

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa De Pós-Graduação Em Bioquímica E Imunologia**

Lucas Rodrigues Aguiar Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E FOSFOPROTEÔMICA DA CARDIOMIOPATIA  
DILATADA INDUZIDA PELA DELEÇÃO GÊNICA DO RECEPTOR MRGD EM  
CAMUNDONGOS**

BELO HORIZONTE

2021

Lucas Rodrigues Aguiar Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E FOSFOPROTEÔMICA DA CARDIOMIOPATIA  
DILATADA INDUZIDA PELA DELEÇÃO GÊNICA DO RECEPTOR MRGD EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano-Braga

BELO HORIZONTE

2021

043

Ribeiro, Lucas Rodrigues Aguiar.

Caracterização proteômica e fosfoproteômica da cardiomiopatia dilatada induzida pela deleção gênica do receptor MrgD em camundongos [manuscrito] / Lucas Rodrigues Aguiar Ribeiro. – 2021.

110 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano-Braga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Oligopeptídeos. 4. Cardiomiopatia Dilatada. 5. Proteômica. I. Verano-Braga, Thiago. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
31270-901 – Belo Horizonte – MG  
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS RODRIGUES AGUIAR RIBEIRO.** Aos treze dias do mês de setembro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização Proteômica e Fosfoproteômica da Cardiomiopatia Dilatada Induzida Pela Deleção Gênica do Receptor MRGD em Camundongos", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Thiago Verano Braga, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria José Campagnole Santos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Thiago Verano Braga - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de setembro de 2021.

Dra. Maria José Campagnole-Santos (UFMG)

Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)

Dr. Thiago Verano Braga - Orientador (UFMG)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela vida que nos proporciona oportunidades diversas de vivências, aprendizados e trabalho, que nos aperfeiçoam o raciocínio e abrandam o coração.

À espiritualidade amiga, por estar sempre tão perto e auxiliando em tudo quanto possível, pelos conselhos diversos, intuições e proteção.

Aos meus pais, Roberto Ribeiro e Rogéria Rodrigues por todos os esforços e incentivos ao estudo e ao trabalho duro e honesto. Por me ensinarem a exemplo próprio, lições de resiliência e força diante as situações da vida. E pelo afeto e cuidado que sempre tiveram comigo. Às minhas irmãs queridas Letícia e Thalita pela amizade sincera, pelo carinho e alegria contagiante que torna a vida mais leve.

Aos meus avós, pelo afeto, proteção, carinho, aconchego, orações e palavras de incentivo que sempre me renovam as forças. Em especial ao vô Inhô (Francisco Ribeiro) que nos deixou durante a preparação deste trabalho, mas que com seu exemplo de amor ao próximo, resignação e bondade me inspira às melhores aspirações. E à vó Rosa (Rosalina Aguiar) pelo carinho imenso, por ser meu porto seguro e minha protetora.

Aos meus professores, por serem peças fundamentais na minha formação humana e intelectual. E, pelos conselhos e ensinamentos que me foram tão úteis no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Thiago Braga, por ser um verdadeiro pai científico, professor e amigo. Pela oportunidade e confiança depositada em mim para desenvolver este e outros trabalhos.

Aos meus amigos, Diana, Filipi, Ednéia, Igor, Rafael, Filipe, Ana Carolina, Fábio e todos os colegas de laboratório que com certeza fizeram os meus dias mais leves, descontraídos e de muito aprendizado. E ao Nathan, Gabriel e Nayara pela amizade sincera e despretensiosa que sempre me proporciona momentos de descontração e alegria.

À minha companheira, Núbia Lataliza, pela lealdade, amizade e companheirismo. Por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao professor Miguel Ortega (Miguelito), por me emprestar um computador para a escrita da dissertação, sem o qual eu não teria os meios para escrever esse trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho, professora Silvia Guatimosim e Itamar de Jesus pelo auxílio na dissociação dos cardiomiócitos. E ao professor Fábio Nogueira e ao Joseph Evaristo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por me receberem ao seu laboratório para realizar as análises de espectrometria de massa.

Às agências de fomento, CNPq pela bolsa de mestrado e a CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

*“O grande rio tem seu trajeto, antes do mar imenso. Copiando-lhe a expressão, a alma percorre igualmente caminhos variados e etapas diversas, também recebe afluentes de conhecimentos, aqui e ali, avoluma-se em expressão e purifica-se em qualidade, antes de encontrar o Oceano Eterno da Sabedoria.” (André Luiz, psicografado por Chico Xavier)*

## RESUMO

O sistema renina angiotensina (SRA) desempenha um papel essencial na homeostase cardiovascular. Várias enzimas, peptídeos ativos e receptores regulam o SRA durante condições fisiológicas e patológicas. Recentemente, um estudo mostrou que a deleção de um componente do RAS (gene MrgD) levou a uma remodelação ventricular esquerda significativa, desenvolvendo cardiomiopatia dilatada grave (DCM) em camundongos. A DCM é uma doença do músculo cardíaco caracterizada pelo aumento e dilatação de um ou de ambos os ventrículos, juntamente com comprometimento da contratilidade. Além disso, o DCM é a razão mais comum para o transplante de coração em todo o mundo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização proteômica e fosfoproteômica dos tecidos e células cardíacas derivadas de camundongos sem o gene MrgD, para um melhor entendimento do papel desse receptor na DCM. Assim, o ventrículo esquerdo, os cardiomiócitos ventriculares e a matriz extracelular de camundongos adultos knockout para MrgD (mrgd-ko) e C57Bl6 (wt) foram submetidos à análise proteômica. A análise proteômica funcional mostrou que a deleção MrgD desencadeia mudanças significativas nas vias relacionadas à homeostase iônica, contração muscular, sinalização adrenérgica, organização do sarcômero e adesão focal.

Palavras-chave: Sistema Renina Angiotensina; Alamandina; MrgD; Cardiomiopatia Dilatada; Proteômica; Fosfoproteômica.

## **ABSTRACT**

The renin angiotensin system (RAS) plays an essential role in the cardiovascular homeostasis. Several enzymes, active peptides and receptors are regulating RAS during physiological and pathological conditions. Recently, a study showed that deletion of a RAS component (MrgD gene) led to a significant left ventricular remodeling, developing severe dilated cardiomyopathy (DCM) in mice. DCM is a disease of the cardiac muscle characterized by enlargement and dilation of one or both of the ventricles along with impaired contractility. Moreover, DCM is the most common reason for heart transplantation worldwide. Therefore, we aimed to perform a proteomic and phosphoproteomic characterization of the cardiac tissues and cardiac cells derived from mice without MRGD gene for a better understanding of the role of this receptor in DCM. Thus, the left ventricle, the ventricular cardiomyocytes and the extracellular matrix from MrgD-knockout (mrgd-ko) and C57Bl6 (wt) adult mice were submitted to proteomics analysis. Functional proteomics analysis showed that MrgD deletion triggers significant changes in pathways related to ionic homeostasis, muscle contraction, adrenergic signaling, sarcomere organization and focal adhesion.

Keywords: Renin Angiotensin System; Alamandine; MrgD; Dilated Cardiomyopathy; Proteomics; Phosphoproteomics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado das vias de formação dos peptídeos efetores do sistema renina angiotensina .....	15
Figura 2 – Esquema da estrutura do coração .....	18
Figura 3 – Esquema do músculo cardíaco .....	19
Figura 4 – Estrutura básica do sarcômero .....	20
Figura 5 – Esquema simplificada de uma estratégia “ <i>shotgun/bottom-up</i> ” .....	26
Figura 6 – Esquema simplificado dos desenhos experimentais usados em espectrometria de massa quantitativa .....	28
Figura 7 – Esquema da reação química para marcação 3-plex (“dimethyl labeling”) ...	29
Figura 8 – Esquema da ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) ..	31
Figura 9 – Esquema do mecanismo de ionização por eletrospray (ESI) .....	32
Figura 10 – Esquema de um analisador de massa do tipo quadrupolo .....	33
Figura 11 – Esquema de um analisador de massa do tipo TOF .....	33
Figura 12 – Esquema de um analisador de massa do tipo armadilha de íons .....	34
Figura 13 – Esquema de um analisador de massa do “ <i>orbitrap</i> ” .....	35
Figura 14 – Análise dos parâmetros morfométricos do coração .....	45
Figura 15 – Análise dos dados proteômicos .....	48
Figura 16 – Vias de sinalização e ontologia gênica enriquecidas nos tecidos cardíacos induzidos pela deleção do gene <i>MrgD</i> .....	51
Figura 17 – Análise funcional dos dados proteômicos .....	58

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Genes mais comuns envolvidos na cardiomiopatia dilatada .....	23
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AEC – Acoplamento excitação-contração
- ACN – Acetonitrila
- ANG-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
- ANG A – Angiotensina A
- ANG I – Angiotensina I
- ANG II – Angiotensina II
- AT1 – Receptor de Angiotensina 1
- BP – *Biological process*
- CC – *Celullar Component*
- CEUA – Comissão de ética no uso de animais
- CHO – *Chinese hamster ovary*
- CMD – Cardiomiopatia dilatada
- CMV – Cardiomiócitos ventriculares
- DDA – *Data dependent analysis*
- DHB – Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
- DIA – *Data Independent Analysis*
- ECA – Enzima conversora de angiotensina
- ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2
- ECM – *Extracelullar matrix*
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ESI – *Eletrospray Ionization*
- FDR – *False Discovery Rate*
- GO – *Gene onthology*
- GPCR – Receptor acoplado a proteína G
- HEPES – Ácido hidroxí-etil-piperazina-etanosulfônico
- LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em sequência
- LEC – Líquido extracelular
- LIC – Líquido intracelular
- MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
- MRG – Gene relacionado ao receptor MAS

MRGD-KO – Animais nocauteados para o gene MRGD

NEP – Endopeptidase neutra

PBS – Tampão fosfato salino

PCA – *Principal Component Analysis*

PEP – Prolil endopeptidase

PTM – *Post translational modification*

ROS – *Reactive oxygen species*

RPLC – *Reverse Phase Liquid Cromatography*

SDS – Sódio dodecyl sulfato

SRA – Sistema Renina Angiotensina

TCEP – Tris(2-carboxietil) fosfina

TEAB – Brometo de trietil-amônio

TOF – *Time of light*

TOP – Oligopeptidase timet

VE – Ventrículo esquerdo

WT – *Wild type*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	<b>Sistema Renina Angiotensina</b>	14
1.2	<b>Eixo Alamandina/MrgD</b>	16
1.2.1	Receptor MrgD	16
1.2.2	Alamandina	17
1.3	<b>O Coração</b>	18
1.3.1	Tecido Muscular Cardíaco	19
1.3.2	Sarcômeros	20
1.3.3	Acoplamento Excitação-Contração no Músculo Cardíaco	21
1.3.4	Matriz Extracelular	22
1.4	<b>A Cardiomiopatia Dilatada</b>	22
1.4.1	Epidemiologia da Cardiomiopatia Dilatada	23
1.4.2	Causas Genéticas da Cardiomiopatia Dilatada	23
1.5	<b>Cardiomiopatia Dilatada Induzida pela Deleção Gênica do MrgD</b>	25
1.6	<b>Proteômica</b>	25
1.6.1	Fosfoproteoma	26
1.6.2	Abordagens Proteômicas: <i>shotgun/bottom-up</i>	27
1.6.3	Proteoma Quantitativo	28
1.6.4	Método de Separação de Peptídeos	31
1.7	<b>Espectrometria de Massa</b>	32
1.7.1	Fontes de Ionização	32
1.7.1.1	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - <i>MALDI</i>	32
1.7.1.2	Ionização <i>Electrospray</i> – ESI	33
1.7.2	Analisadores de Massa	34
1.7.2.1	Quadrupolo	34
1.7.2.2	Tempo de Voo - <i>TOF</i>	35
1.7.2.3	Armadilha Iônica - <i>ION TRAP</i>	36
1.7.2.4	Armadilha Iônica – <i>ORBITRAP</i>	36
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	39
3.1	<b>Objetivos específicos</b>	39

<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
4.1	<b>Aspectos Éticos</b> .....	40
4.2	<b>Materiais</b> .....	40
4.3	<b>Animais</b> .....	40
4.4	<b>Medição da Massa Corporal e Cardíaca</b> .....	40
4.5	<b>Análises Histológicas (HE)</b> .....	41
4.6	<b>Obtenção de Tecidos e Células</b> .....	41
4.6.1	Ventrículo Esquerdo (LVT) .....	41
4.6.2	Cardiomiócitos Ventriculares (CMV).....	41
4.6.3	Matriz Extracelular Cardíaca (ECM) .....	42
4.7	<b>Análises Proteômicas</b> .....	42
4.7.1	Preparação de Amostras .....	43
4.7.2	Marcação Isotópica “ <i>Dimethyl Labeling</i> ” .....	43
4.7.3	Enriquecimento de Fosfopeptídeos .....	44
4.7.4	Pré-Fracionamento de Fase Reversa em pH básico.....	44
4.7.5	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa .....	45
4.7.6	Análises dos Dados .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
5.1	<b>Caracterização Morfológica dos Corações de Animais wt e mrgd-ko</b> .....	48
5.2	<b>Caracterização Proteômica e Fosfoproteômica</b> .....	48
5.2.1	Desenho Experimental .....	49
5.2.2	Análise dos Dados Proteômicos .....	49
5.2.3	Vias de Sinalização (KEGG) e Ontologia Gênica (GO) Associadas à Deleção do Receptor MrgD .....	52
5.2.4	Vias de Sinalização (KEGG e REACTOME) e Ontologia Gênica (GO) do Fosfoproteoma.....	53
5.3	<b>Análises Funcionais dos Dados Proteômicos</b> .....	54
5.3.1	A deleção do gene MRGD Induziu Alterações na Fosforilação de Proteínas Quinases Importantes no Contexto Cardíaco .....	55
5.3.2	A Deleção Gênica do MRGD Induziu Alterações em Transportadores Iônicos 55	
5.3.3	A Deleção do Gene MRGD Induziu Alterações em Proteínas dos Sarcômeros 57	

5.3.4	A Deleção do Gene MRGD Induziu Alterações em Proteínas Relacionadas com a Transmissão da Força Biomecânica no Coração .....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>106</b>

