

Introdução

As cardiomiopatias dilatada idiopática (DCM) e isquêmica (ICM) estão entre as principais causas da insuficiência cardíaca. Embora usualmente similares na apresentação e manejo clínico, estas condições possuem características, prognósticos e resposta aos tratamentos diferenciais. O entendimento dos mecanismos moleculares e fisiopatológicos comuns e específicos a estas doenças é crucial para o desenvolvimento de novas terapias.

Genes co-expressos são potencialmente co-regulados pelos mesmos fatores, tal que alterações significativas nos níveis de co-expressão podem sugerir redes regulatórias disfuncionais em condições específicas.

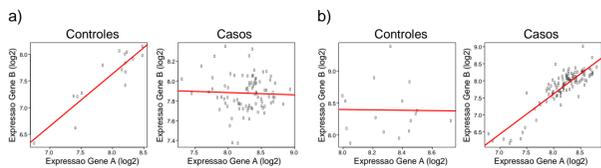


Fig 1. Exemplos de a) perda e b) ganho de correlação entre dois genes A e B no grupo caso em relação ao grupo controle.

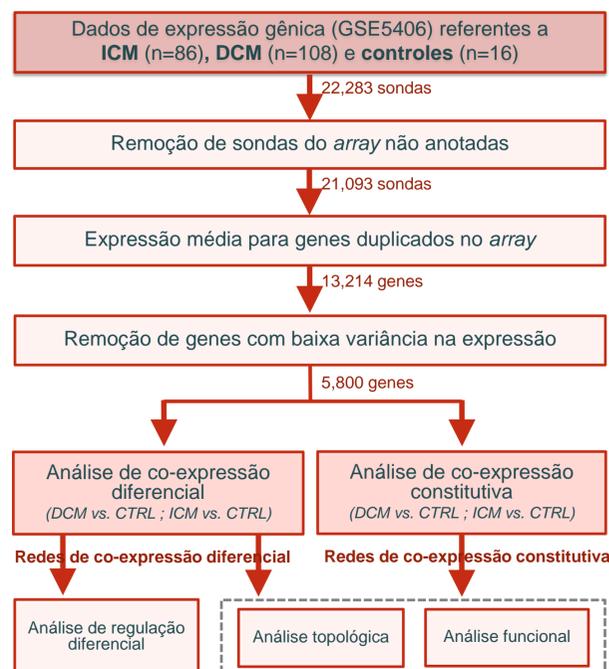
Objetivos

Construir e analisar redes de co-expressão diferencial (RCD) relacionadas a DCM e ICM para identificar similaridades e diferenças nas alterações observadas para conjuntos de genes e mecanismos regulatórios sob estas condições.

Métodos

- Expressão gênica de amostras de miocárdio de pacientes com ICM e DCM submetidos a transplante cardíaco, e de doadores saudáveis, foram obtidos do *Gene Expression Omnibus* (GSE5406; *Affymetrix Human Genome U133A array*)
- Pré-processamento e análise dos dados foram realizados no ambiente R/Bioconductor utilizando os pacotes:
 - GEOquery*, para processar e anotar dados de expressão;
 - DCGL v2.0*, para reconstruir redes de co-expressão diferencial com os métodos *Differential Correlation Profile* (DCp) e *Differential Correlation Enrichment* (DCE), e avaliar regulação diferencial com os métodos *DRsort* e *DRrank*
 - clusterProfiler*, para análise de enriquecimento funcional
- Coefficiente de correlação de Pearson foi adotado como medida de associação linear entre perfis de expressão
- Cytoscape v3.4 foi utilizado para visualização e análise topológica das redes
- Redes de co-expressão constitutivas (RCC) foram formadas a partir de genes fortemente correlacionados nos casos (ICM ou DCM) e nos controles ($|r| > 0.7$)

