



Universidad de Jaén
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis de la distribución espacio – temporal de genes expresados diferencialmente en Proepicardio de ratón

Alumno: Daniel Alarcón Fernández

Junio, 2020



Universidad de Jaén
Facultad de Ciencias Experimentales



Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biología

Trabajo Fin de Grado

Análisis de la distribución espacio – temporal de genes expresados diferencialmente en Proepicardio de ratón

Junio, 2020

Alumno: Daniel Alarcón Fernández

Firma:

Jaén, 2020

ÍNDICE

Resumen.....	Pág.2
Abstract.....	Pág.3
1.INTRODUCCIÓN.....	Pág.4
2.OBJETIVOS.....	Pág.11
3.RESULTADOS.....	Pág.12
3.1 Genes no presentes en Genepaint.....	Pág.13
3.2 Genes presentes en Genepaint, sin expresión.....	Pág.13
3.3 Genes presentes en Genepaint, con expresión.....	Pág.14
3.3.1 <i>Expresión en corazón.....</i>	<i>Pág.14</i>
3.3.1.1 <i>Endocardio.....</i>	<i>Pág.15</i>
3.3.1.2 <i>Miocardio.....</i>	<i>Pág.16</i>
3.3.1.3 <i>Epicardio.....</i>	<i>Pág.17</i>
3.3.2 <i>Expresión en otras zonas del embrión.....</i>	<i>Pág.17</i>
3.3.2.1 <i>Sistema Nervioso.....</i>	<i>Pág.18</i>
3.3.2.2 <i>Ubicua.....</i>	<i>Pág.20</i>
3.3.2.3 <i>Hígado.....</i>	<i>Pág.21</i>
4.DISCUSIÓN.....	Pág.23
5.BIBLIOGRAFÍA.....	Pág.31
Anexos.....	Pág.33

Resumen

Durante los primeros estadios del desarrollo embrionario en el ratón, el Proepicardio es una matriz celular situada justo debajo del corazón en formación, de la cuál se han realizado diversos estudios con éxito en cuánto a perfilar su función en el desarrollo del Epicardio cardíaco. Sin embargo, aún queda mucha información por aclarar sobre que papel tiene el Proepicardio y sus células en otras capas del corazón y en otros tejidos. Debido a esto, nuestro trabajo estará enfocado en visualizar dónde migran y se expresan las células del Proepicardio y tratar de realizar hipótesis sobre la función del Proepicardio en diferentes tejidos en base a esa expresión encontrada, contrastada siempre con estudios científicos realizados por diversos autores.

Basándonos en la idea de que las células y por tanto los genes del Proepicardio Embrionario (PE) migran al Epicardio Embrionario (EE), clasificamos los genes en dos grupos según su expresión en uno u otro tejido, para poder analizar los genes proepicárdicos de cara a su expresión en otros tejidos.

Observando los resultados y contrastándolos con estudios previos, podemos deducir que las células del Proepicardio, posee un importante papel en la formación del Hígado y del EE, y aunque no está demostrado queda abierta la posibilidad de la participación del Proepicardio en la formación del Sistema Nervioso.

Palabras clave: Proepicardio, Epicardio, Desarrollo Embrionario, Ratón.

Abstract

During the early stages of mouse embryonic development, the Proepicardium is a cellular matrix located just below the developing heart, of which several successful studies have been conducted regarding its role in the development of the cardiac epicardium. However, much information remains to be clarified about the role of the Proepicardium and its cells in other layers of the heart and in other tissues. Due to this, our work will be focused on visualizing where Proepicardium cells will migrate and express themselves and try to make hypotheses about the function of Proepicardium in different tissues based on that found expression, always contrasted with scientific studies carried out by various authors.

Based on the idea of cells and therefore the genes of the Embryonic Proepicardium (PE) migrate to the Embryonic Epicardium (EE), we classified the genes into two groups according to their expression in one or the other, in order to analyze the proepicardial genes for their expression in other tissues.

Observing the results and contrasting them with previous studies, we can deduce that the cells of the Proepicardium have an important role in the formation of the Liver and EE, and although it is not found, the possibility of the participation of the Proepicardium in the formation of the Nervous System is open.

Key Words: Proepicardic, Epicardic, Embryonic Development, Mouse.

1. INTRODUCCIÓN

Desarrollo cardiovascular

El corazón es sin lugar a duda uno de los órganos más estudiados a lo largo de los siglos. Actualmente con el incremento de nuevos medios para la investigación, conocer su proceso de formación, su funcionamiento y su conformación celular y génica ha ocasionado que el número de estudios sobre este órgano se dispare de manera exponencial.

El objetivo de nuestro estudio es analizar el desarrollo del corazón en sus más tempranos estadios, para ello debemos prestar atención a los procesos que se dan en el embrión en el que se está formando el corazón. Nuestro estudio será realizado en embriones de ratón, el cuál representa un modelo muy estudiado, que aporta gran fiabilidad a la hora de extrapolar los datos al ser humano.

El desarrollo cardíaco requiere de la formación del mesodermo y a partir del cual se formará el sistema cardiovascular. Para ello las células cardíacas presuntivas se mueven entre el ectodermo y el endodermo hacia la línea media del embrión y se mantienen en contacto con la superficie endodérmica. Posteriormente una pequeña población de células se deslaminiza del epitelio para formar el endocardio, el revestimiento interno del corazón que es continuo con el de los vasos sanguíneos. Las células epiteliales formarán también el miocardio alrededor del endocardio, que dará origen al músculo cardíaco. La fusión de los dos primordios cardíacos se produce en los próximos estadios, dichos primordios se unen durante la formación del intestino anterior, pues tiene lugar un plegamiento hacia dentro del mesodermo esplácnico. Este movimiento produce el acercamiento de los dos tubos cardíacos los cuales se comenzaron a formar por migración de células, estos tubos acabarán fusionándose al igual que los dos endocardios (Figura 1). Las porciones posteriores sin fusionar del endocardio llegarán a ser las aperturas de las venas vitelinas hacia el corazón.

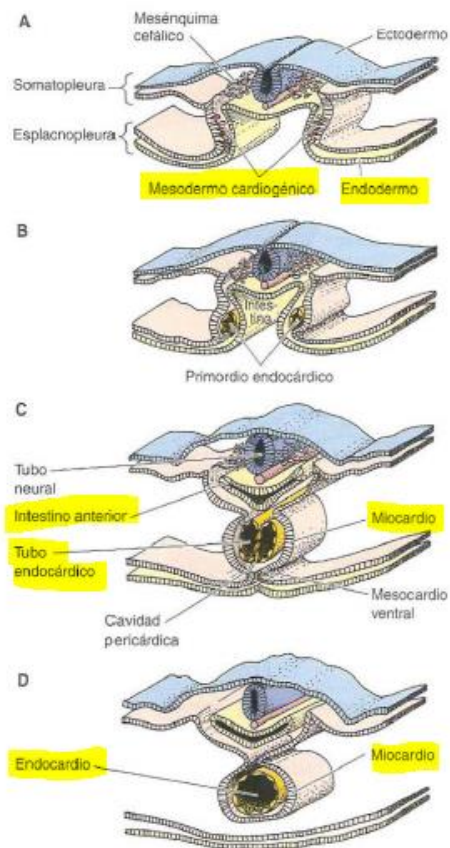


Figura 1. (Gilbert, Scott F., 2003)

El tubo cardíaco continúa creciendo en longitud y grosor según acontece el desarrollo embrionario. La porción cefálica se pliega en dirección ventral y caudal y hacia la derecha, y la porción auricular lo hace en dirección dorsocraneal y hacia la izquierda. El nombre de asa cardíaca se debe a la compleja estructura que obtiene el tubo cardíaco tras este plegamiento (Figura 2a) .

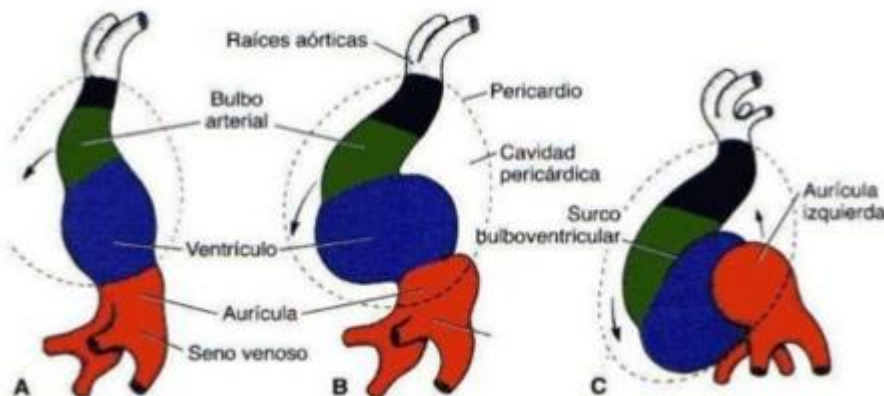


Figura 2a (<https://sites.google.com/site/juanpabloruedaembriologia/sistema-cardiovascular/2-1-formacion-del-asa-cardiaca>)

Tras la formación del asa cardíaca se inicia el proceso de torsión cardíaca (Figura 2a). La torsión derecha del asa posiciona al ventrículo derecho hacia el lado donde se ubica el atrio derecho y coloca al ventrículo izquierdo hacia el atrio izquierdo. Al crecer caudalmente el asa, los atrios se ubican por encima de los ventrículos, de esta manera las cámaras cardíacas se acomodan espacialmente facilitando la conexión atrioventricular concordante, (Figura 2b).

El cuerno derecho del seno venoso se incorpora al atrio derecho, donde forma su porción sinusal y el cuerno izquierdo se transforma en el seno venoso coronario que se abre al atrio derecho. A partir de esta etapa se inician los procesos de tabicación, los atrios se separan por la formación del *septum primum* y del *septum secundum*. El canal atrioventricular se divide en dos por la formación de las almohadillas endocárdicas que al fusionarse forman el tabique atrioventricular, quedando separados los canales atrioventriculares derecho e izquierdo. Los ventrículos se separan por la formación del tabique ventricular primitivo y el tabique conal.

El ventrículo derecho se continúa con el cono y éste con el tronco formando un segmento continuo. En el tronco-cono que se tabica por la formación de dos crestas tronco-conales de trayecto espiral con un giro de 180°, que se entrecruzan en el espacio.

