ABI family member 3	-1,368	1,04E-06	3,46E-05
MT1X	metallothionein 1X	2,196	1,05E-06	3,51E-05
DSEL	dermatan sulfate epimerase like	1,437	1,06E-06	3,51E-05
FBLN2	fibulin 2	-1,874	1,11E-06	3,67E-05
GCKR	glucokinase regulator	-1,664	1,12E-06	3,68E-05
DHX34	DExH-box helicase 34	1,370	1,15E-06	3,75E-05

SYNC	syncoilin; intermediate filament protein	-1,675	1,17E-06	3,82E-05
P4HA3	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3	1,643	1,17E-06	3,82E-05
HIVEP2	HIVEP zinc finger 2	1,494	1,23E-06	3,98E-05
EPHX4	epoxide hydrolase 4	1,609	1,27E-06	4,08E-05
CHST2	carbohydrate sulfotransferase 2	1,370	1,27E-06	4,08E-05
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	2,202	1,28E-06	4,12E-05
FBXO32	F-box protein 32	1,532	1,32E-06	4,23E-05
PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	1,639	1,37E-06	4,35E-05
PLK1	polo like kinase 1	-2,205	1,40E-06	4,42E-05
ETV4	ETS variant transcription factor 4	1,313	1,52E-06	4,75E-05
LIPG	lipase G; endothelial type	1,995	1,58E-06	4,91E-05
SPRED2	sprouty related EVH1 domain containing 2	1,486	1,58E-06	4,92E-05
APOL1	apolipoprotein L1	-1,433	1,58E-06	4,92E-05
TOX2	TOX high mobility group box family member 2	1,937	1,58E-06	4,92E-05
SLC25A33	solute carrier family 25 member 33	1,680	1,60E-06	4,96E-05
GJA5	gap junction protein alpha 5	-3,635	1,60E-06	4,96E-05
PEG10	paternally expressed 10	2,621	1,64E-06	5,05E-05
ERMAP	erythroblast membrane associated protein (Scianna blood group)	1,463	1,80E-06	5,47E-05
OSGIN1	oxidative stress induced growth inhibitor 1	1,644	1,91E-06	5,75E-05
MT1G	metallothionein 1G	2,083	1,92E-06	5,77E-05
LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6	-2,130	1,94E-06	5,79E-05
SIPA1L2	signal induced proliferation associated 1 like 2	1,520	1,97E-06	5,88E-05
PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2	1,362	1,98E-06	5,90E-05
ITGA9	integrin subunit alpha 9	-1,725	2,01E-06	5,97E-05
ST3GAL2	ST3 beta-galactoside alpha-2;3-sialyltransferase 2	-1,368	2,05E-06	6,05E-05
NLE1	notchless homolog 1	1,370	2,14E-06	6,26E-05
ADAMTSL1	ADAMTS like 1	-1,884	2,18E-06	6,34E-05
HIF3A	hypoxia inducible factor 3 subunit alpha	-1,910	2,25E-06	6,50E-05
EFNA4	ephrin A4	1,316	2,25E-06	6,50E-05
TCF7L1	transcription factor 7 like 1	1,509	2,29E-06	6,60E-05
OLFML2A	olfactomedin like 2A	-2,253	2,30E-06	6,62E-05
TBXAS1	thromboxane A synthase 1	2,207	2,46E-06	7,02E-05
SLC7A5	solute carrier family 7 member 5	1,825	2,46E-06	7,02E-05
TRAF5	TNF receptor associated factor 5	1,354	2,51E-06	7,14E-05
OCIAD2	OCIA domain containing 2	1,432	2,56E-06	7,26E-05
RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor 4	-1,565	2,64E-06	7,41E-05
RNF24	ring finger protein 24	1,356	2,81E-06	7,83E-05
EGR1	early growth response 1	2,686	2,82E-06	7,85E-05
AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	-2,050	2,83E-06	7,85E-05

SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	-1,331	2,88E-06	7,98E-05
SPNS2	sphingolipid transporter 2	-1,849	2,97E-06	8,22E-05
MCF2L	MCF,2 cell line derived transforming sequence like	-1,669	3,10E-06	8,52E-05
CENPF	centromere protein F	-2,047	3,11E-06	8,54E-05
GAB2	GRB2 associated binding protein 2	1,673	3,12E-06	8,55E-05
MPZL2	myelin protein zero like 2	-1,679	3,12E-06	8,55E-05
NOTCH2NL A	notch 2 N-terminal like A	1,795	3,16E-06	8,62E-05
ETV1	ETS variant transcription factor 1	2,298	3,17E-06	8,62E-05
MIR99AHG	mir-99a-let-7c cluster host gene	-1,448	3,24E-06	8,80E-05
ANKRD44	ankyrin repeat domain 44	2,023	3,42E-06	9,25E-05
PLCG2	phospholipase C gamma 2	-1,987	3,47E-06	9,34E-05
ACP5	acid phosphatase 5; tartrate resistant	-2,024	3,47E-06	9,35E-05
DUSP8	dual specificity phosphatase 8	1,431	3,49E-06	9,38E-05
LCN10	lipocalin 10	-2,084	3,51E-06	9,42E-05
CLDN1	claudin 1	2,111	3,62E-06	9,66E-05
CASTOR1	cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1	-1,328	3,63E-06	9,67E-05
PDGFRL	platelet derived growth factor receptor like	1,573	3,65E-06	9,71E-05
GK	glycerol kinase	1,965	3,65E-06	9,71E-05
NOTCH2	notch receptor 2	1,842	3,69E-06	9,76E-05
ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19	-1,609	3,69E-06	9,76E-05
TNFSF18	TNF superfamily member 18	2,698	3,74E-06	9,89E-05
ITGB3	integrin subunit beta 3	1,495	3,94E-06	0,000103268
FAH	fumarylacetoacetate hydrolase	1,330	4,15E-06	0,000107953
H1-5	H1,5 linker histone; cluster member	-2,151	4,19E-06	0,000108767
STK32B	serine/threonine kinase 32B	1,319	4,28E-06	0,000110827
LGALS9	galectin 9	-2,275	4,42E-06	0,000113706
PCDH10	protocadherin 10	-2,003	4,43E-06	0,000113771
CYP1B1	cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1	-3,358	4,55E-06	0,000116638
NPTX2	neuronal pentraxin 2	1,994	4,63E-06	0,000118078
DRP2	dystrophin related protein 2	2,166	5,06E-06	0,000126769
STC2	stanniocalcin 2	2,059	5,41E-06	0,000134106
PDZD2	PDZ domain containing 2	1,755	5,47E-06	0,000135421
PTP4A3	protein tyrosine phosphatase 4A3	-1,368	5,49E-06	0,000135844
HRCT1	histidine rich carboxyl terminus 1	-1,943	5,52E-06	0,000135982

OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	-1,998	5,58E-06	0,000137124
ELAC1	elaC ribonuclease Z 1	-1,623	5,71E-06	0,000139332
C1orf74	chromosome 1 open reading frame 74	-1,468	5,74E-06	0,00013966
IPMK	inositol polyphosphate multikinase	1,399	5,83E-06	0,000141412
PPP1R10	protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	-1,711	5,85E-06	0,000141543
A2M	alpha-2-macroglobulin	-2,249	6,18E-06	0,00014836
ARG2	arginase 2	2,171	6,84E-06	0,000160756
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3	-2,494	6,85E-06	0,000160756
UHRF1	ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1	-1,491	6,97E-06	0,000163103
N4BP3	NEDD4 binding protein 3	1,481	7,00E-06	0,000163508
ENOSF1	enolase superfamily member 1	-1,404	7,33E-06	0,000169994
MKI67	marker of proliferation Ki-67	-3,370	7,34E-06	0,000169994
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	1,351	7,64E-06	0,000176313
SRXN1	sulfiredoxin 1	1,629	8,06E-06	0,000183574
ZNF366	zinc finger protein 366	-1,712	8,11E-06	0,000184255
EMCN	endomucin	-1,885	8,11E-06	0,000184255
TLR2	toll like receptor 2	1,752	8,13E-06	0,000184376
INSYN2B	inhibitory synaptic factor family member 2B	1,671	8,54E-06	0,000191208
OR1L8	olfactory receptor family 1 subfamily L member 8	1,599	8,95E-06	0,000199614
PCDH7	protocadherin 7	-1,804	9,06E-06	0,000201665
HCFC1R1	host cell factor C1 regulator 1	-1,328	9,11E-06	0,00020217
FGF12	fibroblast growth factor 12	-1,650	9,12E-06	0,00020217
ZNF589	zinc finger protein 589	-1,413	9,96E-06	0,000218411
CYB5R2	cytochrome b5 reductase 2	1,584	1,02E-05	0,000222162
LXN	latexin	1,645	1,03E-05	0,000223682
DTX4	deltex E3 ubiquitin ligase 4	1,490	1,09E-05	0,000234488
IGFBP5	insulin like growth factor binding protein 5	-3,893	1,13E-05	0,000243107
RRM2	ribonucleotide reductase regulatory subunit M2	-3,289	1,14E-05	0,000244012
ETV5	ETS variant transcription factor 5	1,998	1,26E-05	0,000265145
H2AC13	H2A clustered histone 13	-1,356	1,29E-05	0,00027118
EEFSEC	eukaryotic elongation factor; selenocysteine-tRNA specific	1,508	1,34E-05	0,000279792