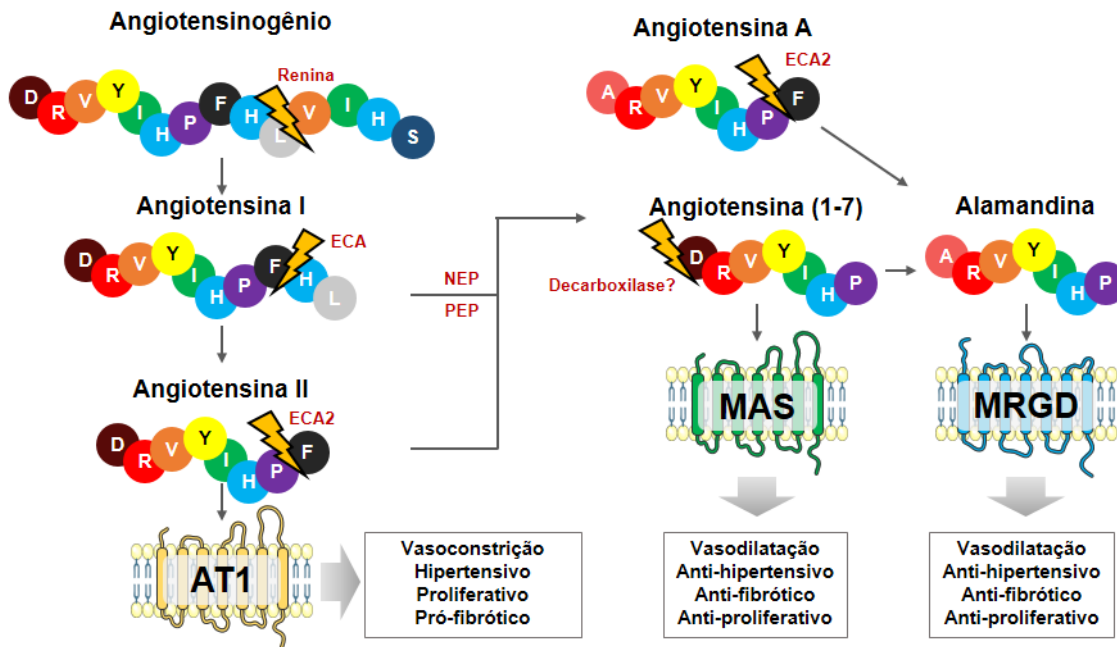
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina angiotensina (SRA) desempenha um papel essencial para a fisiologia cardiovascular. Vários estudos mostram a relação entre o SRA e o controle da homeostase iônica, volemia, estabilidade hemodinâmica e rigidez cardíaca (Jia, Aroor, *et al.*, 2018; Jia, Hill, *et al.*, 2018). Entretanto, em condições patofisiológicas, a desregulação dos componentes desse sistema pode desencadear processos inflamatórios e levar ao desenvolvimento de várias desordens locais e sistêmicas (Paul *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2018; Paz Ocaranza *et al.*, 2020). Por isso, desde a sua descoberta, o SRA tem sido um importante alvo para o tratamento de distúrbios no sistema cardiovascular (Ferreira *et al.*, 2010).

O SRA é composto por uma cascata de reações enzimáticas que geram peptídeos com efeito vasoativos. No eixo clássico, a produção desses peptídeos inicia-se pela clivagem do angiotensinogênio, uma proteína plasmática de alta massa molecular, pela enzima renina, formando a angiotensina I (Ang I), que é um decapeptídeo de sequência [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu] sem efeito conhecido, que é posteriormente clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando a angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo de sequência [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe] e que é agonista preferencial do receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1). A ativação desse receptor pela Ang II induz vasoconstrição, hipertrofia cardíaca, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do inglês), fibrose, inflamação, entre outros (Forrester *et al.*, 2018). Esses efeitos são contrabalanceados pela ativação do eixo não clássico ou protetor, que acontece através da clivagem da Ang I pelas enzimas prolil endopeptidase (PEP), oligopeptidase timet (TOP), endopeptidase neutra (NEP) ou a partir da clivagem da Ang II pela PEP ou ECA2, formando a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), um heptapeptídeo de sequência [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro] e agonista do receptor MAS. A ativação do receptor MAS pela Ang-(1-7) desencadeia efeitos protetores no sistema cardiovascular (Santos *et al.*, 2018; Miller e Arnold, 2019; Paz Ocaranza *et al.*, 2020). Embora a maior parte da Ang-(1-7) produzida seja a partir da ECA2, existe uma porção menos significativa

que é formada a partir da hidrólise da Angiotensina-(1-9) pela ECA (Mckinney *et al.*, 2014). Além disso, a Ang-(1-7) pode ser transformada em Alamandina, um heptapeptídeo de sequência [Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro]. De forma paralela, a Ang II, por ação de uma enzima ainda desconhecida, que promova a descarboxilação do resíduo de aspartato N-terminal (Asp<sup>1</sup>), pode se transformar em angiotensina A (Ang A), um octapeptídeo de sequência [Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe] capaz de se ligar ao receptor AT1 (Hrenak *et al.*, 2016). A Ang A também pode ser transformada em Alamandina. A figura 1 representa as vias de formação dos peptídeos efetores do RAS. Através da interação com seu receptor endógeno Membro D do receptor acoplado à proteína G relacionado ao MAS (MrgD), a Alamandina induz efeitos muito parecidos aos da Ang-(1-7) (Lautner *et al.*, 2013; Paz Ocaranza *et al.*, 2020).



**Figura 1** – Esquema simplificado das vias de formação dos peptídeos efetores do sistema renina-angiotensina.

## 1.2 Eixo Alamandina/MrgD

### 1.2.1 Receptor MrgD

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são formados por sete hélices transmembrana, com a porção N-terminal no meio extracelular e a porção C-terminal intracelular. Os GPCRs são a maior família de receptores de superfície e as primeiras entidades envolvidas na sinalização celular (Hilger *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Além disso, apresentam papéis importantes em vários processos fisiológicos, como a proliferação, diferenciação, quimiotaxia e comunicação celular (Lefkowitz, 2013; Wang *et al.*, 2018). A interação do ligante com o GPCR gera uma mudança conformacional do receptor, iniciando o ciclo de atividade da proteína G e induzindo vários sinais intracelulares (Lembo *et al.*, 2002; Latorraca *et al.*, 2017). Os GPCRs podem ser ativados por uma grande variedade de ligantes, incluindo neuropeptídeos, aminas biogênicas, aminoácidos, luz (fótons), quimiocinas, fatores de crescimento, entre outros (Lembo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2018). As proteínas G são proteínas intermediárias essenciais para a transdução de sinal, ligando-se em diversos GPCRs localizados na superfície celular (Hilger *et al.*, 2018).

Os genes dos receptores relacionados ao MAS (MRGs) constituem uma subfamília de GPCR que são expressos principalmente em células neurais. Em estudos iniciais foram associados a inflamação e nocicepção, inclusive na regulação da percepção, sensação e estímulo da dor (Dong *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Avula *et al.*, 2013).

O receptor MrgD, também conhecido como TGR7, faz parte da classe D dessa subfamília e apresenta cerca de 30% de similaridade com o receptor MAS. Além disso, o receptor MRGD apresenta um alto grau de ortologia entre espécies de murinos e primatas (Zylka *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005), sugerindo uma possível conservação na função desse receptor nessas espécies. Embora o MrgD tenha alta similaridade com os MRGs de classe A, B e C, e durante os estágios de desenvolvimento esses receptores sejam expressos conjuntamente, sua expressão pós nascimento parece ser segregada desses receptores, levando a uma localização diferente (Liu *et al.*, 2008). O MrgD é expresso em praticamente todos os órgãos, com maior predominância em tecidos e células cerebrais

e cardíacas, testículo, bexiga, artéria e tecidos adiposos (Shinohara *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2019). Além disso, células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com os genes de MrgD humano, ratos e camundongos apresentam resposta ao estímulo com a  $\beta$ -Alanina, aumentando os níveis de cálcio intracelular e ativando a fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitogênio (ERK1/2) (Shinohara *et al.*, 2004; Milasta *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Alamandina

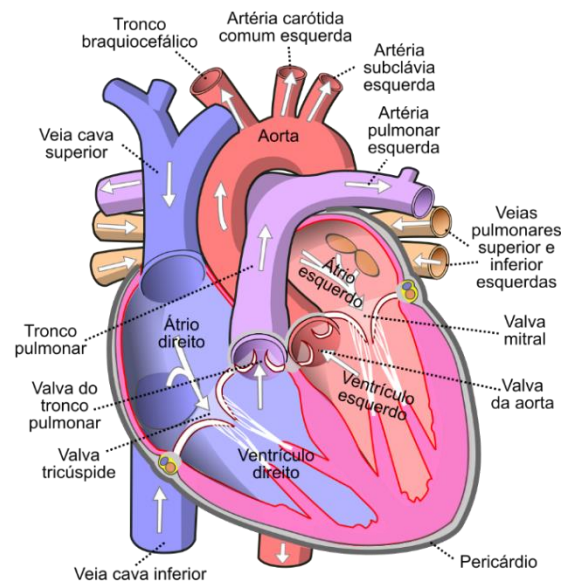
A alamandina foi o último peptídeo hormonal pertencente ao SRA a ser identificado (Lautner *et al.*, 2013) e, desde então, tem sido considerado o agonista pleno do MrgD, por ativar esse receptor em menores concentrações que a  $\beta$ -Alanina. Entretanto, a alamandina também parece se ligar ao AT1, mas com uma afinidade menor, e bloquear seus efeitos (Soltani Hekmat *et al.*, 2017; Michalatou *et al.*, 2018). No conhecimento atual, a formação da alamandina pode acontecer por duas rotas enzimáticas diferentes (Figura 1). A primeira acontece pela hidrólise da Ang A pela ECA2, formando a alamandina e a segunda pela descarboxilação da Ang-(1-7) em seu primeiro resíduo de amino ácido, transformando o Asp<sup>1</sup> em um resíduo de Ala<sup>1</sup> (Lautner *et al.*, 2013). Embora a enzima que realiza essa descarboxilação seja ainda desconhecida, existe a hipótese de que bactérias presente no trato gastrointestinal e no coração possam converter a Ang II e a Ang-(1-7) em Ang A e Alamandina, respectivamente (Jha *et al.*, 2020).

Quando a alamandina foi identificada pela primeira vez, por Lautner e colaboradores (Lautner *et al.*, 2013), o seu efeito foi descrito como uma molécula vasodilatadora. Após a sua caracterização, vários outros estudos também têm mostrado os efeitos anti-hipertensivos da alamandina (Soares *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Hekmat *et al.*, 2019). O tratamento com alamandina também parece diminuir a degranulação de neutrófilos e atenuar a resposta inflamatória induzida por macrófagos, indicando um efeito anti-inflamatório para esse heptapeptídeo (Da Silva *et al.*, 2017; De Souza-Neto *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019). Além disso, a alamandina foi reportada como capaz de induzir uma resposta para a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do inglês) e diminuir o estresse oxidativo (Qaradakhi *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020), atuar como um agente anti-fibrótico (De Souza-Neto *et al.*, 2019; Wang

*et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020), atenuar a hipertrofia de cardiomiócitos e do tecido cardíaco (Liu *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021), promover um efeito antiproliferativo seletivo à células tumorais (Leão *et al.*, 2020) e induzir um efeito antidepressivo em ratos transgênicos apresentando uma expressão reduzida de angiotensinogênio no cérebro (Almeida-Santos *et al.*, 2021). Além disso, camundongos com o gene MrgD deletado desenvolvem uma cardiomiopatia dilatada severa (Oliveira *et al.*, 2019). Desta forma, fica claro que o eixo Alamandina-MrgD apresenta um papel importante na homeostase do coração, apesar de não ser o único tecido-alvo.

### **1.3 O Coração**

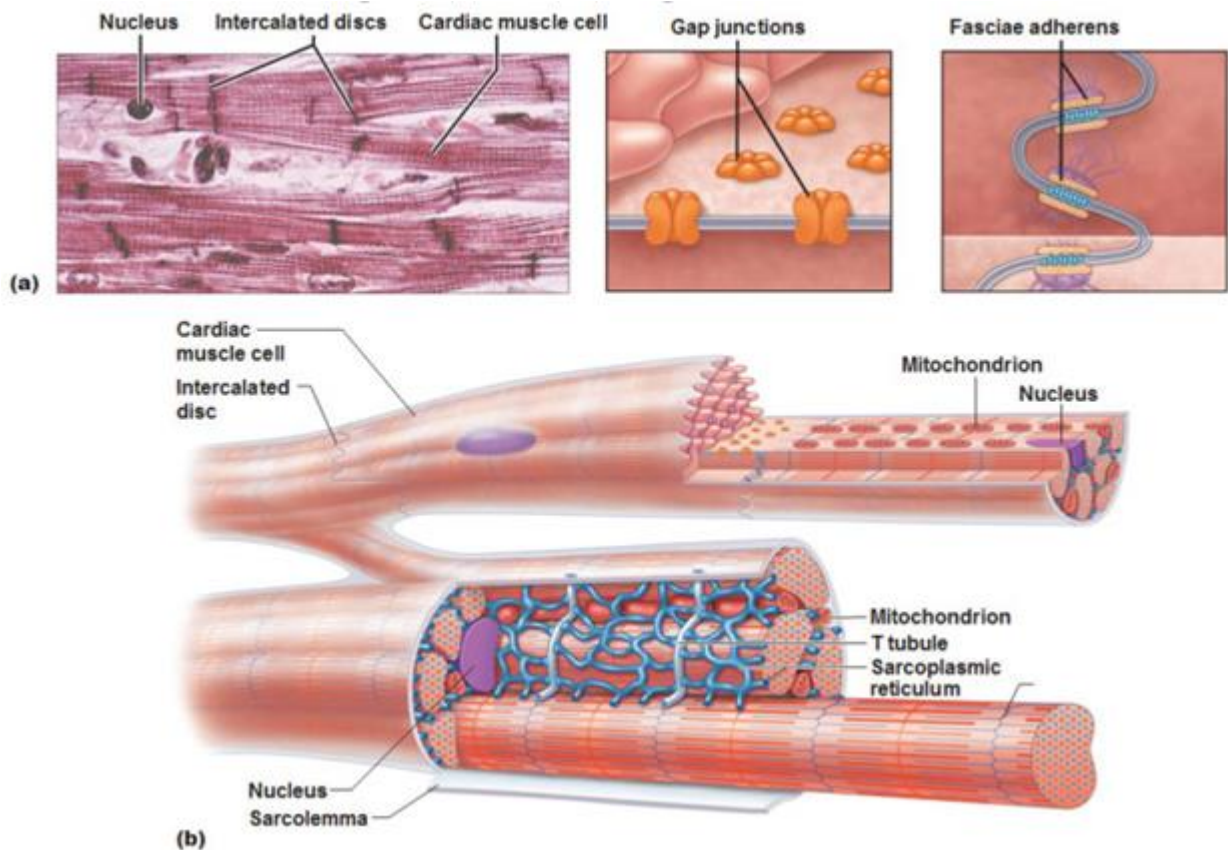
O coração (Figura 2) é um órgão pulsátil que apresenta quatro câmaras organizadas em duas bombas (direita e esquerda) para fornecer um fluxo sanguíneo constante às circulações sistêmicas e pulmonar. Resumidamente, o ciclo cardíaco funciona da seguinte forma: o ventrículo direito bombeia o sangue desoxigenado (rico em CO<sub>2</sub>) proveniente da circulação sistêmica e do próprio músculo cardíaco para os pulmões, através do tronco pulmonar, que se ramifica em artérias pulmonares direita e esquerda. Dentro dos pulmões o sangue é oxigenado e o excesso de CO<sub>2</sub> é eliminado. O sangue oxigenado é coletado pelas veias pulmonares, que se abrem no átrio esquerdo, que atuam como uma cavidade de coleta do sangue oxigenado. O átrio esquerdo bombeia o sangue para o ventrículo esquerdo passando pela válvula mitral. Então o ventrículo esquerdo bombeia o sangue oxigenado para a circulação sistêmica, através da artéria aorta. Ao realizar as trocas gasosas nos tecidos periféricos, o sangue retorna ao átrio direito e o ciclo se repete (Rehman e Rehman, 2021).