Las crestas se fusionan y forman el tabique aórtico pulmonar que separa a las grandes arterias que emergen del ventrículo derecho. La etapa final de la tabicación ocurre cuando la aorta es transferida al ventrículo izquierdo por un proceso de migración del tronco-cono de derecha a izquierda, a su vez, en esta etapa final, se cerrará la comunicación interventricular en el área perimembranosa.

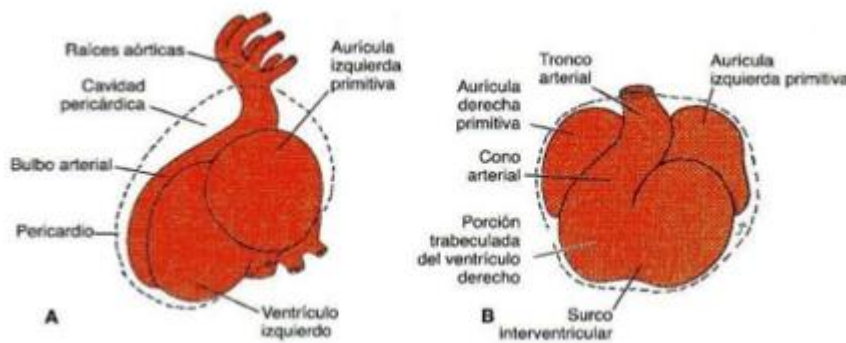


Figura 2b (<https://sites.google.com/site/juanpabloruedaembriologia/sistema-cardiovascular/2-1-formacion-del-asa-cardiaca>)

Las válvulas atrioventriculares del corazón son formadas principalmente por las células endocárdicas que recubren la cavidad atrioventricular por un proceso de trabeculación y minado de la pared (Icardo y Sánchez de Vega, 1991) , dichas células endocárdicas también secretan las proteínas que regulan el crecimiento miocárdico y regulan la localización del tejido nervioso en el corazón.

Contribución del proepicardio/epicardio al desarrollo y la patología cardiovascular

Durante el desarrollo cardíaco, la capa externa que envuelve al corazón, el epicardio, deriva de un primordio externo al corazón, denominado proepicardio. El proepicardio es un grupo transitorio de células extracardíacas que surge como consecuencia del mesotelio celómico en la base ventrocaudal del corazón en desarrollo (Tamar C. Katz et al., 2012) y está situado en la superficie ventral y cefálica entre el primordio cardíaco y hepático (Figura 3).

Las células del proepicardio migran y entran en contacto con la superficie miocárdica dando lugar a un mesotelio que crece y recubre progresivamente al miocardio y forma así el epicardio embrionario. Esta nueva capa más externa genera una población de células mesenquimáticas, que contribuyen al desarrollo del tejido conectivo del corazón y también dan lugar a los fibroblastos y a las células musculares lisas de los vasos coronarios (Figura 3) (Muñoz-Chápuli et al., 2002).

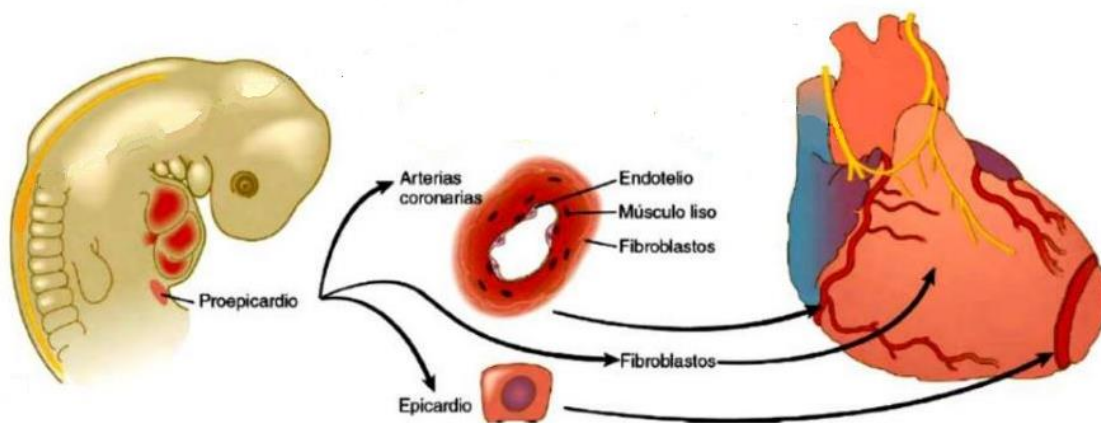


Figura 3 (Imagen modificada) <https://www.slideshare.net/terryperales/desarrollo-embriologico-del-sistema-cardiovascular>

Durante el desarrollo del proepicardio, los principales factores de crecimiento implicados en este proceso son los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y las proteínas Wingless (Wnt) (González Torres, I., 2018). Se sabe también que las células que derivan del epicardio (CDEP) poseen un papel importante en modular el desarrollo del miocardio usando factores de transcripción como WT1. El epicardio también tiene relación con la formación del tejido graso del corazón y tiene capacidad de vasculogénesis y angiogénesis.

Según ciertos estudios, el epicardio, concretamente el tejido adiposo derivado del epicardio, puede estar relacionado con ciertas patologías cardíacas, como el CAD (coronary artery disease). Se ha observado que el aumento de tejido adiposo pericardiaco incrementa el riesgo de padecer esta enfermedad (Aulinas et al., 2017).

Papel del epicardio en regeneración cardiovascular

En el epicardio del embrión se generan células que migran al interior del corazón, dando lugar a las arterias coronarias, tejido conectivo y a buena parte de las células fibrosas del corazón (Muñoz-Chápuli et al., 2002). El corazón de mamíferos después de sufrir daños, es capaz de cicatrizar la zona dañada con tejido fibroso, en el caso del pez zebra (*Danio rerio*) la cicatriz de tejido fibroso es sustituida de nuevo por tejido cardíaco funcional y el corazón se regenera por completo, si bien con un bombeo de sangre no tan homogéneo y una estructura irregular (Juan Manuel González-Rosa et al., 2011).

También se conoce que el epicardio y las células derivadas de él poseen durante la embriogénesis gran pluripotencia ya que se diferenciarán en células musculares de los vasos coronarios, fibroblastos y tejido conectivo. Dicha pluripotencia posteriormente se perderá en el individuo adulto. Si tras una lesión cardíaca dichas células adultas epicárdicas son tratadas con Timosina beta 4 (TB4) la cualidad de poder diferenciarse en células que pueden ayudar en la renovación de los vasos coronarios dañados se verá restaurada, permitiendo así su regeneración (Smart et al., 2007).

Posteriormente se ha observado que la adición de TB4 a células epicárdicas adultas tras una lesión cardíaca, promueve también la reexpresión del gen Wt1, lo que conlleva a la diferenciación de dichas células epicárdicas ya no sólo en células vasculares cardíacas (Smart et al., 2007) sino en cardiomiocitos (Smart et al 2011).

Potencialidad del proepicardio/epicardio en la cardiomiogénesis

El proepicardio se forma inicialmente en límite entre el esbozo cardíaco y el hepático. Distintos estudios de linaje celular han demostrado que el proepicardio contribuye tanto al desarrollo de corazón (Perez-Pomares et al., 2002) como del hígado (Perez-Pomares et al., 2004). En el contexto cardiovascular, el proepicardio migra a la superficie del miocardio, sufre una diferenciación epitelio-mesenquima y se transforma en distintos tipos celulares, como fibroblastos, endotelio y células musculares lisas, pero en ningún caso da lugar a cardiomiocitos. Sorprendentemente, si el proepicardio es aislado y cultivado *in vitro*, se produce la activación de la cardiomiogénesis (Kruithof et al., 2006), un proceso que está regulado por la interacción entre distintos miembros de las familias de factores de crecimiento Bmp y Fgf.

Por otro lado, estudios de linaje celular del epicardio embrionario han descrito su contribución al miocardio (Cai et al., 2008), si bien dichos estudios son muy controvertidos y su veracidad, debido al sistema de trazado celular basado en recombinación Cre/LoxP, han sido puesto en entredicho (Christoffels et al., 2009). Por tanto, la contribución del epicardio embrionario al músculo cardíaco no ha sido demostrado, si bien bajo determinadas circunstancias fisiopatológicas, como el infarto de miocardio y con pretratamiento de timosina beta4, algunas células del epicardio adulto se convierten en cardiomiocitos (Smart et al., 2011).

El epicardio embrionario se encuentra más activado que el epicardio adulto, es por tanto que su porcentaje de cardiomiogénesis es mucho mayor que en el epicardio adulto el cuál

está en un estado silenciado. Sin embargo, estudios recientes han revelado que esto cambia cuando ocurre infarto de miocardio, lo cuál lleva a la expresión de ciertos genes como *Wt1*, *Brg1* y *Tmsb4x* que provocan la reactivación de la actividad de neovascularización y de cardiomiogénesis del epicardio adulto.

En el laboratorio de Desarrollo Cardiovascular del Departamento de Biología Experimental hemos analizado el papel modulador de distintos microRNAs el proepicardio y el epicardio embrionario con el objetivo de incrementar la cardiomiogenesis. Nuestros estudios han revelado que la administración de tres microRNAs distintos, miR-126, miR-223 y miR-195 incrementan la diferenciación cardiomiogenica tanto del proepicardio como del epicardio embrionario (Dueñas et al., 2020). Además, hemos determinado que la función moduladora de miR-195 es dependiente de *Smurf1* y *Foxp1*. Para ahondar aún más en los mecanismos de regulación génica que modulan la transición proepicardio/epicardio embrionario e identificar redes de interacción génica que puedan incrementar o disminuir su diferenciación cardiomiogénica hemos realizado análisis de RNAseq en proepicardio (E9.5) y epicardio embrionario (E10.5) de ratón, para mRNAs, lncRNAs y microRNAs. En estas condiciones hemos identificado 536 mRNAs, 10 microRNAs y 119 lncRNAs que están incrementados en el PE en comparación con el EE y 750 mRNAs, 8 microRNAs y 329 lncRNAs, que muestran en patrón opuesto, es decir que están incrementados en el EE en comparación con el PE. En este trabajo nos hemos centrado en analizar solamente los mRNA que están diferencialmente expresados y en concreto hemos seleccionado el 10% de los que muestran mayor y menor expresión diferencial, respectivamente (Tabla 1 y Tabla 2).