SLC4A7	solute carrier family 4 member 7	1,303	1,35E-05	0,000280579
NEK10	NIMA related kinase 10	1,606	1,41E-05	0,00029057
FRY	FRY microtubule binding protein	-1,302	1,43E-05	0,000294012
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	1,343	1,46E-05	0,000296901
RGS4	regulator of G protein signaling 4	-2,265	1,47E-05	0,000298249
MAMDC2	MAM domain containing 2	2,962	1,48E-05	0,000301043
FAM72C	family with sequence similarity 72 member C	-1,324	1,51E-05	0,000305377
ASAP3	ArfGAP with SH3 domain; ankyrin repeat and PH domain 3	-1,478	1,54E-05	0,000311255
ITGA10	integrin subunit alpha 10	-1,548	1,64E-05	0,000328384
PIK3C2B	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta	-1,379	1,66E-05	0,000331648
CEACAM1	CEA cell adhesion molecule 1	1,935	1,82E-05	0,000357392
SULT1A1	sulfotransferase family 1A member 1	-1,352	1,87E-05	0,000365988
ARHGAP32	Rho GTPase activating protein 32	1,481	1,89E-05	0,000369186
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	3,165	1,92E-05	0,000373406
CUBN	cubilin	-1,320	1,93E-05	0,000375475
SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family member 4A1	1,489	2,06E-05	0,00039452
RNF144A	ring finger protein 144A	1,899	2,08E-05	0,000397976
WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	-1,683	2,12E-05	0,000404313
CDC45	cell division cycle 45	-1,663	2,24E-05	0,000421551
SLC11A2	solute carrier family 11 member 2	1,382	2,24E-05	0,000421741
MMP1	matrix metalloproteinase 1	2,998	2,29E-05	0,000427848
GJA4	gap junction protein alpha 4	-1,362	2,30E-05	0,000429741
NRIP3	nuclear receptor interacting protein 3	1,591	2,33E-05	0,000434996
NGEF	neuronal guanine nucleotide exchange factor	-1,628	2,35E-05	0,000437934
PTX3	pentraxin 3	1,889	2,40E-05	0,00044468
FABP5	fatty acid binding protein 5	1,534	2,58E-05	0,0004702
SLITRK4	SLIT and NTRK like family member 4	1,443	2,73E-05	0,000494718
SIRPB2	signal regulatory protein beta 2	1,411	2,79E-05	0,000502976
AXIN2	axin 2	1,864	2,85E-05	0,000511031
H2AC11	H2A clustered histone 11	-2,192	2,95E-05	0,000522517