**Figura 2** – Esquema da estrutura anômica do coração. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Diagram\\_of\\_the\\_human\\_heart\\_\(cropped\)\\_pt.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_of_the_human_heart_(cropped)_pt.svg). Acesso em: 08/2021.

### 1.3.1 Tecido Muscular Cardíaco

O tecido muscular cardíaco (Figura 3), assim como o esquelético, é uma derivação do tecido muscular estriado. O músculo estriado cardíaco é especializado em realizar a contração do coração pela conversão da energia eletroquímica em energia motora (Shadrin *et al.*, 2016). Esse tecido é composto por diversas fibras musculares (miócitos), formados por estruturas cilíndricas conhecidas como miofibrilas (Hwang e Sykes, 2015; Rassier, 2017). As miofibrilas são formadas por vários sarcômeros (figura 4) organizados de forma contínua. A repetição dessas unidades motoras micrométricas forma a anatomia do músculo estriado cardíaco (Hwang e Sykes, 2015). Além disso, esse tecido apresenta estruturas tubulares que se localizam entre as miofibrilas. Esses túbulos (Túbulos T) são essenciais para os processos de contração e relaxamento cardíaco (Sonnenblick e Stam, 1969).

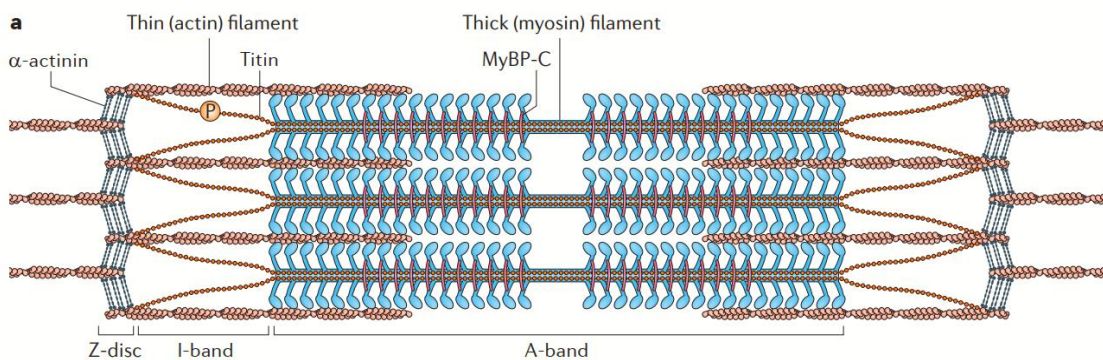


**Figura 3** – Esquema da histologia do músculo estriado cardíaco: (a) corte histológico do tecido muscular cardíaco com estruturas do núcleo, discos intercarales e os cardiomiócitos apontados e esquemas mostrando as junções do tipo Gap e os complexos de adesão focal; (b) esquema do musculo cardíaco mostrando a sua estrutura e apontando a localização das células cardíacas, discos intercalares, núcleo, mitocôndria, Túbulos T e retículo endoplasmático. Disponível em: <https://socratic.org/questions/what-is-the-function-of-cardiac-muscles-cells>. Acesso em: 08/2021.

### 1.3.2 Sarcômeros

Os sarcômeros são estruturas compostas por proteínas intercalares, organizadas em três dimensões, que respondem a uma mudança nos níveis de íons cálcio, gerando uma força ativa e passiva (Frazier *et al.*, 2011; Rassier, 2017). Microscopicamente, o sarcômero é dividido em três porções, as bandas A e I, e os discos Z (Rassier, 2017). Os discos Z delimitam as bordas laterais dos sarcômeros e consistem em filamentos de actina que estão ligados a moléculas de  $\alpha$ -actinina (Knoll *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2018). A banda I abrange uma área adjacente ao disco Z e é composta principalmente pelos filamentos de actina e titina (Rassier, 2017). A banda A abrange a maior parte do sarcômero e é nesta

estrutura que os filamentos espessos (composto majoritariamente por miosina) e finos (compostos principalmente por actina) estão sobrepostos (Rassier, 2017). Nessa mesma banda a titina forma um filamento contínuo que abrange pelo menos a metade do comprimento do filamento espesso, abrangendo o centro do sarcômero até o disco Z (Radke *et al.*, 2019). Além disso, os sarcômeros adjacentes são ligados uns aos outros por filamentos de  $\alpha$ -actinina (Hsu *et al.*, 2018). A figura 4 mostra a estrutura básica do sarcômero.



**Figura 4** – Estrutura básica do sarcômero. Representação da organização dos filamentos de miosina, actina,  $\alpha$ -actinina e titina. A proteína C de ligação com a miosina (MyBP-C, sigla em inglês) em azul faz a estabilização das interações entre os filamentos (Hwang e Sykes, 2015).

### 1.3.3 Acoplamento Excitação-Contração no Músculo Cardíaco

O processo de acoplamento excitação-contração (AEC) é a associação da excitação (potencial de ação) à contração do músculo cardíaco. O AEC é responsável por controlar a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  durante os processos de sístole e diástole do coração. Na sístole, a despolarização produzida pelo potencial de ação nas células cardíacas abre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem do tipo L, localizados na membrana e nos túbulos T. Essa abertura promove um influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  em um espaço situado entre o sarcolema (membrana plasmática) e o retículo endoplasmático (RE). O aumento da concentração desses íons induz a ativação do receptor Rianodina, promovendo a liberação de mais íons  $\text{Ca}^{2+}$  nesse espaço. Essas duas fontes de cálcio aumentam o gradiente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que por sua vez se ligam a Troponina, resultando no deslizamento dos filamentos espessos e finos, realizando o encurtamento dos miócitos

cardíacos (Eisner *et al.*, 2017). Durante o processo de repolarização das células cardíacas, os canais de cálcio e Rianodina se fecham, então os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são bombeados para o RE pela SERCA e o restante é removido para o líquido extracelular (LEC) através do trocador de sódio cálcio (NCX) (Aronsen *et al.*, 2013). O influxo de íons  $\text{Na}^+$  para o líquido intracelular (LIC) gerado pelo NCX é controlado pela bomba de sódio/potássio, que realiza o efluxo de íons  $\text{Na}^+$ , reestabelecendo o potencial de repouso nas células cardíacas (Aronsen *et al.*, 2013).

#### 1.3.4 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (ECM) apresenta muitas funções, não sendo apenas um suporte inerte para os cardiomiócitos (miócitos cardíacos) (Lockhart *et al.*, 2011). A ECM é de fato uma malha não celularizada, entretanto, apresenta uma alta capacidade de remodelamento e está presente em todos os tecidos (Bonnans *et al.*, 2014). De forma geral, a ECM é formada principalmente por colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas, ligantes a fatores de crescimento, receptores, enzimas proteolíticas, entre outras (Hynes e Naba, 2012).

Além do papel clássico de dar suporte mecânico as células do tecido, a ECM desenvolve papéis importantes na sinalização celular (Frangogiannis, 2019). A integridade e a função do músculo cardíaco, por exemplo, dependem das interações entre as fibras musculares com a ECM (Ryckebusch *et al.*, 2016). Por isso, uma perturbação na expressão de proteínas da ECM pode levar a má formação cardíaca (Lockhart *et al.*, 2011).

### 1.4 A Cardiomiopatia Dilatada

Cardiomiopatias são um grupo heterogêneo de doenças do músculo cardíaco associadas com o tamanho e a espessura anormal das câmaras e paredes cardíacas e/ou a disfunção mecânica ou elétrica que levam a uma hipertrofia concêntrica, com redução das câmaras cardíacas ou hipertrofia excêntrica, caracterizada por uma dilatação ventricular inapropriada com conseqüente redução da força contrátil do coração (Jefferies e Towbin, 2010; Weintraub *et al.*, 2017). As cardiomiopatias podem ser classificadas como primárias ou secundárias (Mahmaljy *et al.*, 2021). De acordo com a *American Heart*

*Association*, as cardiomiopatias primárias são desordens que acontecem somente no músculo cardíaco e as secundárias são causadas pelas más condições sistêmicas ou doenças em vários órgãos concomitantemente (Maron, 2008).

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença do músculo cardíaco caracterizada pelo alargamento e dilatação do(s) ventrículo(s) e pela disfunção contrátil na ausência de doenças coronarianas (Jefferies e Towbin, 2010; Weintraub *et al.*, 2017; Mahmaljy *et al.*, 2021). Além disso, mudanças patofisiológicas, como a diminuição do volume de sangue ejetado a cada contração (sístole), da quantidade de sangue ejetado por minuto (débito cardíaco), do volume de sangue dentro do ventrículo durante a diástole (volume diastólico final), da força de contração do ventrículo e mudanças na estrutura dos sarcômeros ocorrem na CMD (Jefferies e Towbin, 2010; Frazier *et al.*, 2011; Schultheiss *et al.*, 2019).

#### 1.4.1 Epidemiologia da Cardiomiopatia Dilatada

A CMD é um dos fatores mais comuns que levam ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e é a causa mais comum para o transplante de coração no mundo (Weintraub *et al.*, 2017; Caviedes Bottner *et al.*, 2018). Estudos epidemiológicos baseados em exames ecocardiográficos, angiográficos ou autópsia mostraram uma prevalência estimada de 40 casos por 100.000 indivíduos. A prevalência da CMD varia de acordo com as diferenças étnicas e geográficas. Entretanto, essa razão parece ser subestimada (Mcnally e Mestroni, 2017; Weintraub *et al.*, 2017) e os índices de mortalidade dessa doença também não são muito conhecidos (Dziewiecka *et al.*, 2020). Entre 2010-2017, a estimativa de mortalidade associada às cardiomiopatias era de 5,9 por 100.000 pessoas na população global (Schultheiss *et al.*, 2019). O diagnóstico padrão ouro para a CMD é a ecocardiografia e os critérios para diagnóstico são: (i) fração de ejeção menor do que 45% e (ii) dimensão diastólica final da(s) câmara(s) cardíaca(s) maior(es) do que 177% dos valores normais para área de superfície corporal (Dadson *et al.*, 2017). Entretanto, a ressonância nuclear magnética cardíaca e a biópsia endomiocárdica também são usados para o seu diagnóstico (Mcnally e Mestroni, 2017).

#### 1.4.2 Causas Genéticas da Cardiomiopatia Dilatada

A CMD pode ser desenvolvida por fatores genéticos e adquiridos (não genéticos) (Weintraub *et al.*, 2017). Os principais fatores não genéticos desencadeadores da CMD são a hipertensão arterial, doença das válvulas, infarto do miocárdio, infecções virais, distúrbios hormonais e doenças inflamatórias causadas por drogas ou toxinas (Mcnally e Mestroni, 2017; Weintraub *et al.*, 2017). As causas genéticas da CMD são diversas, e de forma geral envolvem genes que expressam proteínas do sarcômero, citoesqueleto, envelope nuclear, vias transcricionais e mitocondriais (Weintraub *et al.*, 2017). Vale ressaltar que mesmo as formas não genéticas de CMD podem ser influenciadas pelo perfil genético de cada indivíduo e causas mistas podem estar presentes nessa doença (Dadson *et al.*, 2017; McNally e Mestroni, 2017). Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento genético vem se tornando cada vez mais eficiente e com menor custo (Ashley, 2016), facilitando a identificação de vários genes associados ao desenvolvimento da CMD (Schultheiss *et al.*, 2019). Nos dias de hoje, mais de 100 genes são verificados em testes comerciais para a identificação de CMD (Mcnally e Mestroni, 2017). A maior parte deles são genes codificadores de proteínas do sarcômero, citoesqueleto e canais iônicos (Dadson *et al.*, 2017). A literatura sobre os genes relacionados à CMD é vasta. A Tabela 1 sumariza os estudos sobre os genes mais estudados publicados recentemente.

Tabela 1 – Genes mais prevalentes envolvidos na cardiomiopatia dilatada.

GENE	PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>TTN</i>	Titina	Sarcômero	(Herman <i>et al.</i> , 2012; Franaszczyk <i>et al.</i> , 2017; Akinrinade <i>et al.</i> , 2019; Roggenbuck <i>et al.</i> , 2019; Brown <i>et al.</i> , 2020; Fang e Liu, 2020; Vikhorev <i>et al.</i> , 2020)
<i>LMNA</i>	Prelamina A/C	Envelope Nuclear	(Vaikhanskaya <i>et al.</i> , 2014; Kawakami <i>et al.</i> , 2018; Zahr e Jaalouk, 2018; Cheedipudi <i>et al.</i> , 2019; Lee <i>et al.</i> , 2019)
<i>MYH7</i>	Myosina 7 (MHC)	Sarcômero	(Hershberger <i>et al.</i> , 2008; Tanjore <i>et al.</i> , 2010; Zheng <i>et al.</i> , 2010; Homayoun <i>et al.</i> , 2011; Petropoulou <i>et al.</i> , 2017; Abdallah <i>et al.</i> , 2019)
<i>BAG3</i>	Regulador molecular 3 da chaperona da família BAG	Disco Z	(Arimura <i>et al.</i> , 2011; Fang <i>et al.</i> , 2017; Dominguez <i>et al.</i> , 2018; McDermott-Roe <i>et al.</i> , 2019)
<i>TNNT2</i>	Troponina T do músculo cardíaco	Sarcômero	(Jachymova <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2014; Li <i>et al.</i> , 2015; Fernlund <i>et al.</i> , 2017; Petropoulou <i>et al.</i> , 2017; Pettinato <i>et al.</i> , 2020)
<i>FLNC</i>	Filamina C	Citoesqueleto	(Begay <i>et al.</i> , 2016; Gomez <i>et al.</i> , 2017; Sveinbjornsson <i>et al.</i> , 2018; Ader <i>et al.</i> , 2019; Liebman <i>et al.</i> , 2021)
<i>RBM20</i>	Proteína 20 de ligação a RNA	Núcleo	(Li, D. <i>et al.</i> , 2010; Guo <i>et al.</i> , 2012; Fernandez-Ruiz, 2020; Robyns <i>et al.</i> , 2020)
<i>SCN5A</i>	Proteína tipo 5 subunidade alfa do canal de sódio	Membrana plasmática	(McNair <i>et al.</i> , 2004; Hesse <i>et al.</i> , 2007; McNair <i>et al.</i> , 2011; Mazzaccara <i>et al.</i> , 2018)

<i>PLN</i>	Fosfolambano cardíaca	Retículo endoplasmático	(Medin <i>et al.</i> , 2007; Truszkowska <i>et al.</i> , 2015; Young <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2019; Eijgenraam <i>et al.</i> , 2020; Feyen <i>et al.</i> , 2021)
<i>TNNC1</i>	Troponina C	Sarcômero	(Pinto <i>et al.</i> , 2011; Landim-Vieira <i>et al.</i> , 2019)
<i>TNNI3</i>	Troponina I do músculo cardíaco	Sarcômero	(Murphy <i>et al.</i> , 2004; Fan <i>et al.</i> , 2018; Streff <i>et al.</i> , 2019)
<i>TPM1</i>	Cadeia alfa 1 da tropomiosina	Sarcômero	(Colpan <i>et al.</i> , 2017; Kopylova <i>et al.</i> , 2019; Rajan <i>et al.</i> , 2019; Yao <i>et al.</i> , 2019; Mazzarotto <i>et al.</i> , 2020)
<i>MYBPC3</i>	Proteína C de ligação a miosina	Sarcômero	(Lynch <i>et al.</i> , 2015; Lynch <i>et al.</i> , 2017; Mahdieh <i>et al.</i> , 2018; Blagova <i>et al.</i> , 2020; Mastroianno <i>et al.</i> , 2020; Nakashima <i>et al.</i> , 2020)

### 1.5 Cardiomiopatia Dilatada Induzida pela Deleção Gênica do MrgD

Recentemente, um novo gene foi associado ao desenvolvimento de CMD em modelo murinho (Oliveira *et al.*, 2019). Neste estudo, foi demonstrado que a deleção do gene MrgD em camundongos levou a um acentuado remodelamento cardíaco e a alterações em vários parâmetros morfológicos e fisiológicos nesses animais.