2. OBJETIVO

Nuestros datos preliminares obtenidos mediante análisis de RNAseq nos ha permitido identificar genes diferencialmente expresados en el Proepicardio Embrionario (E.9.5) con respecto al Epicardio Embrionario (E.10.5) y viceversa. Así pues, partimos de dos grupos de genes; en el primer grupo los genes muestran mayor expresión en el Epicardio Embrionario (EE) en comparación con el Proepicardio embrionario (PE) y en el segundo grupo los genes presentan mayor expresión en el PE en comparación con el EE.

Nuestro principal objetivo es analizar bioinformáticamente con la herramienta Genepaint la expresión de estos genes seleccionados durante el desarrollo embrionario, para poder así sugerir cual es la posible función de estos genes en la transición proepicardio a epicardio embrionario. Para ello, hemos seleccionado el análisis del 10% de los genes diferencialmente expresados en cada una de las condiciones anteriormente descritas.

3. RESULTADOS

En este apartado hemos analizado un total de 127 genes, seleccionados por su expresión diferencial entre el PE y EE; 74 de ellos presentan mayor expresión en el PE que el EE y 53 presentan el patrón complementario. Cada uno de estos genes se ha buscado en la base de datos Genepaint y como consecuencia de ello hemos obtenido tres grupos de genes.

1: Genes para los cuáles no se obtienen resultados en Genepaint. De estos no tendremos imágenes de su expresión. Su porcentaje con respecto al total de los 129 genes analizados corresponde al 13,9%.

2: Este grupo lo forman genes que si se encuentran en la base de datos de GenePaint; pero en las imágenes de la expresión de estos genes en los embriones de ratón; la expresión es muy leve o casi nula, en el caso de que sea nula, que suele ser en muy pocos, puede deberse a que los genes de este grupo no se encuentren presentes en el embrión en los estadios en los que hemos buscado (14.5 días) y si en otros estadios o bien debido a errores en el método de hibridación in situ. El porcentaje de este grupo es del 37,9% respecto al total de los genes analizados.

3: Este es el grupo más relevante, en él se encuentran agrupados los genes para los cuáles si hemos encontrado expresión en GenePaint. A su vez los hemos divididos en dos subgrupos según la zona en la que se expresan los genes y dichos subgrupos están divididos también con el fin de hacer una mejor clasificación que nos ayudará en el futuro a ver relación entre diferentes genes según su expresión. Su porcentaje corresponde al 48% de los genes analizado.

Subgrupo 1: Genes con expresión en el corazón.

Divididos según su expresión en las tres capas del corazón

- a) Endocardio
- b) Miocardio
- c) Epicardio

Subgrupo 2: Genes con expresión en otras zonas del organismo

- a) Expresión en Sistema Nervioso
- b) Expresión general en todo el organismo (Ubicua)
- c) Expresión en el hígado.

Tras esta introducción procedemos a observar su expresión en Genepaint:

3.1 Genes no presentes en Genepaint:

No hay resultados en Gene Paint: Los datos están divididos según la tabla de pertenencia de cada gen; tabla 1 (mayor expresión en EE que en PE) y tabla 2 (mayor expresión en PE que en EE).

Tabla 1 (PE<EE): Clca3a1, Clca3a2, Cnmd, Myh13, Mirt1, Serpine3, Cntn5, Tcaf3, Cpa6, Myh7. Su porcentaje corresponde al 7,7% del total de genes analizados y al 18,8% del total de genes analizados de la tabla 1.

Tabla 2 (PE>EE): Fmo1, Kif12, Spink1, Colec10, Akr1c19, Angptl8, Prl3b1, Gimd1. Su porcentaje corresponde al 6,2% del total de genes analizados y al 10,8% del total de genes analizados de la tabla 2.

3.2 Genes presentes en Genepaint, sin expresión:

Se encuentran en GenePaint, pero no se expresan, los datos están divididos en tabla 1 y tabla 2:

Tabla 1 (PE<EE): Tnfsf15, Wfdc18, Ccr3, Cox8b, Egr3, Ccl3, S100a4, Ep gn, Aldh3b1, Ccl20, Mybpc2, Il23a, Il34 , Il12a, Dmkn, Ch25h. Su porcentaje corresponde al 12,5% del total de genes analizados y al 30,1% del total de genes analizados de la tabla 1.

Tabla 2 (PE>EE) : Tnfsf18, Fosb, Klb, Nepn, Hgf ac, Hnf1a, Gys2, Trpv6, St8sia3, A1cf, Rfx6, Tff3, S100g, Apoa5, F7, Prl4a1, Sgk2, Cyp3a13, Qrfpr, Thpo, C8b, Pla2g2d, Gabrg3, Pde6c, Aplnr, Ch25h, Gjb1, Gys2, H2-Q10, Sec14l4, Cdc p1, Akr1b7. Su porcentaje es del

25,1% respecto al total de genes analizados y al 43,2% de los genes analizados de la tabla 2.

3.3 Genes presentes en Genepaint, con expresión:

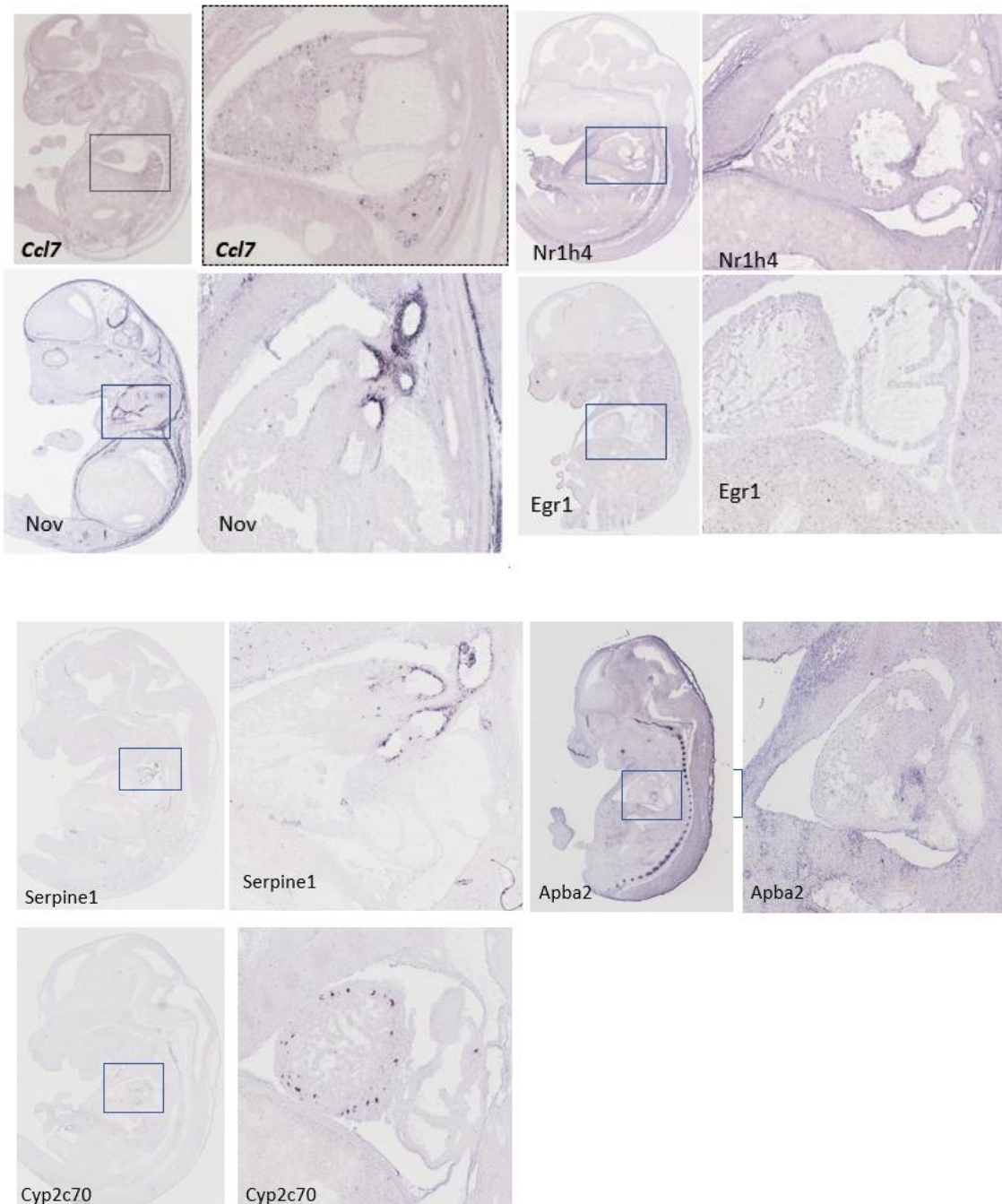
En este grupo se encuentran los genes que presentan una expresión visible en la herramienta Genepaint, los hemos dividido en varios subgrupos, para facilitar su clasificación, siendo un total de 62 genes lo que supone un 48,8% del total de genes analizados. De esos 62, 23 pertenecen a la tabla 1 siendo un 43% sobre el total de la tabla 1; y 40 pertenecen a la tabla 2 siendo un 54% del total de la tabla 2.

3.3.1 Con expresión en el corazón:

En este subgrupo hemos agrupado los genes que se expresan en las tres capas del corazón (Endocardio, Miocardio y Epicardio), incluyendo genes que se expresan también en otros tejidos aparte del tejido cardíaco. Son un total de 15 genes, un 11,8% sobre el total de genes analizados de estos 15; 12 pertenecen a la tabla 1 siendo un 22,6% sobre el total de genes analizados de dicha tabla, y 3 pertenecen a la tabla 2, siendo un 4% sobre la tabla 2.