DKK2	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2	-2,964	3,00E-05	0,000530064
PZP	PZP alpha-2-macroglobulin like	-1,512	3,15E-05	0,000553195
LONRF3	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	1,611	3,17E-05	0,000556399
SUSD5	sushi domain containing 5	1,497	3,24E-05	0,000564922
PIK3IP1	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	1,323	3,35E-05	0,000580466
MT1H	metallothionein 1H	1,587	3,43E-05	0,000592722
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	-1,464	3,51E-05	0,000603129
TFF3	trefoil factor 3	-1,343	3,55E-05	0,000608571
BCL2L11	BCL2 like 11	1,903	3,66E-05	0,000622817
C5orf30	chromosome 5 open reading frame 30	1,932	3,68E-05	0,000623886
KLF5	Kruppel like factor 5	2,246	3,78E-05	0,000637626
KIAA0040	KIAA0040	2,183	4,11E-05	0,000681039
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1,623	4,27E-05	0,000704623
GSTM4	glutathione S-transferase mu 4	1,628	4,31E-05	0,000708949
CLMN	calmin	1,422	4,37E-05	0,000716923
TLL1	tolloid like 1	1,561	4,46E-05	0,000727302
IRF6	interferon regulatory factor 6	-1,580	4,56E-05	0,000739866
F2RL2	coagulation factor II thrombin receptor like 2	3,263	4,94E-05	0,000790811
DGKA	diacylglycerol kinase alpha	-1,410	4,96E-05	0,000791854
AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3	1,514	5,20E-05	0,000823909
VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1	-1,527	5,61E-05	0,000879
ANTXR1	ANTXR cell adhesion molecule 1	-1,454	5,62E-05	0,000880252
SEC31B	SEC31 homolog B; COPII coat complex component	-1,370	5,63E-05	0,000880419
TESC	tescalcin	-1,418	5,74E-05	0,000895514
UBE2T	ubiquitin conjugating enzyme E2 T	-1,533	5,76E-05	0,000897574
LIPH	lipase H	1,345	5,88E-05	0,000913245
FOXM1	forkhead box M1	-2,142	5,97E-05	0,000922941
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	1,578	6,02E-05	0,000929687
ELN	elastin	-1,907	6,07E-05	0,000934352

KIAA1211L	KIAA1211 like	-1,366	6,20E-05	0,000949559
ABHD17C	abhydrolase domain containing 17C	1,480	6,50E-05	0,000984254
STAP2	signal transducing adaptor family member 2	1,519	6,91E-05	0,001038909
ERVK13-1	endogenous retrovirus group K13 member 1	-1,325	7,01E-05	0,00105017
NEXN	nexilin F-actin binding protein	-1,730	7,12E-05	0,001063218
GAREM1	GRB2 associated regulator of MAPK1 subtype 1	1,441	7,24E-05	0,001079063
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	-2,305	7,30E-05	0,001087536
HTR1D	5-hydroxytryptamine receptor 1D	-1,660	7,54E-05	0,001117164
CHST15	carbohydrate sulfotransferase 15	1,708	8,05E-05	0,001175492
CTSH	cathepsin H	-1,687	8,30E-05	0,001205874
FAM83G	family with sequence similarity 83 member G	1,358	9,34E-05	0,001326942
SLC29A3	solute carrier family 29 member 3	1,390	9,96E-05	0,001397071
SYT14	synaptotagmin 14	1,555	0,000107279	0,001481305
LINC00346	long intergenic non-protein coding RNA 346	-1,374	0,000113499	0,001554113
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	1,387	0,000116053	0,001580839
GIPC3	GIPC PDZ domain containing family member 3	-1,601	0,00011825	0,001604929
SULT1E1	sulfotransferase family 1E member 1	-1,559	0,00011977	0,001622205
MT1M	metallothionein 1M	1,588	0,000129844	0,001738033
KHDRBS3	KH RNA binding domain containing; signal transduction associated 3	1,531	0,000133006	0,001775826
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	1,330	0,00013828	0,001828739
ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1	1,876	0,000139364	0,001840125
GPR52	G protein-coupled receptor 52	-1,549	0,000146066	0,001913221
MYOZ2	myozenin 2	-1,483	0,000147307	0,001927552
LACC1	laccase domain containing 1	1,342	0,000155191	0,002003747
CHAC1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	1,931	0,00015712	0,002024664
CYP1A1	cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	-2,706	0,000163903	0,002092558
ARID3B	AT-rich interaction domain 3B	1,357	0,000166987	0,002125729
ZNF286A	zinc finger protein 286A	1,465	0,00016879	0,002143481
ITM2C	integral membrane protein 2C	1,926	0,000175777	0,002212462