Os exames ecocardiográficos mostraram um aumento considerável no volume e no diâmetro diastólico e sistólico finais e uma diminuição no débito cardíaco em comparação ao controle, levando a uma redução acentuada da fração de ejeção e da fração de encurtamento do coração. Além disso, os animais MrgD<sup>-/-</sup> (mrgd-ko) apresentaram um aumento na câmara do ventrículo esquerdo e uma diminuição na espessura do septo interventricular e da parede do ventrículo esquerdo. Essas mudanças funcionais vieram acompanhadas de uma assincronia no batimento do ventrículo esquerdo nesses animais (Oliveira *et al.*, 2019). Em experimentos complementares, corações isolados de animais mrgd-ko em sistema de Langendorff mostraram uma diminuição da pressão sistólica e da performance ventricular. De forma similar, os cardiomiócitos isolados dos animais mrgd-ko apresentaram alterações em sua morfologia e uma diminuição da força e do ritmo de contração (Oliveira *et al.*, 2019). Apesar do fenótipo de CMD associada a deleção do gene MrgD estar bem caracterizada em modelo murino, pouco se sabe sobre as bases moleculares que geram esse fenótipo deletério.

### 1.6 Proteômica

Em 1994, Marc Wilkins criou o termo proteoma (Wilkins, 2009), que é definido como todas as proteínas expressas e sintetizadas por um determinado genoma, presente em uma célula ou tecido em um determinado momento (Wilkins, Pasquali, *et al.*, 1996; Wilkins, Sanchez, *et al.*, 1996), sendo a proteômica a área de conhecimento que estuda os proteomas. Dentro dessa caracterização, pode-se incluir a identificação e quantificação de proteínas e/ou peptídeos, a elucidação estrutural de proteínas, a caracterização da função e a interação entre essas proteínas (Aslam *et al.*, 2017). Os avanços nas técnicas proteômicas, como nas etapas de preparação de amostras, análises espectrométricas, busca em bancos de dados e análises de bioinformática transformaram a maneira como as proteínas e modificações pós traducionais são identificadas e quantificadas (Lindsey *et al.*, 2015). Atualmente, é possível detectar e quantificar milhares de proteínas em amostras biológicas através da proteômica. Sendo assim, essa metodologia pode fornecer informações preciosas para o entendimento de fenótipos, processos celulares e vias de sinalização em condições de homeostasia ou patológicas (Mokou *et al.*, 2017).

#### 1.6.1 Fosfoproteoma

A fosforilação é provavelmente a modificação pós traducional (PTM, sigla em inglês) mais estudada na transdução de sinais em sistemas biológicos (Mayya e Han, 2009). Essa PTM apresenta um papel essencial na regulação de enzimas, receptores, fatores de transcrição, proteínas estruturais, dentre outras (Humphrey *et al.*, 2015). Por ser um mecanismo reversível, a fosforilação está envolvida em praticamente todos os processos celulares (Lork *et al.*, 2019).

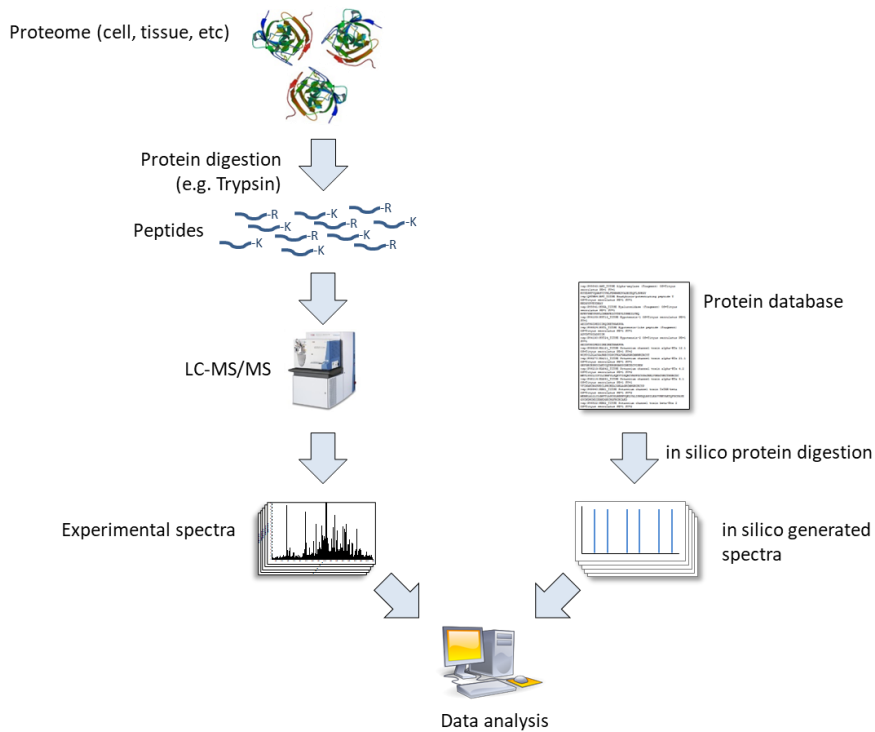
De forma geral, a fosforilação acontece através de proteínas quinases, que realizam a adição de um grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ao grupo R polar de resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) em células eucarióticas (Ardito *et al.*, 2017). O processo inverso é regulado pelas fosfatases (Singh *et al.*, 2017). A fosforilação ou defosforilação é capaz de induzir uma modificação conformacional na proteína alvo, devido a adição/remoção de carga negativa proveniente do grupo fosfato, que pode influenciar diretamente na atividade da proteína fosforilada ou defosforilada, por exemplo, modulando a sua afinidade por um substrato ou até mesmo induzindo a sua degradação (Stultz *et al.*, 2002; Groban *et al.*, 2006). Por isso, estudar o conjunto de fosfoproteínas que é regulado por

um determinado fenótipo pode ser essencial para entender melhor os processos celulares que são alterados nas doenças cardiovasculares.

### 1.6.2 Abordagens Proteômicas: *shotgun/bottom-up*

A abordagem “*shotgun/bottom-up*” é a mais utilizada nas análises proteômicas atualmente. Essa abordagem consiste na hidrólise enzimática de proteínas extraídas de células ou tecidos e na análise por espectrometria de massa da mistura de peptídeos gerados. De forma simplificada (figura 5), a mistura de peptídeos é submetida à análise de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (LC-MS/MS), onde a razão  $m/z$  dos íons precursores (MS1) e dos seus fragmentos (MS2) são analisados (Dupree *et al.*, 2020).

Em abordagens “*bottom-up*” são utilizados dois métodos de aquisição de dados, o método “*data dependent analysis*” (DDA) e a “*data independent analysis*” (DIA). O método DDA consiste na escolha dos íons precursores mais abundantes (top N) para serem fragmentados (Guan *et al.*, 2020). Além disso, os peptídeos são submetidos à lista de exclusão dinâmica, que consiste na exclusão, por um período de tempo previamente determinado, de íons de mesma razão  $m/z$  que já foram fragmentados (MS/MS), evitando a fragmentação repetida dos íons precursores (Bateman *et al.*, 2014). A identificação (sequenciamento) dos peptídeos acontece pela comparação do perfil de fragmentação gerado nos dados experimentais (espectros MS/MS adquiridos) com a fragmentação teórica (*in silico*) dos peptídeos gerados após digestão, também teórica (*in silico*), das proteínas presentes no banco de dados (Dupree *et al.*, 2020). A figura 5 apresenta um fluxograma típico de trabalho da proteômica do tipo “*shotgun/bottom-up*”.



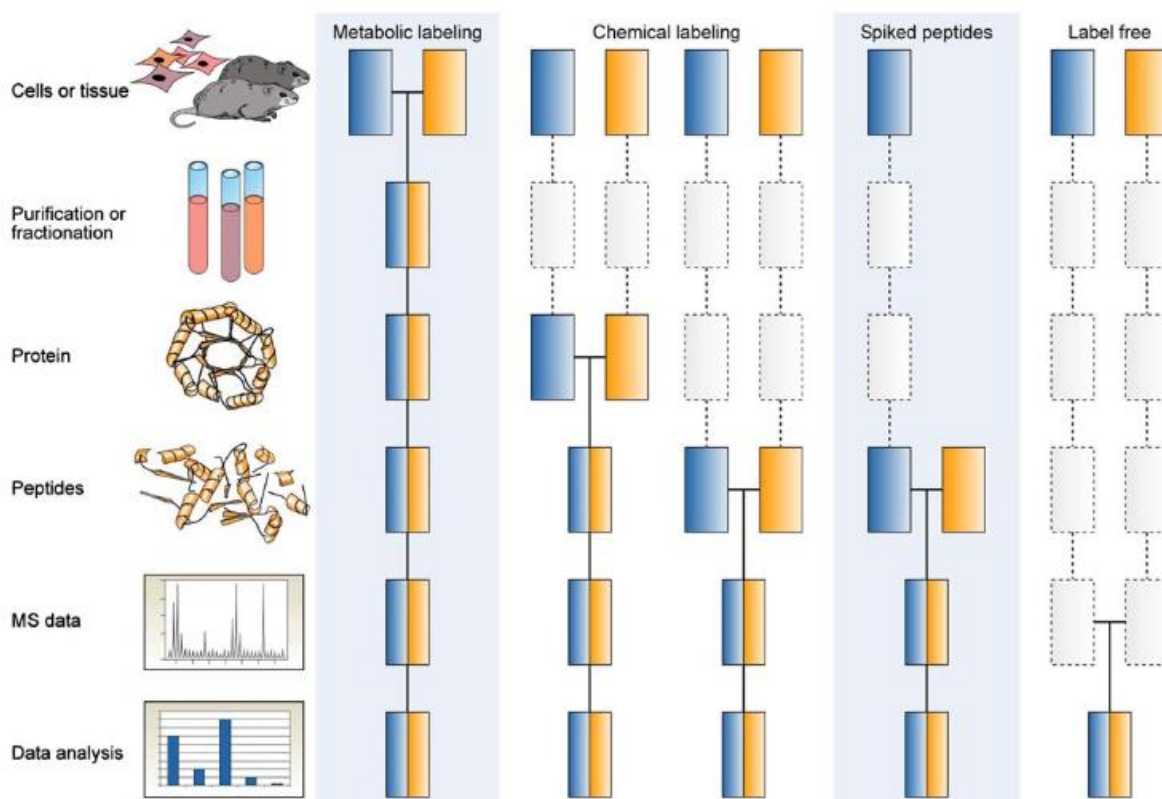
**Figura 5** – Esquema simplificado de uma estratégia shotgun/bottom-up. As proteínas são extraídas de células ou tecidos, reduzidas, alquiladas e digeridas utilizando uma determinada enzima (por exemplo a tripsina). Os peptídeos gerados são posteriormente analisados por cromatografia líquida (LC) acoplada a espectrometria de massa *in tandem* (MS/MS). Os espectros adquiridos (experimentais) são comparados com espectros de MS/MS teóricos (*in silico*) gerados por ferramentas de busca (análise de bioinformática) para identificar as proteínas presentes na amostra biológica. Figura adaptada de Verano-Braga & Roepstorff. Disponível em: [https://aktuelnaturvidenskab.dk/fileadmin/Aktuel\\_Naturvidenskab/nr-2/AN2-2014giftdyr.pdf](https://aktuelnaturvidenskab.dk/fileadmin/Aktuel_Naturvidenskab/nr-2/AN2-2014giftdyr.pdf). Acesso em 08/2021.

### 1.6.3 Proteoma Quantitativo

A quantificação da abundância das proteínas e as suas PTMs nos fenótipos estudados é importante para o estudo de sistemas biológicos (Schubert *et al.*, 2017). A quantificação de proteínas utilizando espectrometria de massa pode ser absoluta, quando é possível determinar a concentração exata da proteína na amostra, ou relativa, quando é mensurado as proporções de determinada proteína em diferentes amostras (Rauniyar e Yates, 2014). A maior parte das estratégias de quantificação de proteínas em MS utilizam o método de diluição isotópica, que se baseia no princípio de que muitos elementos químicos têm pelo menos 2 isótopos e que a proporção entre esses isótopos é constante.

Então, quando uma quantidade definida de um isótopo estável é adicionada na amostra, é possível fazer a quantificação por MS comparando o sinal de suas intensidades (Rodríguez-González e G., 2019). Embora cada peptídeo sofra um aumento de massa, suas propriedades físico químicas permanecem as mesmas. Por isso, os mesmos peptídeos com massas diferentes serão eluídos e analisados ao mesmo tempo por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS, sigla em inglês) (Boersema *et al.*, 2009) (Figura 5).

As marcações isotópicas podem ser introduzidas aos resíduos de aminoácidos (i) metabolicamente, (ii) quimicamente ou (iii) usando um peptídeo sintético como padrão de referência (Bantscheff *et al.*, 2007). Outra opção de quantificação é fazer as análises sem marcação (Zhao *et al.*, 2020) (Figura 6).