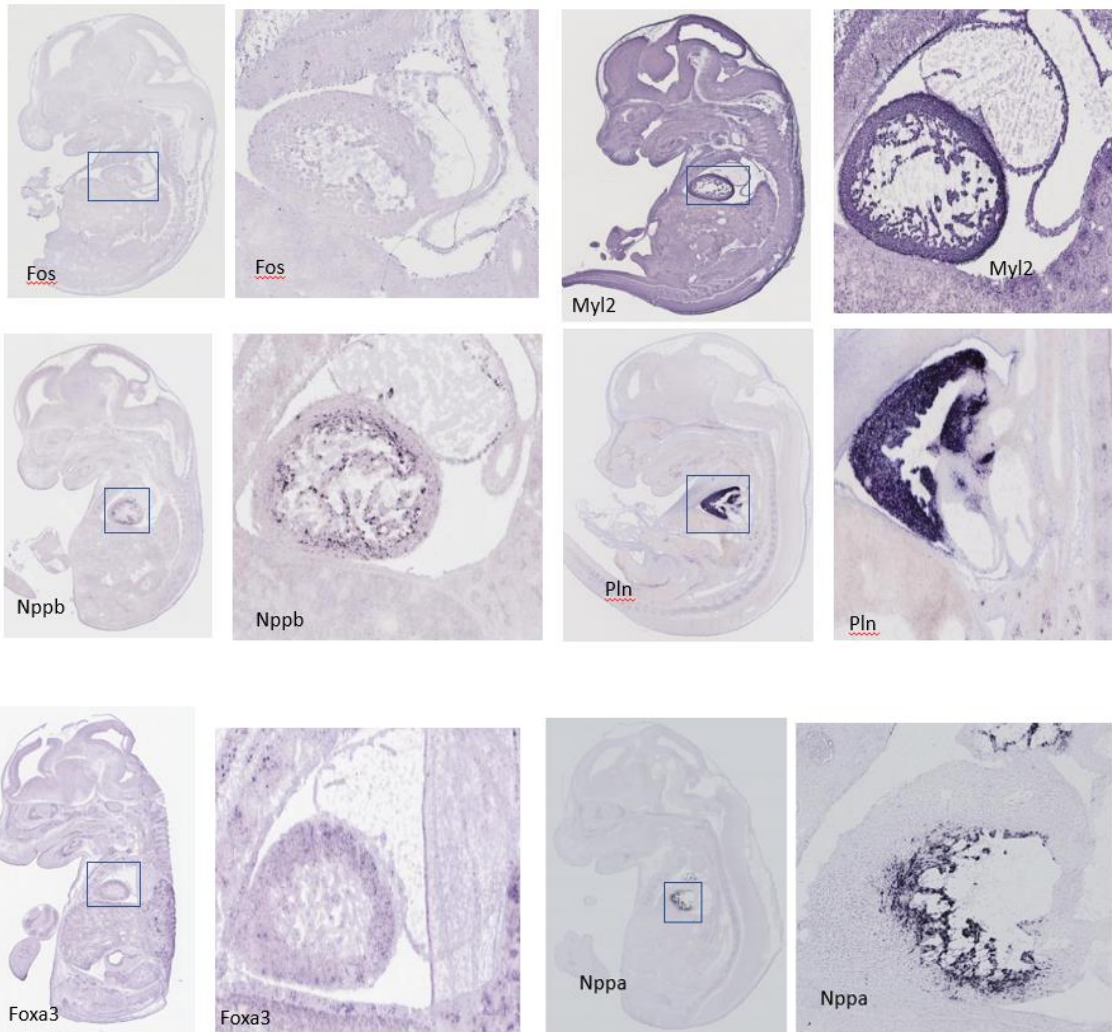
3.3.1.1 *Expresión preferente en el Endocardio*

Genes que se expresan en la capa más interna del corazón, que tiene contacto con la cavidad cardíaca. De los 7 genes que forman este apartado; 5 son de la tabla 1 y 2 de la tabla 2.



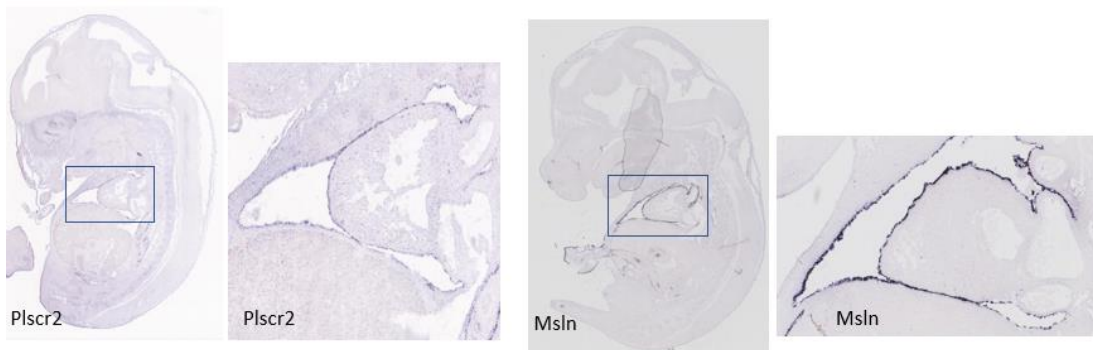
3.3.1.2 Expresión preferente en el Miocardio:

Genes que se expresan en el miocardio, esta zona del corazón es la encargada de su contracción y dilatación, está formada por los miocardiocitos, células musculares, y es la capa con más espesor del corazón. En el caso del miocardio de los 6 genes, solo 1 pertenece a la tabla 2, mientras que los otros 5 pertenecen a la tabla 2.



3.3.1.3 *Expresión preferente en el Epicardio:*

En este apartado encontramos aquellos genes presentes en la capa más externa del corazón, que como he descrito anteriormente, es la capa formada a partir de las células del Proepicardio. En este caso, los dos genes forman parte de la tabla 1, siendo un 3,7% respecto a la tabla 1 y un 1,5% respecto al total de genes de las dos tablas.

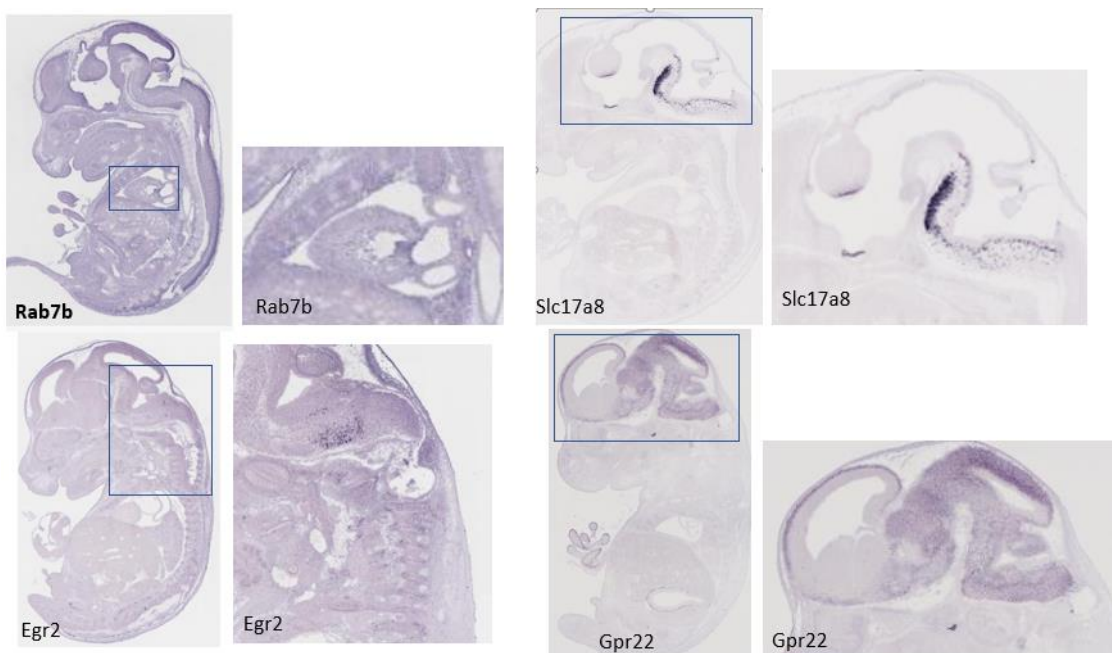


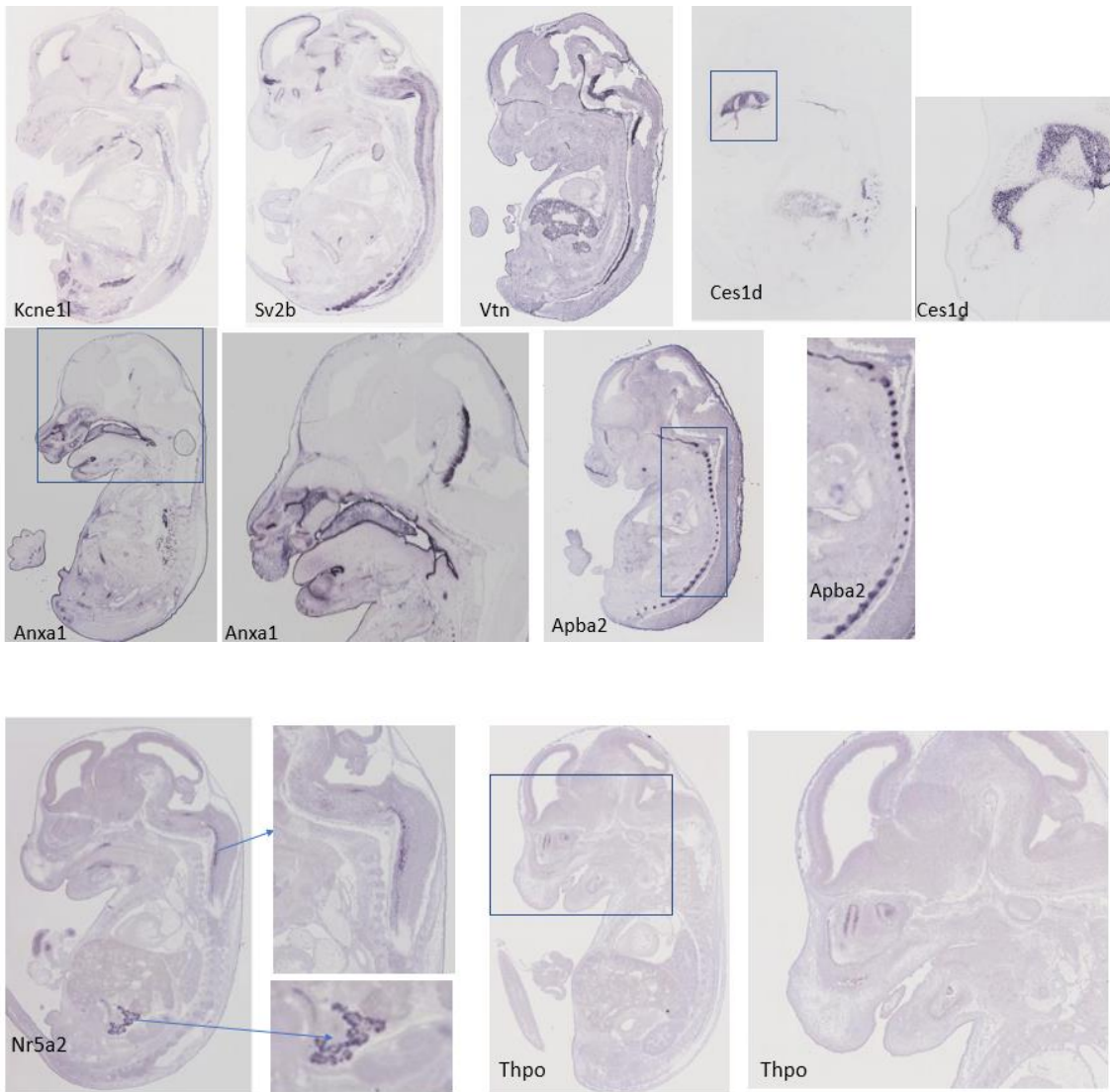
3.3.2 *Con expresión en otras zonas del embrión:*