ANO2	anoctamin 2	-1,667	0,00017798 2	0,00223640 4
METTL7A	methyltransferase like 7A	-2,236	0,00017817 5	0,00223776 4
TSPAN2	tetraspanin 2	-1,414	0,00018265 7	0,00227769 7
LGALS9B	galectin 9B	-1,306	0,00018449 3	0,00229732 3
DTNA	dystrobrevin alpha	1,834	0,00018467 4	0,00229848 3
CCNA2	cyclin A2	-1,844	0,00018676 2	0,00231788 1
ATPCKMT	ATP synthase c subunit lysine N-methyltransferase	-1,305	0,00019715	0,00240921 1
CORO2B	coronin 2B	1,776	0,00020416 1	0,00247644 7
SPIN2B	spindlin family member 2B	-1,332	0,00020506 1	0,00248358 1
NOSTRIN	nitric oxide synthase trafficking	-1,787	0,00020602 1	0,00249095
NCAPG	non-SMC condensin I complex subunit G	-2,330	0,00021683 7	0,00260152 2
NLGN1	neuroligin 1	1,458	0,00021963 3	0,00262597 2
HPSE	heparanase	1,778	0,00022632 8	0,00268746 3
TK1	thymidine kinase 1	-1,743	0,00022739 5	0,00269840 9
RMI1	RecQ mediated genome instability 1	-1,475	0,00023207 8	0,00274036 1
FCGR2A	Fc fragment of IgG receptor IIa	1,307	0,00028033 3	0,00318547 7
SPIN2A	spindlin family member 2A	-1,538	0,00028393 3	0,00321941 7
XAF1	XIAP associated factor 1	-1,891	0,00030828 7	0,00342600 7
MT1E	metallothionein 1E	1,606	0,00032424 2	0,00356258 8
ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	-1,912	0,00036740 5	0,00393312 5
PCDH17	protocadherin 17	-2,477	0,00037308 3	0,00397709 8
DLGAP5	DLG associated protein 5	-2,138	0,00038456 4	0,00407525 7
IL36B	interleukin 36 beta	1,757	0,00042340 6	0,00441031 6
AOX1	aldehyde oxidase 1	1,559	0,00043004 4	0,00446704 7
TEKT4P2	tektin 4 pseudogene 2	1,601	0,00043111	0,00447634 3
CLIC2	chloride intracellular channel 2	-1,715	0,00045650 6	0,00467896 1
FABP3	fatty acid binding protein 3	-2,314	0,00046362 6	0,00473476 6
TAGLN	transgelin	-1,514	0,00050082 3	0,00501568 6
DNER	delta/notch like EGF repeat containing	1,878	0,00053820 2	0,00531300 1