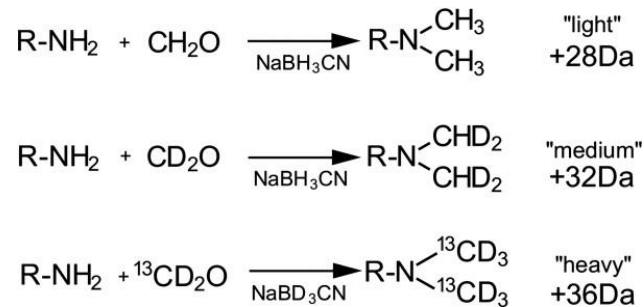


**Figura 6** – Esquema simplificado dos desenhos experimentais usados em espectrometria de massa quantitativa. Os retângulos azuis e amarelos representam duas condições experimentais distintas. As linhas horizontais indicam quando as amostras são combinadas (sempre após a marcação isotópica). As linhas tracejadas indicam pontos de variação metodológica (Bantscheff *et al.*, 2007).

A marcação metabólica se baseia na introdução de aminoácidos enriquecidos com os isótopos estáveis  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  (e.x., Lys) no meio de cultura, para experimentos *in vitro*, ou na alimentação, para modelos *in vivo* (Lau *et al.*, 2014). Depois de algumas semanas, os isótopos estarão incorporados ao proteoma do modelo biológico (Frank *et al.*, 2009). Após o processamento da amostra, os peptídeos marcados metabolicamente podem ser misturados e analisados em uma só corrida (Lau *et al.*, 2014). A limitação desse método de quantificação é que o modelo experimental a ser utilizado precisa apresentar uma alta taxa de duplicação celular, assim como as proteínas apresentarem uma alta taxa de renovação (*turn-over*), além de ser caro, principalmente para modelos murinos (Lau *et al.*, 2014).

Existem dois tipos de marcação química, a marcação isobárica e a isotópica (Rauniyar e Yates, 2014). A marcação isobárica se baseia na marcação das aminas primárias das proteínas e peptídeos dos grupos experimentais com um grupo químico de igual massa total, mas contendo isótopos diferentes distribuídos ao longo desse grupo. Por serem marcações isobáricas, peptídeos iguais, mas oriundo de diferentes grupos experimentais, irão apresentar a mesma massa molecular, sendo selecionados simultaneamente para fragmentação. Quando esse grupo químico é fragmentado no MS2, seus íons repórter, que apresentam massa molecular diferente, serão dissociados, sendo utilizados para a quantificação. (Pappireddi *et al.*, 2019).

A marcação isotópica do tipo “*dimethyl labeling*” se baseia na reação das aminas livres (grupo N-terminal e radicais de resíduos de lisina) das cadeias peptídicas com o éster N-hidroxisuccinimida contendo os seus isótopos naturais ou pesados (Boersema *et al.*, 2009) (Figura 7). A marcação com tais isótopos aumenta a massa molecular de cada peptídeo ou proteína diferencialmente. Então, os peptídeos marcados com os isótopos naturais, intermediários e pesados, terão a sua massa aumentada em 28, 32 e 36 Da, respectivamente, para cada grupo químico introduzido (Cheng *et al.*, 2015). A principal vantagem da marcação isotópica com o dimetil é que até 3 amostras diferentes podem analisadas ao mesmo tempo por LC-MS. Além disso, comparado com os outros reagentes de marcação, o “*dimethyl labeling*” apresenta uma boa relação custo/benefício (Boersema *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2014).



**Figura 7** – Esquema da reação química para a marcação 3-plex (“dimethyl labeling”). R: Aminoácido em questão (lisina ou grupo N-terminal do peptídeo) (Halcsik *et al.*, 2013).

A quantificação usando padrão interno se baseia na adição de uma quantidade conhecida de peptídeos marcados isotopicamente em uma amostra para a comparação do sinal do peptídeo sintético com o peptídeo endógeno. Diferentemente das outras técnicas de marcação isotópica, o foco dessa técnica é realizar a quantificação absoluta de algumas proteínas e/ou peptídeos de interesse (Bantscheff *et al.*, 2007). Por isso, é mais usada em trabalhos de proteômica direcionada (Bantscheff *et al.*, 2007).

A quantificação sem marcação química (*label-free*, termo em inglês) se baseia em analisar separadamente as amostras de interesse por LC-MS/MS (Bantscheff *et al.*, 2007). O método de aquisição de dados mais usados atualmente para as análises sem marcação química é o DDA (Zhao *et al.*, 2020). As estratégias de quantificação dentro da metodologia que usa DDA sem a marcação química se baseiam na contagem de espectros ou na intensidade dos picos no MS1 ou MS2 (Zhao *et al.*, 2020).

#### 1.6.4 Método de Separação de Peptídeos

Atualmente é muito comum utilizar a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). A cromatografia de fase reversa (RPLC, sigla em inglês) é amplamente usada para a separação de peptídeos e é usada para reduzir a complexidade de amostras biológicas. Essa técnica consiste na separação baseada no coeficiente de partição de cada peptídeo entre a fase móvel (polar) e a fase estacionária (apolar). Nesse caso, a ordem de eluição acontece dos peptídeos mais para os menos polares (Manadas *et al.*, 2010). Métodos de pré-fracionamento, ou seja, que antecedem as análises de LC-

MS, são eficazes em reduzir o fenômeno de supressão de sinais, que diminui a taxa de cobertura de proteomas (Widbiller *et al.*, 2019). Neste sentido, o ideal é utilizar técnicas de purificação ortogonais para o pré-fracionamento e LC-MS. Como a RPLC em pH ácido é geralmente utilizada na última etapa (LC-MS), respeitando a lei de ortogonalidade, a RPLC em pH alcalino é um excelente método de pré-fracionamento (Batth *et al.*, 2014).

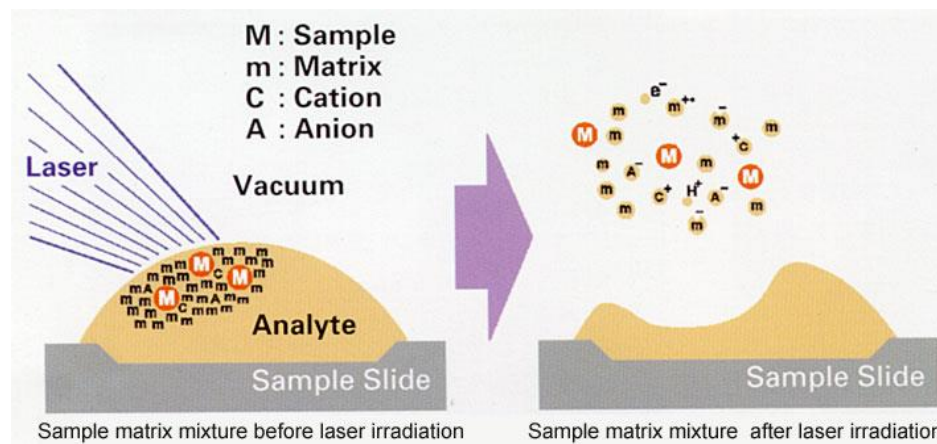
## 1.7 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (MS, sigla em inglês) é uma tecnologia essencial para uma caracterização profunda de proteomas (Trujillo *et al.*, 2019). Os espectrômetros de massa são equipamentos analíticos que realizam as análises baseadas na razão  $m/z$  (massa/carga) de moléculas ionizadas e são constituídos de três partes principais, a fonte de ionização, o analisador de massa e o detector (Haag, 2016). Atualmente, os equipamentos para análises do tipo bottom-up utilizam dois tipos principais de ionização, a Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI, sigla do inglês) e Ionização por Eletrospray (ESI, sigla do inglês) (Nadler *et al.*, 2017), e quatro tipos de analisadores de massa: quadrupolo, tempo de voo (TOF, sigla do inglês) e armadilha de íons (*ion trap* e *orbitrap*) (Michalski *et al.*, 2011). O detector de massa é utilizado para a detecção dos sinais gerados pela pelos íons analisados (Sharad, 2018).

### 1.7.1 Fontes de Ionização

#### 1.7.1.1 Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - MALDI

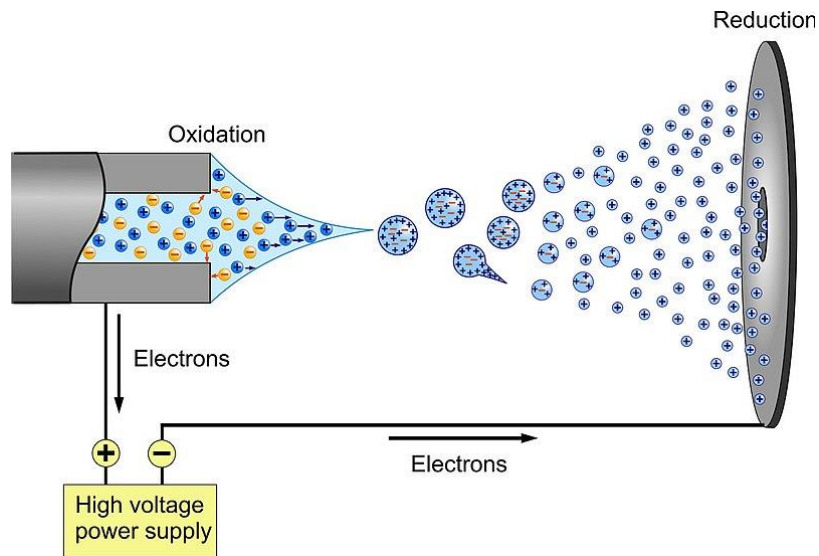
A ionização do tipo MALDI consiste no bombardeamento de um laser UV no analito co-cristalizado com uma matriz orgânica capaz de absorver energia UV. Geralmente são utilizadas matrizes baseadas em ácido alfa-ciano-4-hidroxibenzoico ou ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) para as análises de proteínas e peptídeos. Ao incidir um laser sobre a matriz, ocorre a ionização e dessorção dos analitos (Parker *et al.*, 2010), como mostrado na Figura 8.



**Figura 8** – Esquema de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Esquema ilustrativo da ionização por MALDI. M = amostra, m = matriz, C = cátion e A = ânion. Disponível em: <https://www.shimadzu.eu.com/lifescience/maldi/princpl1>. Acesso em: 08/2021.

#### 1.7.1.2 Ionização *Electrospray* – ESI

O método de ionização do tipo ESI consiste na infusão (em fluxo) de um solvente contendo o analito em uma fonte de ionização através de um capilar de metal. Esse solvente é submetido a um alto potencial elétrico (Konermann *et al.*, 2013), resultando na nebulização da solução (formação de gotículas carregadas). As gotículas são dirigidas eletricamente e vaporizadas com a ajuda de um gás inerte aquecido (e.g., N<sub>2</sub>). Sob essas condições, ocorre a dessolvatação das gotículas, aumentando a densidade iônica dentro delas, até que as forças repulsivas (coulombianas) se tornem tão grandes que ultrapassam a tensão superficial do solvente e os íons sofrem dessorção, entrando na fase gasosa (El-Aneed *et al.*, 2009). Esse processo está ilustrado na Figura 9.

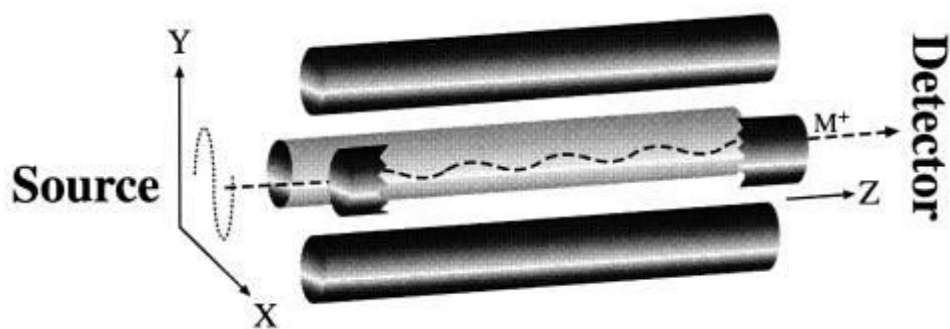


**Figura 9** – Esquema do mecanismo de ionização por electrospray (ESI). Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ESI\\_positive\\_mode\\_\(21589986840\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ESI_positive_mode_(21589986840).jpg). Acesso em 08/2021.

## 1.7.2 Analisadores de Massa

### 1.7.2.1 Quadropolo

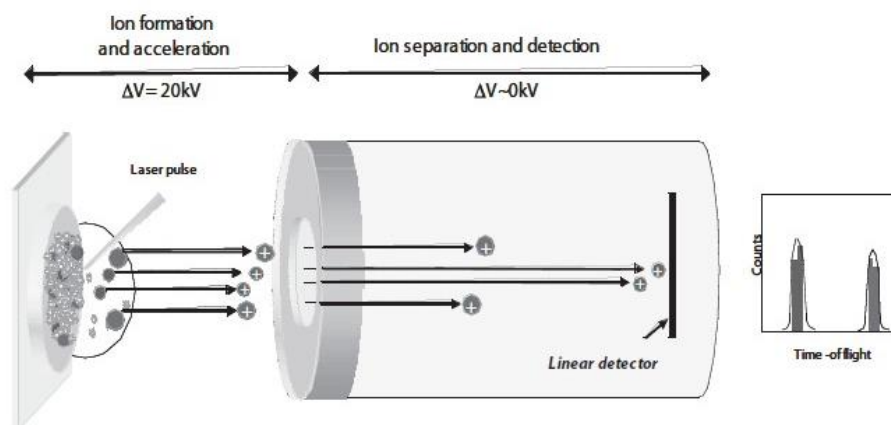
Um analisador de massa do tipo quadropolo consiste em dois pares de barras paralelas colocadas em distâncias iguais e conectadas eletricamente. Sobre cada par de barras é aplicada uma voltagem de mesma intensidade e polaridade oposta. O campo elétrico gerado induz um direcionamento oscilatório dos íons (Ho *et al.*, 2003). Esse tipo de analisador consegue escanear uma faixa  $m/z$  específica, aumentando as voltagens do equipamento para produzir os espectros ou pode ser configurado para permitir a passagem somente dos íons pré-selecionados para fragmentação ou monitoramento (Parker *et al.*, 2010). O esquema de funcionamento do analisador quadropolo está representado na Figura 10.