En este subapartado he agrupado a genes que se expresan en otros tejidos del organismo incluyendo o no el tejido cardíaco, estos genes los he separado de nuevo en otros tres subgrupos para facilitar su análisis que son: a) Sistema nervioso, b) Ubicua y c) Hígado. Este grupo incluye un total de 46 genes lo que supone un 36,2% del total de genes analizados, dentro de estos 46 genes encontramos 11 genes pertenecientes a la tabla 1 lo que corresponde al 20,7% de los genes totales analizados para dicha tabla; y 35 genes para la tabla 2, lo que supone un 47,2% para dicha tabla.

3.3.2.1 *Expresión en el Sistema Nervioso:*

Genes que se expresan en diferentes tejidos relacionados con el sistema nervioso, como son; ganglios raquídeos, médula espinal, órganos sensoriales con terminaciones nerviosas. Este grupo está formado por un total de 12 genes lo que supone un 9,4% del total de genes analizados, dentro de la tabla 1 encontramos 7 genes, lo que supone un 13,2% para dicha tabla. En cuanto a la tabla 2, encontramos 5 genes, lo que supone un 6,7% del total de genes analizados para esta tabla.

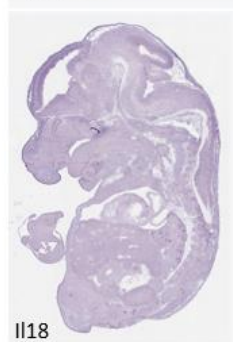
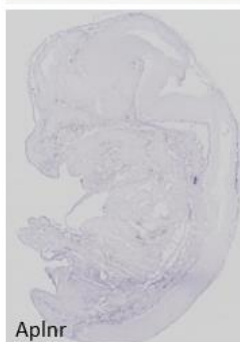
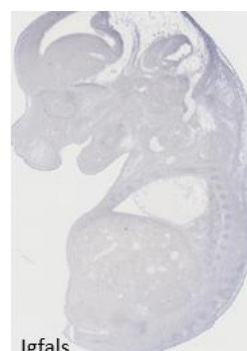
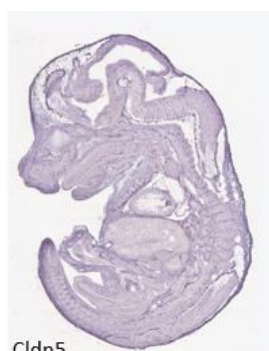
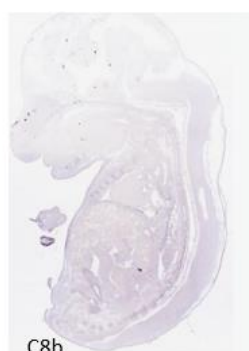




3.3.2.2 Expresión en Ubicua:

En este apartado se encuentran los genes que se expresan de manera indiferenciada en todos los tejidos del organismo.

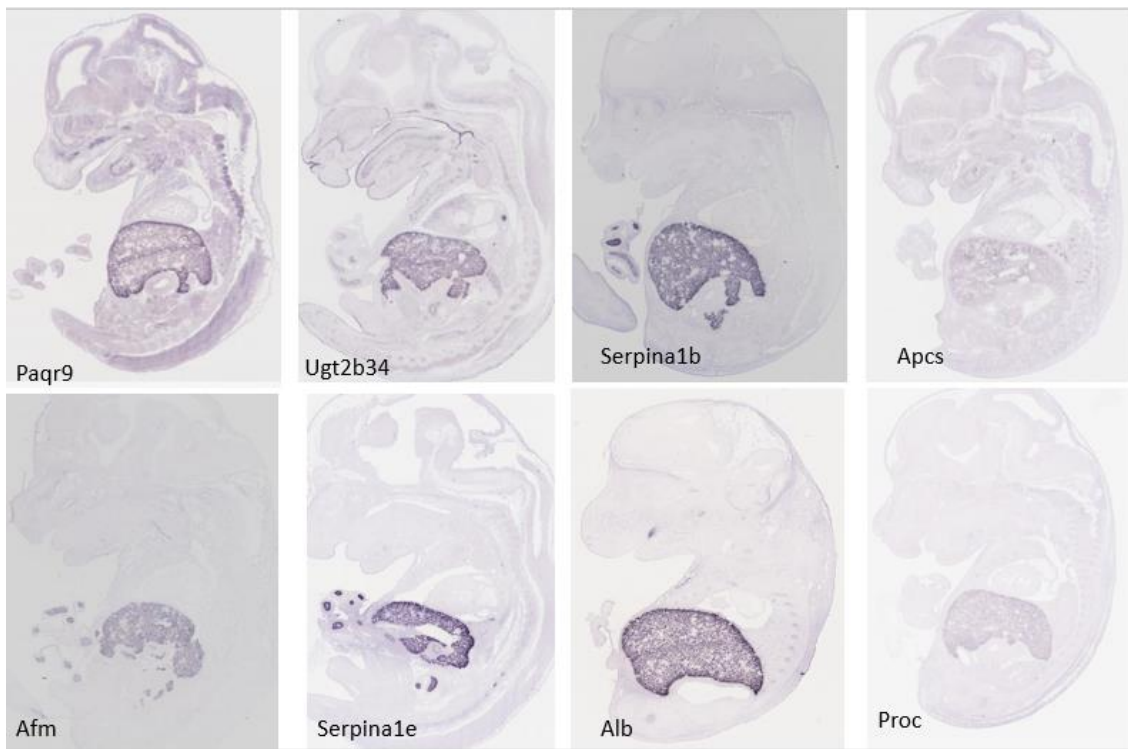
En este grupo encontramos 6 genes que suponen un 4,7% respecto al total de genes analizados; de los cuáles 2 pertenecen a la tabla 1 lo que supone 3,7% respecto a los genes analizados para la tabla 1, y 4 pertenecen a la tabla 2 lo que supone un 5,4% del total de genes analizados de la tabla 2.

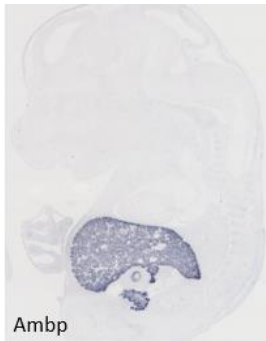


3.3.2.3 Expresión en Hígado:

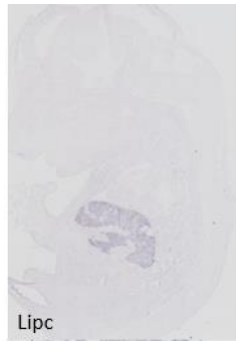
En este último apartado he agrupado aquellos genes que muestran una especial expresión en el hígado.

En este caso todos los genes pertenecen a la tabla 2, 29 genes en total, lo que corresponde al 39,1% de los genes analizados de la tabla 2 y con respecto al total de genes analizados entre las dos tablas corresponde al 22,8%.