KIFC1	kinesin family member C1	-1,744	0,000592389	0,005763388
TACC3	transforming acidic coiled-coil containing protein 3	-1,716	0,000597873	0,0058001
PLCL1	phospholipase C like 1 (inactive)	1,448	0,000602313	0,005829689
SHCBP1	SHC binding and spindle associated 1	-1,911	0,000660142	0,006294644
TMEM178A	transmembrane protein 178A	-1,315	0,000661388	0,006299269
CROT	carnitine O-octanoyltransferase	-1,622	0,00068972	0,006519432
ARRDC4	arrestin domain containing 4	1,666	0,000716994	0,006719165
LHX4-AS1	LHX4 antisense RNA 1	-1,302	0,000722944	0,006755625
MT1F	metallothionein 1F	2,067	0,000761105	0,007039554
CAMK4	calcium/calmodulin dependent protein kinase IV	1,385	0,000779495	0,007184325
CGNL1	cingulin like 1	-1,335	0,000888869	0,007949548
KCNJ2	potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 2	1,384	0,000900822	0,008023645
CCNB2	cyclin B2	-1,710	0,000909313	0,008080081
SPIN4	spindlin family member 4	-1,322	0,001005178	0,008730942
FAM83D	family with sequence similarity 83 member D	-1,797	0,001025363	0,008846329
CFB	complement factor B	1,454	0,001051958	0,00900615
KIF26B	kinesin family member 26B	1,319	0,001088622	0,009265638
KIF20A	kinesin family member 20A	-1,597	0,001094022	0,009296327
ASPM	abnormal spindle microtubule assembly	-2,178	0,001105775	0,009369109
MYCN	MYCN proto-oncogene; bHLH transcription factor	-1,352	0,001122931	0,009489957
MPP4	membrane palmitoylated protein 4	1,343	0,001159029	0,009734122
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	-1,922	0,001271213	0,010479918
SORT1	sortilin 1	-1,348	0,001273137	0,010492484
KRT7	keratin 7	-1,735	0,00136188	0,011074342
E2F7	E2F transcription factor 7	1,309	0,00143404	0,011498893
TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha	1,311	0,001518987	0,011991548
PMCH	pro-melanin concentrating hormone	-1,642	0,00159126	0,012390677
ADGRA3	adhesion G protein-coupled receptor A3	1,385	0,001609313	0,012501584
ANLN	anillin actin binding protein	-2,026	0,001712618	0,013079588

SELL	selectin L	1,314	0,001720359	0,013127237
TPBG	trophoblast glycoprotein	1,454	0,00174087	0,013260623
EDIL3	EGF like repeats and discoidin domains 3	-1,539	0,001798989	0,013616398
CRYZ	crystallin zeta	-1,376	0,001806642	0,013661814
UNC13D	unc-13 homolog D	-1,349	0,0019246	0,014397126
LGR4	leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4	-1,347	0,001938785	0,014478286
CCND2	cyclin D2	1,368	0,002013587	0,014934907
TXNIP	thioredoxin interacting protein	1,492	0,002069272	0,015231721
ADAMTS18	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 18	-2,093	0,002228289	0,016086454
ALPL	alkaline phosphatase; biomineralization associated	-1,486	0,002456716	0,017311765
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-1,405	0,002467361	0,017363477
PELI2	pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2	1,691	0,002530886	0,01771553
MYBL2	MYB proto-oncogene like 2	-1,328	0,002836558	0,019268695
CPXM2	carboxypeptidase X; M14 family member 2	-1,587	0,003050517	0,020416401
SLC30A1	solute carrier family 30 member 1	1,307	0,003103532	0,02069205
LRRC4B	leucine rich repeat containing 4B	1,339	0,003277738	0,021579468
LURAP1L	leucine rich adaptor protein 1 like	1,693	0,003834652	0,024368111
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family member A1	-1,300	0,003877469	0,024572594
POSTN	periostin	-1,588	0,003899179	0,024668484
ACKR3	atypical chemokine receptor 3	1,313	0,004154473	0,025871745
KNL1	kinetochore scaffold 1	-1,516	0,004155407	0,025871745
ITGB8	integrin subunit beta 8	1,309	0,004753551	0,028690721
BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase	-1,612	0,004949122	0,029632645
CDC20	cell division cycle 20	-1,468	0,005083475	0,030182343
NLGN4Y	neuroligin 4 Y-linked	1,618	0,005374469	0,031426695
LHX6	LIM homeobox 6	-2,059	0,00566692	0,032627986
HLA-DRB1	major histocompatibility complex; class II; DR beta 1	2,424	0,006206551	0,034998017
FBN2	fibrillin 2	-1,850	0,007160374	0,039026715
SCARA3	scavenger receptor class A member 3	-1,614	0,007881164	0,041834717
IGF2BP1	insulin like growth factor 2 mRNA	2,036	0,00853551	0,04433972

	binding protein 1		1	7
--	-------------------	--	---	---

Tabela Suplementar 2. Marcadores scRNA-seq DEGs identificados para cada cluster celular e seus tipos celulares identificados.

Excel_file - Tabela Suplementar 2

Tabela Suplementar 3. DEGs identificados a partir da comparação de EC2 vs EC1 (670 DEGs no total)

Excel_file - Tabela Suplementar 3