**Figura 10** – Esquema de um analisador de massa do tipo quadrupolo (Ho *et al.*, 2003)

### 1.7.2.2 Tempo de Voo - TOF

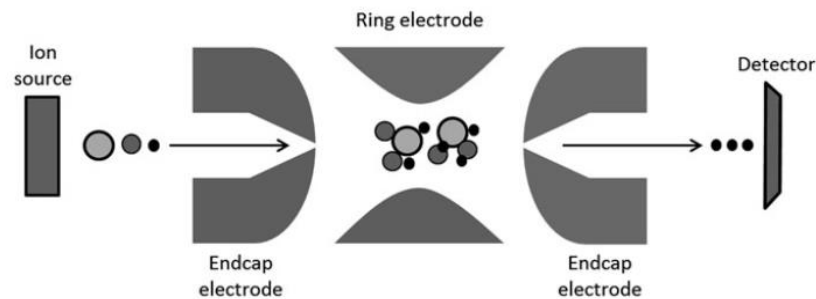
O analisador de massa do tipo tempo de voo ou *time-of-flight* (TOF), do inglês, consiste em um tubo (em vácuo) de comprimento definido onde os íons são acelerados da fonte até ao detector de massa. A razão  $m/z$  dos íons é medida pela diferença entre o tempo de saída da fonte até a chegada no detector (Singhal *et al.*, 2015; Haag, 2016). Os analisadores TOF também apresentam um modo “refletido”, que força os íons, através de lentes refletoras, a percorrerem um caminho maior no tubo de voo. Esse modo permite a correção na variabilidade das energias cinéticas dos íons, resultando em picos melhor resolvidos (Parker *et al.*, 2010). O esquema de funcionamento do TOF está representado na Figura 11.



**Figura 11** – Esquema de um analisador de massa do tipo TOF. Adaptado de (Parker *et al.*, 2010).

### 1.7.2.3 Armadilha Iônica - ION TRAP

O analisador de massa do tipo *ion trap* consiste em três eletrodos hiperbólicos que forma uma cavidade na qual é possível armazenar e analisar os íons. Os eletrodos das extremidades apresentam um orifício na qual os íons podem passar. De forma resumida, um potencial de frequência constante de amplitude variável é aplicado sobre o eletrodo “anel” para produzir um campo potencial quadrupolar tridimensional dentro da cavidade, gerando uma armadilha de íons. Os íons provenientes da fonte de ionização entram na armadilha pelo eletrodo de entrada e são submetidos a variadas tensões para capturar e/ou ejetar íons de uma razão massa/carga específica (Ho *et al.*, 2003). O esquema do funcionamento do analisador *ion trap* está ilustrado na Figura 12.

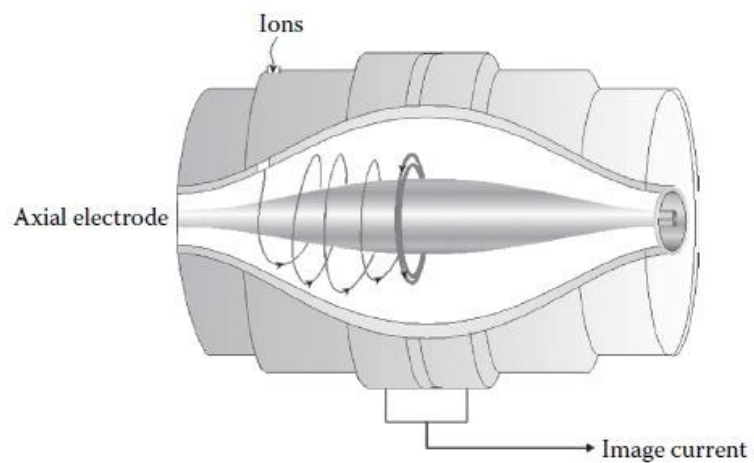


**Figura 12** – Esquema de um analisador de massa do tipo armadilha de íons (Haag, 2016).

### 1.7.2.4 Armadilha Iônica – ORBITRAP

O analisador orbitrap é uma armadilha de íons que consiste em três eletrodos, dois externos, em forma de taças voltadas uma pra outra, formando uma espécie de barril. E um eletrodo interno central semelhante a um fuso que mantém a armadilha unida e alinhada com as extremidades. Quando os íons entram no orbitrap, uma tensão é aplicada entre os eletrodos, formando um campo elétrico linear ao longo do eixo central, com oscilações harmônicas. Ao mesmo tempo o componente radial do campo atrai íons fortemente para o eletrodo central em forma de espiral (Zubarev e Makarov, 2013). Com o aumento da voltagem, a espiral se torna “anéis” de íons. Esses anéis apresentam ciclo em diferentes frequências, então essas frequências são convertidas em razão  $m/z$  pela

“Transformada de Fourier” (Hardman e Makarov, 2003; Hu *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2010).



**Figura 13** – Esquema de um alisador de massa do tipo “orbitrap” (Parker *et al.*, 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é o maior fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca no mundo, levando, muitas vezes, a necessidade de transplante de coração. A CMD induz um intenso remodelamento cardíaco, resultando na formação de fibrose dilatação do ventrículo esquerdo (Schultheiss *et al.*, 2019). Além das modificações estruturais, a CMD também apresenta alterações em várias vias moleculares (Doshi e Marx, 2009). Recentemente, um estudo demonstrou que a deleção do gene MrgD levou ao desenvolvimento de CMD severa em camundongos (Oliveira *et al.*, 2019). Neste trabalho, vários parâmetros morfofisiológicos estavam alterados nos animais *knockout* para o gene MrgD (*mrgd-ko*).

Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares desencadeados pela deleção gênica do MrgD. Por isso, é importante estudar os processos moleculares que estão alterados nos animais com CMD induzida pela deleção do MrgD para uma melhor compreensão do papel desse receptor no sistema cardiovascular, principalmente na manutenção da homeostasia no tecido cardíaco. Além disso, estudar o proteoma e fosfoproteoma de diferentes tipos células celulares ou tecidos de um mesmo órgão pode oferecer boas pistas sobre os mecanismos moleculares da doença. Assim, este trabalho buscou realizar a caracterização molecular das vias de sinalização, metabólicas, dentre outras, que são alteradas pela deleção do gene MrgD em tecidos cardíacos de camundongos.

### **3 OBJETIVOS**

Realizar a caracterização proteômica e fosfoproteômica do tecido cardíaco derivado de camundongos controle (wt) e com o gene MrgD deletado (mrgd-ko).

#### **3.1 Objetivos específicos**

- a. Avaliar e comparar os parâmetros morfométricos do coração de animais wt e mrgd-ko.
- b. Avaliar as vias moleculares alteradas no tecido cardíaco, matriz extracelular e cardiomiócitos isolados de corações de animais mrgd-ko usando proteômica e fosfoproteômica.
- c. Realizar análises funcionais das proteínas reguladas nas principais vias de sinalização e processos biológicos alterados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo de número 5/2018.

### 4.2 Materiais

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrich. Exceto o inibidor de fosfatase (PhosSTOP™, Roche), Colagenase type II (Worthington, USA) e a tripsina (Promega, USA). Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água purificada no sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA). Nas análises proteômicas foram utilizados microtubos do tipo “*low-binding*” (Eppendorff) para o processamento das amostras.

### 4.3 Animais

Camundongos machos das linhagens C57Bl/6 (wt) e MrgD-knockout (mrgd-ko) foram fornecidos pelo biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG. Para a realização dos experimentos, foram utilizados animais machos e adultos com idade entre 8-12 semanas. Os animais tinham acesso livre à água e à ração. O biotério possui temperatura controlada de 23°C e ciclo de 12-12h claro-escuro. Todos os camundongos foram eutanasiados de acordo com os protocolos de ética da CEUA.

### 4.4 Medição da Massa Corporal e Cardíaca

Os camundongos (wt e mrgd-ko) foram pesados em uma balança de precisão e, em seguida, eutanasiados. Após a dissecação, os corações foram lavados com uma solução de tampão fosfato (PBS) contendo cloreto de sódio (NaCl) 137 mM, cloreto de potássio (KCl) 2.7 mM, fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 8 mM e fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 2 mM e pesados na balança. Por fim, a tíbia foi retirada e medida com um paquímetro analógico. Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental para as medições (n=5). A massa corporal e cardíaca, assim como as razões entre a massa cardíaca e a massa corporal, a massa cardíaca e o comprimento da tíbia, a massa corporal e o

comprimento da tíbia foram calculadas e submetidos a análise estatística teste t não pareado de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.5 Análises Histológicas (HE)**

Os corações de camundongos dos grupos wt e mrgd-ko, após dissecados, foram inseridos em uma solução de KCl 3 M, lavados em solução de PBS contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM e fixados com formaldeído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) 4% (v/v) por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram parafinizadas e em seguida processadas com álcool/xilol e cortadas em lâminas com a espessura de 4  $\mu\text{m}$ . As lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina (HE) e montadas com lamínula.

#### **4.6 Obtenção de Tecidos e Células**

##### **4.6.1 Ventrículo Esquerdo (LVT)**

O tecido cardíaco proveniente do ventrículo esquerdo (LVT) foi obtido de corações de camundongos dos grupos wt e mrgd-ko de acordo com a metodologia publicada pelo nosso grupo de pesquisa (Rodrigues-Ribeiro *et al.*, 2019). Resumidamente, os corações foram dissecados e imediatamente inserido em uma solução tampão PBS gelada contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, inibidores de protease e fosfatase. O ventrículo esquerdo foi rapidamente removido e congelado em  $\text{N}_2$  líquido. As amostras foram maceradas com gral e pistilo utilizando  $\text{N}_2$  líquido e armazenadas em ultrafreezer  $-80^\circ\text{C}$ . O procedimento foi realizado em 5 animais para cada grupo experimental (n=5).

##### **4.6.2 Cardiomiócitos Ventriculares (CMV)**

Os cardiomiócitos de camundongos dos grupos wt e mrgd-ko foram isolados de acordo com a metodologia previamente descrita (Guatimosim *et al.*, 2001). Resumidamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , contendo NaCl 140 mM, KCl 5mM, ácido hidroxi-etil-piperazina-etanosulfônico (HEPES) 5mM, cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) 1 mM, Fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,33 mM, glicose 10 mM e insulina  $100 \text{ U.mL}^{-1}$ , pH 7,40.

Posteriormente, o coração foi perfundido com solução de Tyrode contendo cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 50  $\mu\text{M}$  e colagenase II 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após a etapa de digestão enzimática, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de íons  $\text{Ca}^{2+}$  foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500  $\mu\text{M}$  ao final do processo. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em solução de Tyrode. Os cardiomiócitos utilizados para as análises proteômicas foram congelados em  $\text{N}_2$  líquido e armazenados em ultrafreezer  $-80^\circ\text{C}$  imediatamente após a última etapa de centrifugação. O procedimento foi realizado em 5 animais para cada grupo experimental ( $n=5$ ).

#### 4.6.3 Matriz Extracelular Cardíaca (ECM)

A matriz extracelular foi obtida de corações de camundongos dos grupos wt e mrgd-ko dissecados e imediatamente lavados com uma solução tampão gelada contendo PBS contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, e inibidores de protease e fosfatase para a remoção de sangue no interior das cavidades cardíacas. Após a lavagem, os corações foram incubados no ThermoMixer (Eppendorf) com uma solução contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,05% (m/v) e inibidores de protease e fosfatase em temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , sob agitação (950 rpm) por 10 minutos. Em seguida, a solução foi removida e outra solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (m/v) e inibidores de protease e fosfatase foi adicionada, e a amostra submetida a agitação de 950 rpm à  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas. Nessa etapa, a solução foi renovada a cada 12 horas. Após a descélularização dos tecidos, o tampão foi removido e as amostras foram incubadas em água ultrapura por 30 minutos para a remoção do surfactante. Essa etapa foi repetida 3 vezes. Por fim, as amostras foram lavadas com uma solução tampão de PBS NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM e inibidores de protease e fosfatase. As amostras foram congeladas em  $\text{N}_2$  líquido e maceradas utilizando gral e pistilo, e armazenadas em ultrafreezer  $-80^\circ\text{C}$ . O procedimento foi realizado em 5 animais para cada grupo experimental ( $n=5$ ).

### 4.7 Análises Proteômicas

#### 4.7.1 Preparação de Amostras

A preparação de amostra foi realizada como reportado anteriormente (Rodrigues-Ribeiro *et al.*, 2019). Cerca de 10 mg de amostra foi ressuspendida em 100  $\mu$ L do tampão de lise contendo uréia 6 M, tiouréia 2 M, tris(2-carboxietil) fosfina hidrocloreto (TCEP) 10 mM, cloroacetamida 40 mM, brometo de trietil-amônio (TEAB) 50 mM, inibidores de protease e fosfatase. As amostras foram sonicadas duas vezes durante 15 segundos sob banho de gelo, com sonicador de ponteira, para fragmentação das fitas de DNA e otimização da lise celular. Em seguida, as amostras foram incubadas a 28°C em um ThermoMixer (Eppendorf) sob agitação de 650 rpm por 2 horas, para a completa redução das ligações dissulfeto e alquilação dos grupos tíóis (-SH) dos resíduos de cisteína. As proteínas foram quantificadas utilizando o método fluorimétrico Qubit (Thermo). Após a quantificação, a solução foi diluída para a concentração final de 0.6 M de uréia e 350  $\mu$ g de proteínas foram digeridas utilizando tripsina na proporção 1:50 (enzima ( $\mu$ g):substrato ( $\mu$ g)) a 28°C por 18h. A reação foi finalizada pela adição de ácido fórmico na concentração final de 5% (v/v). Para avaliar a eficiência da digestão, os peptídeos trípticos foram dessalinizados utilizando uma micropurificação com ziptip (Millipore), usando o protocolo preconizado pelo fabricante, e a amostra foi cristalizada utilizando a proporção 1:1 (matriz alfa-ciano:peptídeo) e analisada no MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker) com uma faixa de m/z de 780-2500 Th.