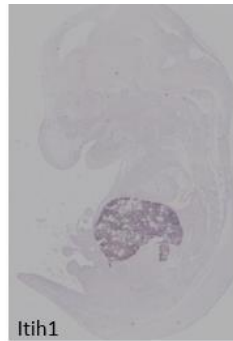




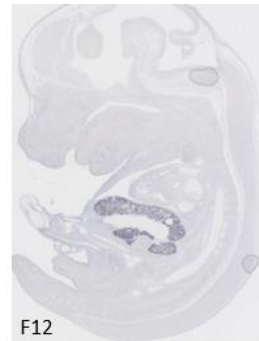
Ambp



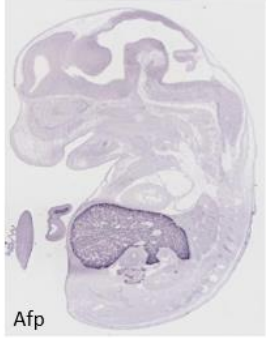
Lipc



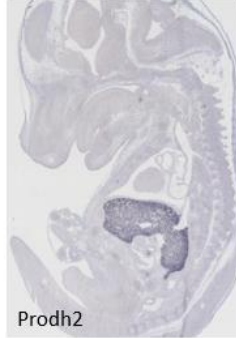
Itih1



F12



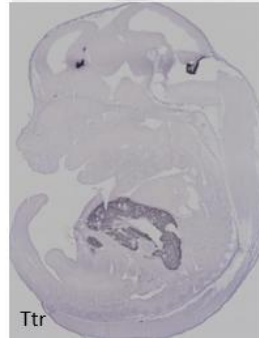
Afp



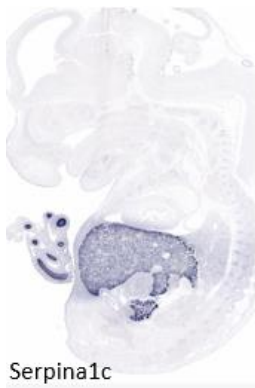
Prodh2



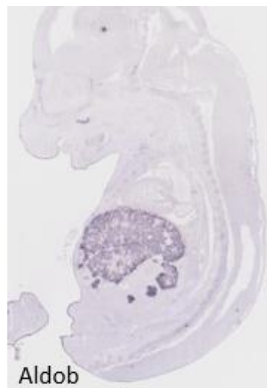
Apoa1



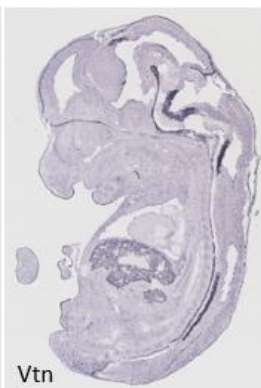
Ttr



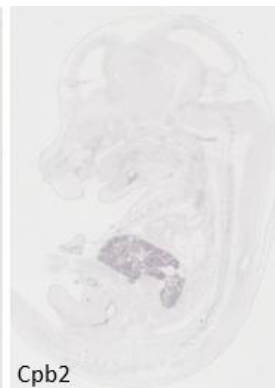
Serpina1c



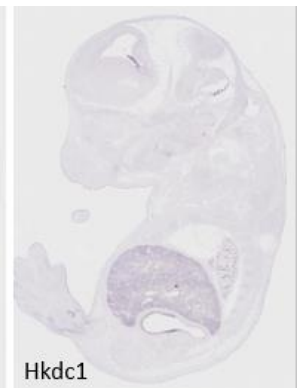
Aldob



Vtn



Cpb2



Hkdc1

4. DISCUSIÓN

Basándonos en los datos iniciales sobre la expresión diferencial de los genes en PE/EE y su posterior análisis visual de manera online con la herramienta Genepaint, trataremos de elaborar una hipótesis del papel funcional de dichos genes en el embrión de ratón y el porqué de su expresión cardíaca, teniendo en cuenta a su vez información dada por fuentes científicas sobre la función de estos genes en otros contextos biológicos.

TABLA 1

En la Tabla 1, encontramos genes con mayor expresión en el EE con respecto al PE. Dividiremos los genes según el tejido en el que se expresan.

Expresión preferente en el Endocardio

Sabiendo que ciertas áreas del Endocardio están formadas por células que migran desde el Epicardio, trataremos de dar una respuesta al porqué de la expresión de los siguientes genes, teniendo en cuenta la tabla a la que pertenecen.

Al recabar información encontramos:

Ccl7, es el gen encargado de formar quimiocinas, cuya función es atraer a los monocitos fuera de los vasos sanguíneos hacia los tejidos dañados o infectados por agentes patógenos, es por eso que se encuentra recubriendo todos los endotelios vasculares del organismo, incluyendo el endocardio.

Serpine1, según NCBI es un gen que codifica para la proteína Serpine1, que es un activador/inhibidor de peptidasas, encargado de la disolución de coágulos sanguíneos ayudando en la degradación de plasminógeno, esto explica su presencia en el endotelio de los vasos coronarios, es decir, en el endocardio embrionario.

Nr1h4, gen que codifica para una proteína receptora nuclear de hormonas, también es conocido como receptor de ácido biliar, se encuentra en gran cantidad de tejidos como riñón, hígado e intestino y al estar presente en sangre, puede ser un falso positivo, y no encontrarse concretamente en las células endocárdicas, sino en la sangre que fluye contiguamente.

Nov, nephroblastoma overexpressed gene también conocido como celular communication network factor 3, una de las funciones de este gen, es la de promover la angiogénesis, tiene

sentido su presencia en el endocardio embrionario pues es dónde se generan los vasos sanguíneos.

Egr1, este gen codifica para la proteína Egr1, proteína de respuesta al crecimiento temprano, es una proteína nuclear y regula procesos de transcripción por lo que se expresa en gran número de tejidos aparte del Endocardio.

Del estadio 10.5 al 14.5, la expresión de estos genes en el Epicardio ha cesado, y se ha movido al Endocardio, esto no hace más que confirmar el papel del Epicardio en la formación del Endocardio, mediante la migración de células, como hemos visto anteriormente.

Expresión preferente en el Miocardio

Las células que migran del Epicardio al corazón en formación, pueden tener relación con el Miocardio (Smart, et al 2011), sabiendo esto trataremos de dar una explicación a los siguientes genes que se expresan en el Miocardio.

Nppa y Nppb; son genes que codifican para péptidos natriuréticos, dichos genes durante el desarrollo fetal, poseen una alta expresión en el Miocardio.

La función cardíaca de ambos genes consiste en regular la presión arterial y están ligados al mantenimiento celular del miocardio regulando el líquido extracelular y nivel de electrolitos.

Pln, fosfolamban, es un gen encargado de la regulación del flujo de calcio en los miocardiocitos.

Myl2, cadena ligera reguladora de miosina 2, es una isoforma expresada únicamente en los miocardiocitos, su función es la de regular la miosina muscular cardíaca.

Fos, FBJ osteosarcoma gen, es un gen que se expresa en varios tejidos del organismo adulto, especialmente en tejidos intestinales. Al ser la proteína resultante un factor de transcripción, su expresión se encuentra en varios tejidos, entre ellos el miocardio, en el que tiene una leve expresión.

Anteriormente hemos comentado que las células del Epicardio; recubren el Miocardio y que actualmente hay una controversia sobre su posible función en la generación del Miocardio.

Dada toda la información que tenemos, me inclino a pensar que estos genes se han originado en el EE (E10.5) y han sido “enviados” al Miocardio para su producción y crecimiento, apoyando así la hipótesis de la participación epicárdica en la generación miocárdica, siendo así la única forma de entender la presencia de estos genes en el EE (E10.5) y en el Miocardio (E14.5).

Expresión preferente en el Epicardio

Plscr2, *phospholipid scramblase 2*, proteína de membrana que media el paso de calcio al interior de la membrana plasmática y redistribuye los lípidos en la membrana plasmática, también tiene relación con la coagulación sanguínea y con el proceso de apoptosis.

Msln, *mesotelina*, como su nombre indica, está presente en el mesotelio, que es una capa celular que recubre cavidades corporales, su función está ligada a la membrana celular y a la unión entre célula.

El hecho de que sólo haya dos genes expresándose en el estadio 14.5, frente al gran número que había en el estadio 10.5, y la presencia de gran cantidad de dichos genes en el Endocardio y Miocardio, no hace sino reforzar la idea de la participación del EE en la formación de Endocardio y Miocardio.

Expresión preferente en el Sistema Nervioso

Slc17a8, codifica para la proteína “transportadora de glutamato vesicular”, el glutamato es un neurotransmisor que es clave en la comunicación neuronal y nerviosa.

Rab7b, miembro de la familia de oncogenes RAS, en Genepaint observamos expresión en la médula espinal, el cerebro y los ganglios raquídeos. Está relacionados con la degradación de proteínas en el Sistema Nervioso Central y con la activación de macrófagos.

Egr2, factor que regula la transcripción y está presente especialmente en la cresta neural y encéfalo.

Gpr22, codifica para un receptor de la proteína G y su función es la de unirse a esta proteína y otros péptidos y actuar como transductor de señales.

Kcne1l, gen encargado de formar la proteína que forma parte del canal que regula la entrada y salida de neurotransmisores a través de canales gracias al voltaje de K, su función

se centra también en la excitabilidad neuronal y contracción muscular, concretamente en el músculo cardíaco también regula el ritmo cardíaco.

Sv2b, glicoproteína de la vesícula sináptica. Se expresa en el SNC estas glicoproteínas regulan el tráfico de vesículas neuronales y el proceso de exocitosis en las neuronas.

Anxa1, se expresa en zonas nerviosas como órganos sensoriales, y codifica para la proteína inhibidora de la fosfolipasa A2 y es dependiente de Ca.

Su función es la de inhibir la actuación de la fosfolipasa A2 y tiene un efecto antiinflamatorio.

La presencia de estos genes en el EE (E10.5) y no en el PE (E9.5) puede deberse a la migración de células relacionadas con el SNC al EE (E10.5) que colaboren en el desarrollo cardíaco. Sin embargo, no encontramos datos en Genepaint (E14.5), que avalen esta idea. Otra idea es que sea el EE (E10.5) el que genere genes y células que ayuden en la formación de parte del Sistema Nervioso y no al revés, esta idea se ve apoyada a su vez por la ausencia de expresión de estos genes en el corazón en el estadio 14.5, pues habrían migrado a sus respectivos destinos del SNC, aunque esta hipótesis tiene más sentido acorde a nuestros resultados, no se puede afirmar sin más datos y estudios que apoyen esta idea, por lo que no podemos aceptar ninguna de las dos hipótesis y serían necesarios más estudios que se centren en la relación del EE y el SNC, para decantarnos por una u otra.

Expresión en Ubicua

Il18, Interleucina 18, pertenece al grupo de las citoquinas sintetizadas por leucocitos, aunque también las secretan otras células como las células del sistema nervioso y de algunos endoteliales, su función va ligada al desarrollo y activación del sistema inmunitario.

Crygb, gamma-cristalinaB, pertenece al grupo de proteínas ubicuas, aunque en el individuo adulto su función se restringe a formar el cristalino ocular.

La ausencia de estos genes en el PE (E9.5) y su presencia en el EE (E10.5) y en el resto del corazón y resto del organismo (E14.5), sumado a la función que poseen estos genes, nos indican simplemente que ambos genes comienzan a expresarse en todo organismo a partir del estadio 10.5.

Expresión preferente en el Hígado

Frente a los 29 genes de la Tabla 2, no hemos encontrado ningún gen de la tabla 1 ($PE < EE$) que a su vez se exprese en el Hígado en el estadio 14.5, por lo que entendemos que las células del EE no migran al Hígado. Esto nos hace afirmar que las células del Epicardio Embrionario no contribuyen de forma alguna a la formación del hígado.

Además entendemos que el Proepicardio tiene algún mecanismo de señalización por el que ciertas células que producen ciertos genes; migrarán a la formación de Epicardio, mientras que otras irán a la formación del Hígado.