Fluxograma da metodologia adotada



Resultados

Análise topológica das redes de co-expressão

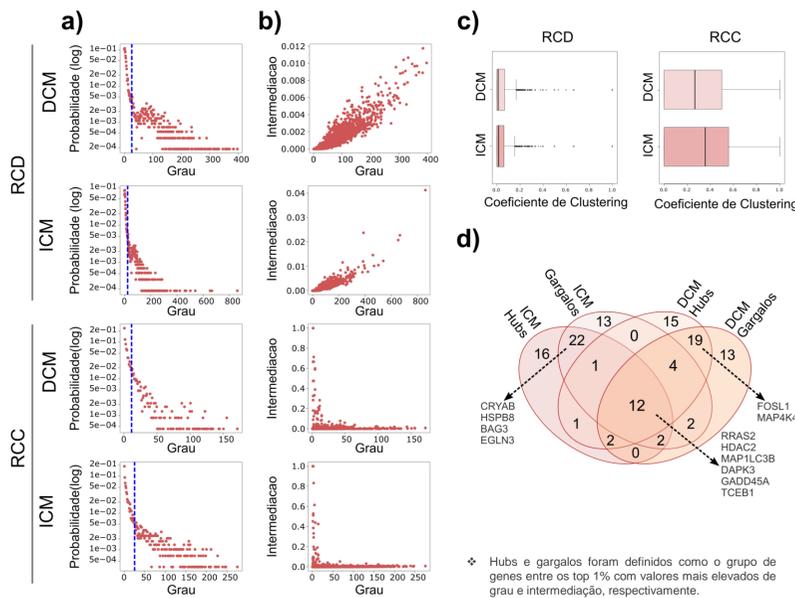


Fig 2. a) Distribuição de grau, b) relação entre intermediação e grau, c) distribuição de clustering e d) comparação entre hubs e gargalos identificados nas RCDs. RCD: Rede de co-expressão diferencial; RCC: Rede de co-expressão constitutiva.

Análise funcional das redes

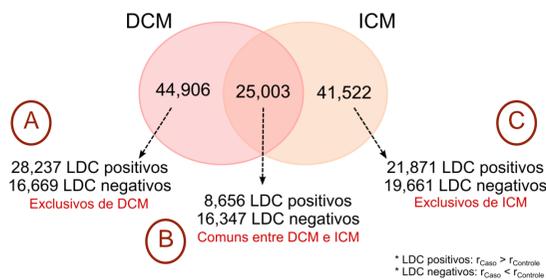


Fig 4. Diagrama de Venn comparando os LDCs identificados para DCM e ICM. Um total de 25,003 LDCs são comuns às doenças e apresentam mesmo tipo de perturbação.

Análise de regulação diferencial

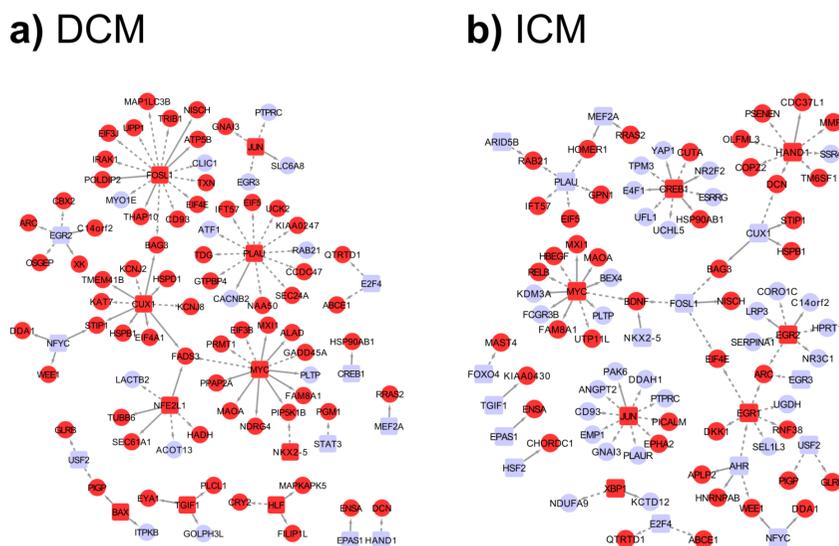


Fig 5. Subredes formadas a partir de LDRs que envolvem interações entre fatores de transcrição (TFs, nós quadrados) e genes (nós redondos) para a) DCM e b) ICM. A cor dos nós indica se o gene/TF pertence (vermelho) ou não (azul) ao respectivo grupo de GDCs identificados. Arestas tracejadas denotam LDCs negativos, enquanto arestas contínuas denotam LDCs positivos.