#### 4.7.2 Marcação Isotópica “*Dimethyl Labeling*”

Os peptídeos foram marcados de acordo com o protocolo de marcação com dimetil “on-column” (Boersema *et al.*, 2009), com pequenas modificações. Resumidamente, os peptídeos foram reconstituídos em 1 mL de ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5% (v/v). As colunas SepPak (Waters) foram: (i) ativadas com 4 mL de acetonitrila (ACN) 100%; (ii) condicionadas com 4 mL da solução A (ácido acético 0,6% (v/v)); (iii) carregadas com as amostras; (iv) lavadas com 4 mL da solução A; (v) marcadas com o respectivo reagente de marcação por 30 minutos. Os grupos wt e mrgd-ko foram marcados com reagentes de marcação distintas (wt = leve e mrgd-ko = intermediária). Os reagentes de marcação isotópica continham 500  $\mu$ L de tampão sódio-fosfato 50 mM (pH 7,5), 250  $\mu$ L de

cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) 0,6 M e 250  $\mu\text{L}$  de uma solução 4% (v/v) contendo o seu respectivo formaldeído:  $\text{CH}_2\text{O}$  (leve) ou  $\text{CD}_2\text{O}$  (médio); (vi) lavadas com 4 mL da solução A; (vii) eluídas com um gradiente de concentração (ACN 20%, 50%, 80% e 100% (v/v) + ácido acético 0,6% (v/v)). As amostras foram evaporadas no speedvac e reconstituídas em TFA 0,1% (v/v). As amostras foram ressuspensas e quantificadas utilizando o Qubit. A eficiência de marcação foi checada utilizando o espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker) com a faixa de m/z de 780-2500 Th. Em seguida, as amostras dos grupos leve e médio foram combinadas em um mesmo tubo, com a mesma proporção de peptídeos marcados 1:1 (wt:mrgd-ko) (também checado por análise no MALDI-TOF). Por fim, as amostras foram evaporadas utilizando um speedvac e armazenadas à  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.7.3 Enriquecimento de Fosfopeptídeos

Os fosfopeptídeos foram enriquecidos utilizando o método  $\text{TiO}_2$ , como reportado anteriormente (Melo-Braga *et al.*, 2015), com pequenas modificações. As amostras foram ressuspensas em uma solução de “loading” contendo ACN 80% (v/v), TFA 5% (v/v) e ácido glicólico 1 M. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos com “beads” de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) na proporção de 6:1 (amostra ( $\mu\text{g}$ ):  $\text{TiO}_2$  ( $\mu\text{g}$ )) sob agitação intensa. Para maximizar a eficiência do “fosfo-enriquecimento”, a solução de “loading” contendo os fosfopeptídeos não ligados à resina na etapa anterior foram transferidos para um segundo tubo e incubado novamente com “beads” de  $\text{TiO}_2$  na proporção de 3:1 (amostra ( $\mu\text{g}$ ):  $\text{TiO}_2$  ( $\mu\text{g}$ )), por 30 minutos. Após a incubação, as “beads” de  $\text{TiO}_2$  foram combinadas e lavados com: (i) 100  $\mu\text{L}$  da solução de “loading”; (ii) 100  $\mu\text{L}$  de ACN 80% (v/v), TFA 2% (v/v), e (iii) ACN 20% (v/v), TFA 0,1% (v/v). Entre cada etapa, os tubos contendo as “beads” de  $\text{TiO}_2$  eram centrifugadas e o sobrenadante removido. Os fosfopeptídeos foram eluídos com 70  $\mu\text{L}$  de amônia ( $\text{NH}_3$ ) 1,5% (v/v) e evaporados em um speedvac.

#### 4.7.4 Pré-Fracionamento de Fase Reversa em pH básico

As amostras contendo o proteoma total foram submetidas a um pré-fracionamento offline de fase reversa em pH alcalino (“high pH”). Colunas SepPak foram ativadas com ACN 100% e equilibradas com formiato de amônio ( $\text{NH}_2\text{HCO}_2$ ) 20 mM (pH 10). As amostras foram reconstituídas em  $\text{NH}_2\text{HCO}_2$  20 mM (o pH da amostra foi corrido para 9,5) e carregadas na coluna SepPak. Na coluna, as amostras foram lavadas com  $\text{NH}_2\text{HCO}_2$  20 mM. As amostras foram eluídas em 18 frações e combinadas, de forma concatenada, em 9 frações finais (F1= 7,5% + 30%; F2= 10% + 32,5%; F3= 12,5% + 35%; F4= 15% + 37,5%; F5= 17,5% + 40%; F6= 20% + 50%; F7= 22,5% + 60%; F8=25% + 70%; F9= 27,5% + 80%) %ACN (v/v). As amostras contendo os peptídeos foram evaporadas usando um speedvac e armazenado à  $-20^\circ\text{C}$ , para uso futuro.

#### 4.7.5 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

As amostras do proteoma e do fosfoproteoma foram ressuspensas em ácido fórmico 0,1% (v/v) (solvente A) e analisadas usando um HPLC com nanofluxo EASY-nLC II (Thermo), configurado com um sistema de duas colunas, acoplado a um espectrômetro de massa Q-exactive Plus (Thermo). A pré-coluna possuía aproximadamente 3 cm de comprimento e um diâmetro interno de 100  $\mu\text{m}$  e foi empacotada com uma resina C18-AQ Reprisil-Pur com o tamanho da partícula de 5  $\mu\text{m}$ . A coluna analítica (20 cm x 75  $\mu\text{m}$ ) foi empacotada com a resina de C-18 com o tamanho da partícula de 3  $\mu\text{m}$ . O gradiente cromatográfico utilizado foi: (i) 5-45% do solvente B (ACN 95% (v/v) e 0,1% (v/v) ácido fórmico) em 32 minutos; (ii) 45-95% solvente B em 8 min, em um fluxo de 300 nL/min. O espectrômetro de massa (Q-exactive Plus) foi operado em polaridade positiva e modo DDA. Os peptídeos eluídos foram analisados no MS1 com a faixa de 350-1800 m/z. Os íons foram acumulados até  $3 \times 10^6$  ou por 100 ms, o que ocorresse primeiro (MS1 “AGC target settings”). Os íons parentais foram resolvidos com uma resolução de 70.000 FWHM (“full width half maximum”). Os 15 íons mais intensos (Top 15) foram selecionados no quadrupolo com uma janela (“isolation window”) de 2 Th para a fragmentação HCD (“higher energy collision dissociation”), com uma energia normalizada de 30%. O tempo de injeção foi de 50 ms ou  $10^6$  íons acumulados, o que ocorresse primeiro (MS2 “AGC target settings”). Os íons fragmentados foram resolvidos com 17.500 FWHM em m/z de

200 e seus íons percussores foram incluídos na lista de exclusão dinâmica por 45 segundos. Os espectros brutos (.raw) foram visualizados com o Xcalibur v3.0 (Thermo).

#### 4.7.6 Análises dos Dados

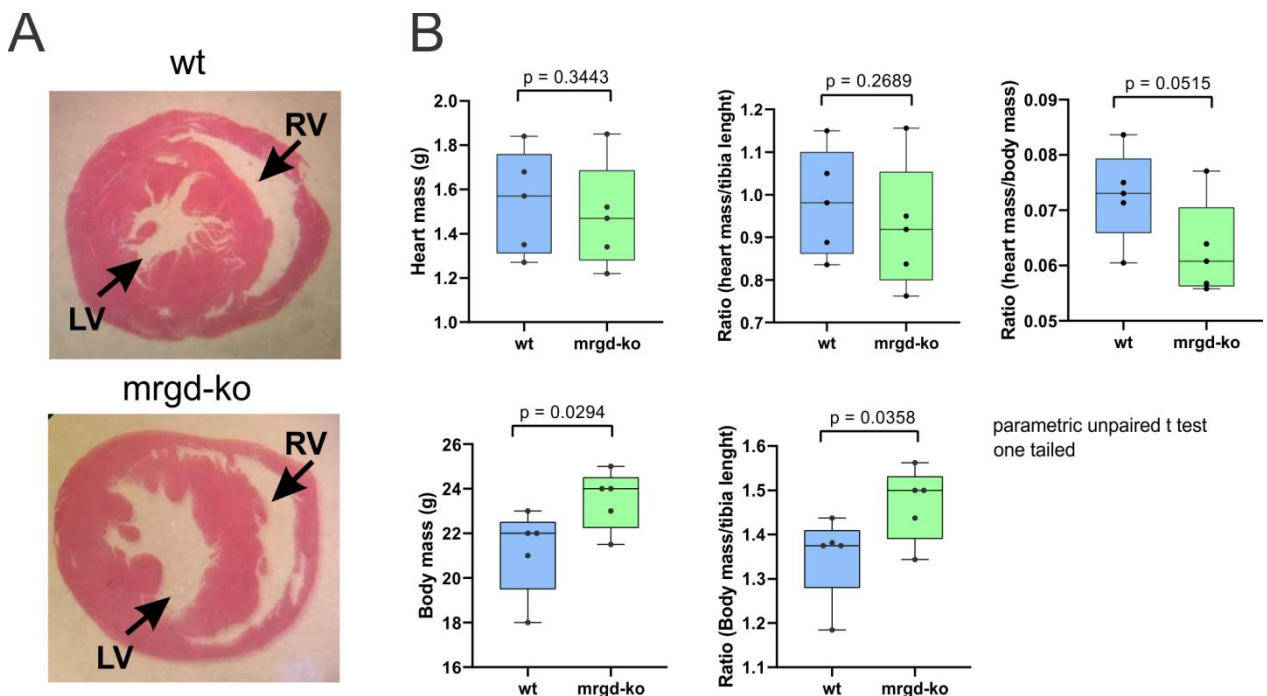
Os espectros brutos (.raw) foram deconvoluídos usando o software MaxQuant (versão 1.6.17.0) e as buscas foram feitas usando o algoritmo de buscas Andromeda (ferramenta implementada no MaxQuant) contra um arquivo FASTA baixado em 12/2020 do UniProtKB *Mus musculus* (17.492 entradas). Foram incluídos nos parâmetros de busca uma lista de “contaminantes comuns”, tolerância de 20 ppm para a primeira busca e a busca principal com uma tolerância de 4,5 ppm. A marcação com dimetil foi configurada ativando as modificações “Dimetil-Lys0” e “Dimetil-Nterm0”, para a marcação leve, e “Dimetil-Lys4” e “Dimetil-Nterm4”, para a marcação intermediária. A tripsina foi escolhida como enzima, permitindo um máximo de dois sítios de clivagem perdidos. A modificação carbamidometil (Cys) foi escolhida como modificação fixa e a oxidação (Met) e acetilação (N-terminal) foram ajustadas como modificações variáveis. Nas amostras de fosfoproteoma, a modificação “phospho(STY)” foi habilitada. A opção “Match between runs” foi ativada com uma faixa de tempo de 0,7 min e alinhamento na faixa de 20 min. Para a identificação dos peptídeos, o mínimo de 1 peptídeo único foi usado. O FDR (“*false discovery rate*”) foi ajustado como <1% e um banco de dados “*decoy*” reverso foi usado para determinar o FDR. O programa Perseus foi usado para fazer a transformação para valores de log<sub>2</sub> as abundâncias das proteínas, calcular o “*imputation*”, para normalizar os valores de log<sub>2</sub> pelo valor da mediana de sua própria coluna, e para normalizar pela média dos valores de quantificação das replicatas que foram analisadas simultaneamente no MS (wt + mrgd-ko + média[wt+mrgd-ko]). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o “one-way ANOVA” ( $p < 0.05$ ) usando o programa “DanteR” (interface gráfica que utiliza o pacote “DanteR” no ambiente R). Os gráficos de histograma foram criados no DanteR. Os gráficos de análise de componente principal (PCA, sigla em inglês), foram criados utilizando os pacotes “tidyverse” e “factoextra” no R. O gráfico de densidade, ontologia gênica e “volcano plot” foram criados utilizando os pacotes “ggplot2” e “ggthemes” também no R. Os gráficos das redes de interação das vias (KEGG e REACTOME) foram criados usando o programa Cytoscape 3.8.2 com o aplicativo

ClueGO 2.5.7. Os gráficos de boxplot foram feitos usando o programa GraphPad Prisma 8.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização Morfológica dos Corações de Animais wt e mrgd-ko

Em concordância com resultados anteriores (Oliveira *et al.*, 2019), os ensaios histológicos mostraram uma dilatação notável do ventrículo esquerdo no grupo mrgd-ko (Figura 14A). A massa dos corações *ex vivo* (Figura 14B), as razões da massa cardíaca pela massa corporal (Figuras 14B) e a relação entre a massa cardíaca pelo comprimento da tíbia (Figura 14B) não apresentaram uma diferença significativa *ex vivo* entre os grupos wt e mrgd-ko. Entretanto, a massa corporal e a relação entre a massa corporal e o comprimento da tíbia foram maiores nos animais mrgd-ko (Figura 14B).



**Figura 14** – Análise dos parâmetros morfométricos do coração. A) Corte transversal do coração. Tecido cardíaco corado com HE mostrando a dilatação do ventrículo esquerdo nos animais mrgd-ko em relação aos wt. HE = corante hematoxilina-eosina. wt = animais controle. mrgd-ko = animais “knockout” para o gene MrgD. LV = câmara do ventrículo esquerdo. RV = câmara do ventrículo direito. B) Comparação da massa cardíaca entre os grupos mrgd-ko e wt. Razão entre a massa do coração e o comprimento da tíbia. Razão entre a massa do coração e a massa corporal. Comparação da massa corporal entre os grupos mrgd-ko e wt. Razão entre a massa corporal e o comprimento da tíbia. Barras na cor azul representam a massa medida nos corações dos animais do grupo wt e em verde os animais mrgd-ko. Cada ponto representa a massa do coração de um camundongo. Foi aplicado o teste t paramétrico não pareado para as análises estatísticas. mrgd-ko = animais “knockout” para o gene MrgD. wt = animais controle “wild type”.

### 5.2 Caracterização Proteômica e Fosfoproteômica

### 5.2.1 Desenho Experimental

Os tecidos cardíacos de camundongos wt e mrgd-ko, ventrículo esquerdo (LVT), matriz extracelular (ECM) e os cardiomiócitos ventriculares isolados (CMV) foram submetidos a análises espectrométricas quantitativas utilizando um sistema LC-MS/MS e marcação com dimetil para a caracterização molecular da cardiomiopatia dilatada induzida pela deleção gênica do receptor MrgD, como mostrado a seguir (Figura 15A). No fosfoproteoma, a replicata de número 4 das amostras CMV-P foi perdida durante as análises, reduzindo o tamanho amostral (n=4).