TABLA 2

Un total de 74 genes con mayor expresión en el PE con respecto al EE, analizando los genes expresados de esta tabla, trataremos de clarificar si es posible que el PE no sólo se encarga de generar EE, si no otros tejidos.

Expresión preferente en el Endocardio

Apba2, codifica para la proteína de unión a la proteína beta 4 amiloide. Es una proteína adaptadora neuronal, de ahí su elevada presencia en el sistema nervioso y cerebro.

Cyp2c70, citocromo, hemoproteínas que transportan energía química su concentración en el Endocardio en el E14.5 se debe a posiblemente una necesidad de energía por parte de las células, posteriormente según NCBI, a partir del E 18, se acumularán de forma elevada en el hígado, debido a su papel como eliminador de xenobióticos. La presencia de esta proteína en el Proepicardio y no en el Epicardio y su posterior expresión endocárdica; se explicaría porque ambos son tejidos en crecimiento que requieren energía, dando a entender que Cyp2c70 es una proteína que puede ser generada de manera independiente por células del Endocardio y del Proepicardio.

Nos inclinamos a pensar que ambos genes se han generado de manera independiente tanto en el PE (E9.5) como en el Endocardio (E14.5), sin que haya una relación directa entre ambos tejidos.

Expresión preferente en el Miocardio

Foxa3, la expresión de este gen da lugar a la proteína “factor nuclear del hepatocito gamma-3” es un factor de transcripción que activan la transcripción de proteínas del hígado. En el estadio 14.5 la expresión se reparte entre miocardio, pulmones e hígado. La presencia de este gen en el miocardio y otros tejidos musculares como la pared del estómago, nos indica que esta proteína no sólo actúa en el hígado sino en otros tejidos.

Su expresión en gran parte de tejidos, sumado a estar en la tabla 2, nos hace pensar que este gen no es generado por el EE al contrario que los genes de la Tabla 1 del Miocardio, si no que puede ser expresado por las células del Miocardio y otros muchos tipos celulares sin necesitar del estímulo de otros tejidos.

Expresión preferente en el Epicardio

No hemos encontrado ningún gen, esto es lo que se esperaba, debido a que son genes no encontrados en el EE (E10.5), por lo que sería muy llamativo que aparecieran en el estadio 14.5 en el propio Epicardio.

Expresión preferente en el Sistema Nervioso

Thpo, Este gen codifica un factor de crecimiento humoral necesario para la proliferación y maduración de megacariocitos, así como para la trombopoyesis.

Nr5a2, codifica para la proteína factor de transcripción de fetoproteína. Su función se relaciona con el desarrollo embrionario, en Genepaint aunque encontramos expresión en el SNC, la expresión más fuerte se encuentra en el intestino, esto se debe a su función relacionada con la síntesis de colesterol.

Ces1d, carboxilesterasa 1d, expresión en el sistema nervioso, especialmente en el epitelio olfativo. Actúa como lipasa.

Apba2, codifica para una proteína adaptadora neuronal.

Vtn, vitronectina, es una pexina se encuentra en zonas concretas del SNC tapizando los espacios del SNC como entre los ganglios raquídeos y la médula espinal. Esta presente en el suero y algunos tejidos. Promueve adhesión y propagación celular. E Inhibe el efecto

negativo del complemento citolítico en la membrana e inhibe con otras proteínas para inhibir a la serpin serina proteasa.

Los genes encontrados en este apartado, se expresan en el PE (E 9.5) y en Genepaint (E14.5) se expresan en el Sistema nervioso, pero no en el corazón.

Actualmente no encuentro una explicación razonable a la relación del PE con el SNC, son necesarios más estudios para poder esclarecer esta relación.

Expresión Ubicua

Cldn5, claudin 5, forma parte de la membrana celular y su función es la de formar una unión de membranas que impide que el líquido intracelular salga sin control de estas.

Aplnr, la proteína codificada se une a proteínas G e inhiben la actividad de la adenilatociclasas. Desempeña un papel clave en el desarrollo temprano, como la gastrulación, la formación de vasos sanguíneos y la morfogénesis cardíaca. Promueve la migración de las células endoteliales derivadas del seno venoso al corazón en desarrollo para promover el desarrollo de los vasos sanguíneos coronarios. También desempeña un papel en diversos procesos en adultos, como la regulación de la formación de vasos sanguíneos, la presión arterial, la contractilidad cardíaca y la insuficiencia cardíaca.

C8b, este gen codifica la subunidad beta del componente del complemento C8 que participa en el ensamblaje del complejo de ataque de la membrana del complemento. La función del sistema de complemento se relaciona con el sistema inmunológico.

Igfals, La proteína codificada por este gen es una proteína sérica que se une a factores de crecimiento similares a la insulina, aumentando su vida media y su localización vascular, su producción está estimulada por la hormona de crecimiento. Debido a su papel en el desarrollo y crecimiento, su expresión es elevada en el estadio embrionario.

En el caso de estos genes, poseen expresión en el PE (E9.5) con respecto al EE (E10.5), pero aunque la expresión es ubicua, en el tejido cardíaco no se ve una elevada expresión, tan sólo en Cldn5 y es en el Miocardio; por lo que es posible que el PE tenga una función relacionada con otros tejidos, más allá que la generación del EE.

Expresión preferente en el Hígado

Los genes expresados en el hígado son exclusivos de la tabla 2, salvo el gen Vtn, tienen una expresión específica en el hígado.

Debido a la gran similitud en la expresión, al gran número de genes expresados y a que todos son genes de la tabla 2, hemos decidido no analizar uno a uno cada gen, no es necesario para realizar una hipótesis sobre el por qué la expresión de estos genes.

Ninguno se encuentra en el EE en el E10.5 ni en el corazón en el E14.5, por lo que estos genes nos hablan de una relación del Proepicardio con el Hígado, en la que células del Proepicardio migran hacia el Hígado en formación, para dar lugar a los primeros vasos sanguíneos del Hígado y a las células estrelladas (Carlson, 2014).

5. BIBLIOGRAFÍA

Gilbert, Scott F., 2003, *Biología del Desarrollo*, Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.

Carlson, B. M., 2014, *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*, Barcelona, España: Elsevier.

Diego Franco, Jorge Domínguez, María del Pilar de Castro, Amelia Aránega
[Regulation of Myocardial Gene Expression during Heart Development]
Rev Esp Cardiol. 2002 feb;55(2):167-182.

Muñoz-Chápuli R, Macías D, González-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Pérez-Pomares JM. [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development]. Rev Esp Cardiol. 2002 Oct;55(10):1070-82.

Anna Aulinas , Iris Crespo , David Viladés , Ruben Leta , Eulàlia Urgell , Betina Biagetti , Susan M. Webb , Elena Valassi.
[Cystatin-C and epicardial adipose tissue as noninvasive predictors of cardiovascular risk in acromegaly]. Rev Clinical Endocrinology. 2017 Feb; 86 (2): 214-222.

Juan Manuel González-Rosa, Víctor Martín, Marina Peralta, Miguel Torres, Nadia Mercader
[Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish]. Development 2011 138: 1663-1674; doi: 10.1242/dev.060897

Smart, N., Risebro, C., Melville, A. *et al.* [Thymosin β 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization]. *Nature* 445, 177–182 (2007).

Blom JN, Feng Q. [Cardiac repair by epicardial EMT: Current targets and a potential role for the primary cilium.] Pharmacol Ther. 2018 Jun;186:114-129

Joaquim Miguel Vieira, Sara Howard, Cristina Villa del Campo, Sveva Bollini, Karina N. Dubé, Megan Masters, Damien N. Barnette, Mala Rohling, Xin Sun, Laura E. Hankins, Daria

Gavriouchkina, Ruth Williams, Daniel Metzger, Pierre Chambon, Tatjana Sauka-Spengler, Benjamin Davies & Paul R. Riley

[BRG1-SWI/SNF-dependent regulation of the Wt1 transcriptional landscape mediates epicardial activity during heart development and disease.]

Diego Franco, Inmaculada González Torres.

[Regulación de la expresión de microRNAs en el proepicardio por factores de crecimiento]

Icardo José M, Sánchez de Vega M J, Arrechdera H, Colvee E .(1991).

Espectro de malformaciones cardíacas en el ratón “iv/iv”

Cantabria, España. Servicio de publicaciones. Universidad de Cantabria.

Tamar C.Katz, Manvendra K.Singh, Karl Degenhardt, José Rivera-Feliciano Randy L.Johnson, Jonathan A.Epstein, Clifford J.Tabin

[Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells] Developmental Cell, 2012 Marzo, 22 (3): 639-50

Smart N, Bollini S, Dubé KN, Vieira JM, Zhou B, Davidson S, Yellon D, Riegler J, Price AN, Lythgoe MF, Pu WT, Riley PR. [De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury]. Nature. 2011 Jun 8;474(7353):640-4.

Ramírez Hernández J.A. Tesis doctoral, 1991.