	DCM		ICM	
	RCD	RCC	RCD	RCC
Nº de GDCs/genos	920 / 5368	-- / 2285	757 / 5605	-- / 2873
Nº de LDCs/links	69909	13151	66525	36251
Nº de GDRs	781	--	612	--
Nº de LDRs	23764	--	21013	--
Grau médio	26.04 (± 49.13)	11.51 (± 20.50)	23.73 (± 46.57)	25.23 (± 41.48)
Grau Máximo	398	172	862	276
Intermediação média	3.93×10^{-4} (± 1.09×10^{-3})	1.10×10^{-2} (± 7.71×10^{-2})	3.68×10^{-4} (± 1.26×10^{-3})	5.94×10^{-3} (± 5.52×10^{-2})
Clustering médio	0.057 (± 0.119)	0.309 (± 0.316)	0.048 (± 0.098)	0.367 (± 0.302)

Genes diferencialmente correlacionados, LDCs: Links diferencialmente correlacionados, GDRs: Genes diferencialmente regulados, LDRs: Links diferencialmente regulados.

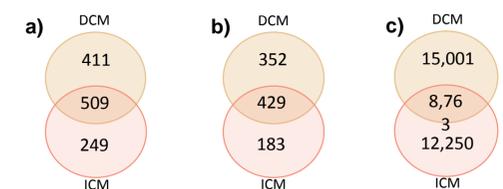


Fig 3. Diagramas de Venn comparando os a) GDCs, b) GDRs e c) LDRs identificados para DCM e ICM.

A	B	C
Termo KEGG (número de Genes)	Termo KEGG (número de Genes)	Termo KEGG (número de Genes)
Allograft rejection (7); Cell adhesion molecules (18); Long-term potentiation (9); Cytokine-cytokine receptor interaction (28); Vascular smooth muscle contraction (14);	Cardiac muscle contraction (41); Regulation of actin cytoskeleton (77); AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications (45); HIF-1 signaling pathway (43); TGF-beta signaling pathway (36); Apoptosis (53); FoxO signaling pathway (48); MAPK signaling pathway (85); NF-kappa B signaling pathway (34); VEGF signaling pathway (24); Adrenergic signaling in cardiomyocytes (55); Neurotrophin signaling pathway (44)	PPAR signaling pathway (14); Cell adhesion molecules (23); Cytokine-cytokine receptor interaction (34); Chemokine signaling pathway (24); Viral myocarditis (10);

Tab 2. Principais termos KEGG ($p < 0.05$) identificados através do enriquecimento funcional para genes envolvidos com os LDCs comuns entre DCM e ICM, e exclusivos de cada doença.

- Análise das subredes indica que FOSL1, PLAU e CUX1 são TFs potencialmente associados com as correlações diferenciais observadas em DCM.
- Por outro lado, JUN, HAND1, CREB1, EGR1, EGR2 são TFs fortemente associados com alterações nas correlações entre ICM e controles.
- MYC possui forte associação com ambas cardiomiopatias.

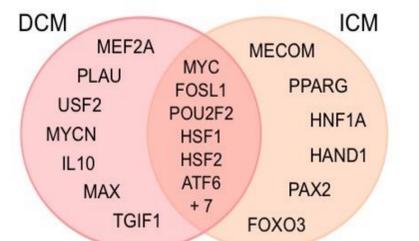


Fig 6. Comparação dos TOP 20 TFs identificados para ICM e DCM na análise de regulação diferencial pelo método *DRrank*.

Conclusões

- A interpretação destes resultados pode oferecer novos insights sobre os mecanismos moleculares das doenças e auxiliar na identificação de marcadores úteis para fins de diagnóstico, prognóstico e métodos terapêuticos diferenciados para cada doença.