Sobre el Desarrollo de los plexos nerviosos yuxta e intraparietales del corazón (Análisis de distintos estadios del periodo embrionario)

ANEXOS

TABLA 1 (EE>PE)

	FC	logratio	meanExp	pval	adj.pval
Clca3a1	2609,3227	11,34946	0,4510515	0,0001423	0,0070009
Ccl2	953,02864	9,8963758	0,8219103	0,0004918	0,0151229
Clca3a2	404,85419	8,6612586	-0,297177	0,000151	0,0072642
Tnfsf18	287,73513	8,1685975	-2,474806	3,01E-06	0,0007809
Slc17a8	286,19115	8,1608353	-1,01575	3,79E-05	0,003231
Cnmd	245,36741	7,9387998	1,4465647	4,92E-05	0,0038139
Myh13	180,51049	7,4959389	-2,072544	0,0001371	0,0068779
Egr2	154,51865	7,2716372	0,531754	0,0001015	0,0056433
Gpr22	153,95536	7,2663683	-2,201576	0,0002156	0,0092021
Ccl7	140,95045	7,1390443	0,3434686	0,0001418	0,0069919
Fosb	135,76658	7,0849846	-0,841307	0,001519	0,0292803
Fos	115,67305	6,853909	5,3818883	2,42E-05	0,0023647
Tnfsf15	113,96088	6,8323948	-1,622573	0,0028949	0,043721
Wfdc18	112,21135	6,8100748	-1,818641	0,0016166	0,030327
Ccr3	105,58796	6,7223015	-3,197954	2,44E-06	0,0007009
Il18	99,427648	6,6355752	1,2412803	0,0005824	0,0165044
Cox8b	96,89372	6,5983313	-3,25994	6,65E-07	0,0003693
Reg1	95,858795	6,5828389	-3,267686	2,76E-06	0,0007664
Cemip	94,571278	6,5633302	1,0568602	1,52E-05	0,0018552
Egr3	88,382748	6,4656929	-3,326259	0,0009632	0,0224222
Mirt1	88,274312	6,4639218	-1,113134	1,79E-05	0,0020225
Ccl3	81,515503	6,3490026	-3,384604	7,50E-05	0,0046375
S100a4	80,108145	6,323877	-3,397167	4,89E-06	0,0009976
Nr1h4	76,14793	6,2507329	0,1965549	0,0001898	0,008437
Plscr2	74,570243	6,2205281	1,1756324	0,0004812	0,0148934
Epgn	64,21338	6,004802	-2,818112	0,0015164	0,0292803
Serpine3	61,16959	5,9347427	-1,239146	0,0031537	0,0457825
Myl2	58,434063	5,8687377	5,2226386	2,58E-05	0,0024548
Anxa1	53,180003	5,732812	4,5320235	1,59E-06	0,0006084
Nov	51,685731	5,6916941	0,8403844	0,0001769	0,0080103
Egr1	48,845236	5,6101459	2,7126792	0,0001169	0,0061965
Nppa	48,030334	5,5858739	2,4091537	0,0005175	0,0155001
Rab7b	46,682359	5,5448056	0,3199144	0,0018942	0,0336298
Aldh3b1	45,838181	5,5184779	0,8180423	0,0002658	0,0103328
Ccl20	44,703367	5,4823116	-0,255482	0,0003465	0,0121105
Kcne1l	44,368067	5,4714498	4,7666052	0,0002664	0,0103328
Msln	44,283824	5,4687079	2,0370515	0,0005657	0,016224
Tnfsf4	44,200277	5,4659835	-3,826113	0,0003208	0,0115463
Mybpc2	43,87039	5,4551756	-2,830351	0,0015294	0,0293833
Il23a	43,238702	5,4342513	-0,212368	1,65E-05	0,0019357
Cntn5	40,166946	5,3279369	-3,170792	0,0011265	0,024326
Nppb	39,41748	5,3007637	1,0907339	8,02E-06	0,0013103
Tcaf3	38,80306	5,2780985	-3,920056	9,83E-06	0,0014967
Pln	38,619475	5,2712566	0,7041393	0,0002196	0,0092259
Cpa6	38,209104	5,2558445	-2,468246	0,0016495	0,030702
Il34	38,016968	5,2485716	-2,471882	0,0013298	0,0268012
Il12a	38,008424	5,2482473	-3,183909	0,0031799	0,0458768
Crygb	37,855407	5,2424275	-0,990008	8,76E-05	0,0051737
Dmkn	36,902318	5,2056395	0,6497694	0,000104	0,0057651
Dmkn	36,902318	5,2056395	0,6497694	0,000104	0,0057651
Serpine1	35,79527	5,161697	-2,236751	0,0014513	0,0284785
Sv2b	30,116406	4,9124777	0,9462092	0,001329	0,0268012
Ch25h	26,835548	4,7460734	1,8607093	0,0001878	0,0084307
Myh7	26,064658	4,704023	3,3194914	0,0013001	0,0265732

TABLA 2 (PE>EE)

	FC	logratio	meanExp	pval	adj.pval
Klb	-2054,442	-11,00453	-1,05684	4,05E-08	0,0002173
Hnf4a	-1578,751	-10,62457	-0,467963	1,28E-05	0,0016348
Foxa3	-1547,61	-10,59583	0,2926133	0,0003837	0,0128487
Nepn	-1546,536	-10,59482	-0,473765	1,59E-05	0,0019087
Hgfac	-1081,454	-10,07876	-1,519727	3,26E-08	0,0002173
Ugt2b34	-1039,459	-10,02162	-1,548297	4,74E-08	0,0002173
Afm	-987,4298	-9,947534	-0,79741	2,44E-05	0,0023675
Serpina1b	-978,9664	-9,935115	1,6663217	0,0013212	0,0266947
Hnf1a	-934,6184	-9,868234	-1,624988	3,22E-08	0,0002173
Fmo1	-749,0386	-9,548896	-1,784657	1,71E-07	0,000224
Serpina1e	-740,7948	-9,53293	0,122648	0,0016782	0,0309944
Alb	-735,8317	-9,523232	1,6070309	0,0035687	0,0494229
Proc	-728,3961	-9,508579	-1,804816	3,13E-07	0,0002585
Kif12	-705,6731	-9,462856	-0,26089	2,26E-05	0,0023132
Nr5a2	-674,2911	-9,397228	-1,860491	9,99E-08	0,0002173
Bhmt	-673,6589	-9,395874	-1,07324	3,25E-05	0,0028957
Gys2	-639,6561	-9,321153	-1,898529	7,72E-08	0,0002173
Gjb1	-566,2972	-9,145416	-1,986397	1,06E-06	0,0004673
Apob	-563,0399	-9,137093	-0,113017	0,0019144	0,0338881
Itih2	-561,315	-9,132667	4,0050077	0,0003545	0,0122425
H2-Q1	-522,6772	-9,029777	-2,044217	4,41E-08	0,0002173
Sec14l4	-505,0499	-8,980282	0,203991	0,0004102	0,0134429
Spink1	-478,0329	-8,900966	-0,366206	0,0014967	0,0290368
Lect2	-477,0065	-8,897865	-0,741946	0,0005747	0,0163962
Trpv6	-475,6831	-8,893857	-2,112177	9,68E-07	0,0004527
St8sia3	-474,8204	-8,891238	0,5044834	0,0003979	0,0131856
Fgb	-467,6659	-8,869335	5,155839	0,0010598	0,0237265
Serpina10	-452,085	-8,82045	-2,14888	6,84E-08	0,0002173
Cpb2	-445,9595	-8,800769	-0,909178	0,000367	0,012564
Colec10	-415,5224	-8,698783	-0,739801	0,0007461	0,0191631
Cdcp1	-402,0135	-8,6511	-2,233555	5,23E-07	0,0003287
Akr1b7	-394,8377	-8,625116	-2,246547	1,64E-07	0,000224
Serpinf2	-380,1445	-8,570404	4,9320761	0,0006759	0,0181623
Gckr	-358,1333	-8,484353	-1,529001	4,19E-05	0,0034164
A1cf	-324,2709	-8,341056	-0,721722	7,03E-05	0,0043904
Rfx6	-322,1431	-8,331558	-2,393326	2,08E-06	0,0006648
Vtn	-316,6025	-8,306529	4,2654817	5,99E-05	0,0043173
Tff3	-302,6413	-8,241465	-2,438373	4,71E-07	0,0003195
Cldn5	-296,4204	-8,211501	-2,453355	0,0001983	0,0087152
S100g	-285,6933	-8,158323	-1,692015	6,87E-05	0,0043173
Ces1d	-282,6893	-8,143074	-2,487568	1,28E-07	0,0002173
Paqr9	-281,0339	-8,1346	-0,464768	0,000241	0,0097917
Ambp	-279,0357	-8,124306	5,1167867	0,0004963	0,0152369
Apoa5	-278,5675	-8,121883	-1,610167	9,83E-05	0,0055605
Akr1c19	-274,8535	-8,102519	2,4803791	8,26E-06	0,0013402
Angptl8	-264,9617	-8,04964	-1,166059	0,0008922	0,021397
Igfals	-262,39	-8,035569	-2,541321	1,04E-07	0,0002173
Prl3b1	-260,458	-8,024907	-1,758724	0,0001182	0,0062419
F7	-253,0528	-7,983295	-1,77953	0,0001142	0,0061217
Prl4a1	-251,855	-7,97645	-2,57088	0,0007897	0,0197102

Gimdl	-250,2896	-7,967455	-1,325835	0,000886	0,0213111
Hkdc1	-249,2412	-7,961399	0,8528817	0,0028293	0,0430023
Lipc	-246,5646	-7,945822	-1,514075	0,0002938	0,0108514
Itih1	-243,9322	-7,930336	-2,593937	1,29E-05	0,0016394
F12	-218,6415	-7,772424	-1,192223	0,0024484	0,0391588
Sgk2	-218,1571	-7,769223	-2,674493	2,15E-06	0,0006648
Afp	-213,8618	-7,740535	7,1185481	0,00083	0,0203976
Prodh2	-209,8068	-7,712918	-0,852655	0,000203	0,0088153
Apoa1	-203,4117	-7,668259	3,0276857	0,0004737	0,0146807
Ttr	-202,1166	-7,659044	4,7682373	1,81E-05	0,0020234
Cyp3a13	-199,8445	-7,642734	-2,737738	4,57E-06	0,0009523
Qrfpr	-198,5123	-7,633085	-2,742563	2,05E-07	0,000224
Thpo	-198,4024	-7,632286	-1,955034	8,70E-05	0,0051514
Serpina1c	-194,766	-7,605598	-1,684187	0,0003329	0,0118392
C8b	-188,7455	-7,560298	-2,778956	1,68E-07	0,000224
Aldob	-187,5373	-7,551034	-1,99566	8,95E-05	0,0052108
Cyp2c70	-186,4021	-7,542274	-2,787968	1,13E-06	0,0004803
Rln3	-185,7412	-7,53715	-2,79053	2,01E-07	0,000224
Pla2g2d	-182,9699	-7,515462	-2,801374	2,06E-07	0,000224
Apba2	-182,717	-7,513467	-1,730252	0,0003615	0,0124112
Apcs	-180,5975	-7,496634	-2,810788	1,69E-06	0,0006293
Gabrg3	-171,7308	-7,424005	-2,847103	3,02E-06	0,0007809
Pde6c	-171,7063	-7,423799	-2,847206	1,24E-07	0,0002173
Aplnr	-171,67	-7,423494	2,9406765	0,0009478	0,022238