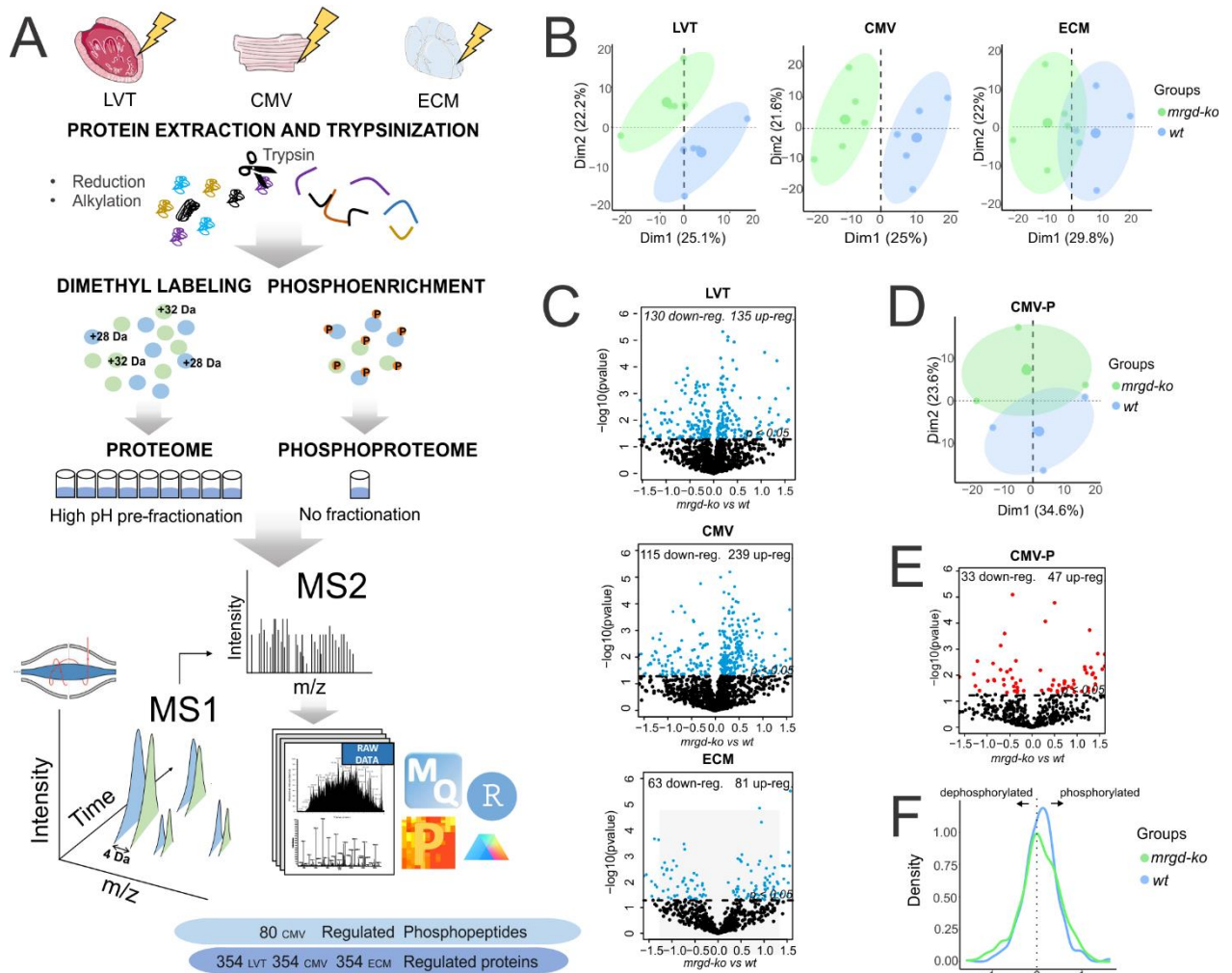
### 5.2.2 Análise dos Dados Proteômicos

Neste estudo foram identificadas um total de 1.919 proteínas únicas somando o número de proteínas encontradas no proteoma dos cardiomiócitos ventriculares isolados (CMV), ventrículo esquerdo (LVT) e matriz extracelular (ECM). Destas, foram quantificadas 1.328, 1.285 e 690 proteínas em CMV, LVT e ECM, respectivamente. No fosfoproteoma dos cardiomiócitos ventriculares (CMV-P), 503 fosfopeptídeos foram quantificados. Devido ao baixo número de fosfopeptídeos quantificados no fosfoproteoma do CMV e ECM, os dados não foram incluídos nesta dissertação. Os valores normalizados de quantificação das proteínas e dos fosfopeptídeos apresentaram uma distribuição normal em todos os datasets (Anexo FA1). Todos os fosfopeptídeos foram utilizados para a normalização, entretanto, somente os fosfopeptídeos contendo um “score” de probabilidade de localização do fosfosítio maior do que 75% (classe I) foram utilizados para as análises funcionais. O valor de quantificação dos fosfopeptídeos foram normalizados pelo valor de quantificação das proteínas correspondentes no proteoma, quando possível, conforme descrito inicialmente pelo grupo de pesquisa do professor Steve Gygi (Wu *et al.*, 2011).

A distribuição dos dados foi visualizada utilizando a análise de componente principal (PCA). As replicatas dos proteomas CMV, LVT e ECM apresentaram um agrupamento de acordo com seus grupos experimentais wt e mrgd-ko (Figura 15B), o que indica uma boa reprodutibilidade entre as replicatas biológicas e uma separação clara entre os

grupos experimentais. As elipses do proteoma ECM apresentaram uma leve sobreposição (Figura 15B), indicando que os valores de quantificação das proteínas neste proteoma apresentaram menor variação entre os grupos experimentais. Além disso, os dados indicam uma diferença clara na abundância das proteínas quantificadas nos proteomas CMV, LVT e ECM nos grupos wt e mrgd-ko (Figura 15B). Os dados do proteoma e fosfoproteoma foram submetidos ao teste de variância One-Way ANOVA, utilizando o grupo wt como referência e o valor de  $p \leq 0,05$  para identificar as proteínas diferencialmente abundantes no grupo mrgd-ko. Após o tratamento estatístico, 354, 265 e 144 proteínas foram encontradas diferencialmente abundantes no proteoma CMV, LVT e ECM, respectivamente (Figura 15C). Nos proteomas CMV, LVT e ECM, 239, 135 e 81 proteínas estavam reguladas positivamente e 115, 130 e 63 proteínas estavam reguladas negativamente, respectivamente (Figura 15C)

A análise de PCA do fosfoproteoma CMV-P também mostrou um agrupamento entre as replicatas do mesmo grupo, uma separação clara entre os grupos experimentais e uma sobreposição entre as elipses, o que indica uma boa reprodutibilidade e uma diferença menor no perfil de fosforilação entre os grupos experimentais (Figura 15D). 80 fosfopeptídeos estavam diferencialmente abundantes, dos quais 47 foram regulados positivamente e 33 negativamente (Figura 15E). Houve também um número menor de fosfopeptídeos sendo fosforilados no grupo mrgd-ko (Figura 15F). Em todas as comparações, um valor positivo representa uma maior abundância de uma determinada proteína ou fosfopeptídeo no grupo mrgd-ko em relação ao wt, e vice-versa. Para as análises seguintes, somente as proteínas e os fosfopeptídeos (classe I) regulados foram considerados. Listas de todas as proteínas e fosfopeptídeos estatisticamente regulados se encontram nos Anexos 1-4 desta dissertação.



**Figura 15** – Análise dos dados proteômicos e fosfoproteômicos. A) Desenho experimental. Proteoma do ventrículo esquerdo (LVT), cardiomiócitos ventriculares (CMV) e matriz extracelular (ECM) e fosfoproteoma dos cardiomiócitos ventriculares isolados (CMV-P). B) Análise de componente principal (PCA) dos proteomas de LVT, CMV e ECM. Cada ponto representa uma replicata biológica, os pontos verdes representam as replicatas do grupo *mrgd-ko* e azul do grupo *wt*. C) Volcano plot. Proteomas LVT, CMV e ECM, os pontos azuis representam as proteínas reguladas (ANOVA,  $p < 0,05$ ). D) PCA do fosfoproteoma CMV-P. Cada ponto representa uma replicata biológica, os pontos verdes representam as replicatas do grupo *mrgd-ko* e azul do grupo *wt*. E) Volcano plot do fosfoproteoma CMV-P. Os pontos vermelhos representam os fosfopeptídeos regulados (ANOVA,  $p < 0,05$ ). F) Gráfico de densidade de fosforilação. A linha verde representa os valores de quantificação dos fosfopeptídeos no grupo *wt* e a linha azul representa os valores do grupo *mrgd-ko*.

### 5.2.3 Vias de Sinalização (KEGG) e Ontologia Gênica (GO) Associadas à Deleção do Receptor MrgD

Para avaliar a função das proteínas diferencialmente reguladas entre os grupos experimentais, todas as proteínas reguladas ( $p < 0.05$ ) foram submetidas às análises de ontologia gênica (GO, sigla em inglês), utilizando a ferramenta de análise funcional DAVID e o enriquecimento das vias (KEGG) utilizando o aplicativo “ClueGO” no programa Cytoscape (Figura 16A-B). As vias de sinalização associadas ao grupo *mrgd-ko*, com maior confiança, foram “doença de Parkinson”, “doença de Huntington”, “oxidação fosforilativa”, “ribossomo”, “ciclo do citrato”, “glicólise/gliconeogênese”, “junção aderente”, “adesão focal”, “contração do músculo cardíaco”, “interação receptor com a matriz extracelular”, “sinalização de cAMP”, “sinalização adrenérgica em cardiomiócitos”, “cardiomiopatia dilatada” (Figura 16A). As principais vias enriquecidas, utilizando somente as proteínas reguladas positivamente, estavam relacionadas a sinalização de glucagon, digestão e absorção de proteínas, absorção de cálcio, sinalização adrenérgica em cardiomiócitos e interação do receptor com a matriz extracelular (Anexos FA2). Em contrapartida, as principais vias enriquecidas, utilizando somente as proteínas reguladas negativamente, estavam relacionadas à metabolismo de galactose, junção aderente e sinalização de HIF-1 (Anexo FA3).

De forma parecida, os processos biológicos (BP) identificados com maior confiança (menor  $p$  valor) estavam relacionados aos processos de “tradução”, “processos de oxidação-redução”, “processos metabólicos”, “contração do músculo cardíaco”, “processos glicolíticos”, “adesão celular”, “organização sarcomérica,” e “processo catabólico de peróxido de hidrogênio” (Figura 16B). Os termos de componente celular (CC) com menor  $p$  valor para o proteoma indicam alteração em proteínas do “exossoma extracelular”, “mitocôndria”, “bainha de mielina”, “ribossomo”, “citoplasma”, “matriz extracelular”, “adesão focal”, “complexo intracelular ribonucleoproteico”, “membrana interna mitocondrial”, “disco Z (Figura 16B). De forma geral, as vias associadas aos termos de BP e CC alterados nos animais *mrgd-ko* foram relacionadas ao metabolismo energético, contração muscular, aderência celular, síntese proteica e homeostase redox (Figura 16A-B).

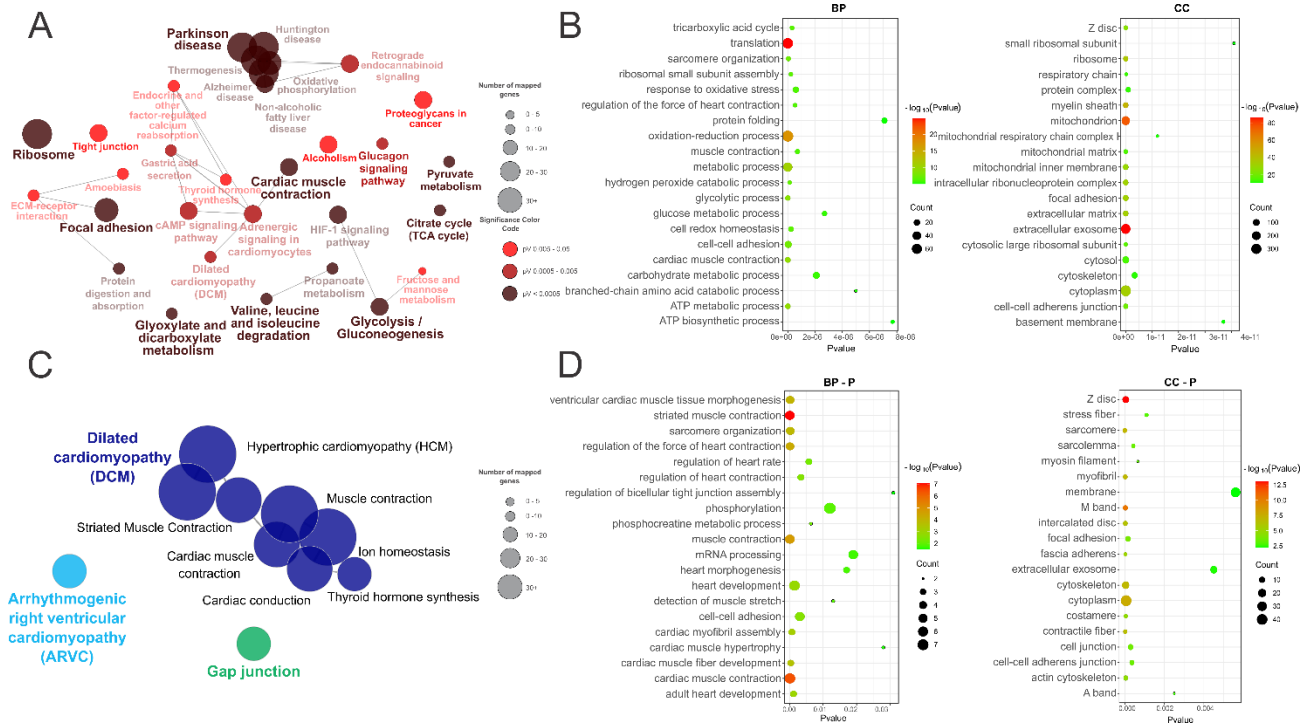
#### 5.2.4 Vias de Sinalização (KEGG e REACTOME) e Ontologia Gênica (GO) do Fosfoproteoma

Para avaliar a função das fosfoproteínas diferencialmente reguladas entre os grupos experimentais, todas as fosfoproteínas reguladas ( $p < 0,05$ ) foram submetidas às análises de ontologia gênica (GO, sigla em inglês) utilizando a ferramenta de análise funcional DAVID e o enriquecimento das vias (KEGG e REACTOME) utilizando o aplicativo “ClueGO” no programa Cytoscape (Figura 16C-D). As vias de sinalização reguladas no grupo *mrgd-ko* foram: “cardiomiopatia dilatada”, “contração de músculo estriado”, “contração do músculo cardíaco”, “condução cardíaca”, “homeostase iônica”, “junções Gap”, “cardiomiopatia ventricular direita arritmogênica” (Figura 16C). As fosfoproteínas enriquecidas no grupo *mrgd-ko* são de vias muito parecidas às vias associadas ao proteoma regulado do grupo *mrgd-ko* (Figura 16). Além disso, a regulação da fosforilação de proteínas responsáveis por realizar o transporte iônico, contração do músculo cardíaco e condução cardíaca indica que as vias de sinalização podem estar com a sua atividade alteradas.

Os BP identificados com maior confiança (menor  $p$  valor) no fosfoproteoma estavam relacionados aos processos de “tradução”, “processos de oxidação-redução”, “processos metabólicos”, “processos metabólicos de ATP”, “contração do músculo cardíaco”, “processos glicolíticos”, “adesão celular”, “organização sarcomérica”, “processo catabólico de peróxido de hidrogênio” e “homeostase celular redox” (Figura 16D). Os termos de componente celular (CC) com menor  $p$  valor para o fosfoproteoma indicam uma alteração na fosforilação nas proteínas do “disco Z”, “banda M”, “citoplasma”, “sarcômero”, “citoesqueleto”, “fibra contrátil”, “discos intercalares”, “miofibrila”, “fáscia aderente”, “costâmero” (Figura 16D).

De forma geral, os dados proteômicos e fosfoproteômicos indicam haver alterações na abundância e atividade de proteínas relacionadas com o metabolismo energético, homeostase redox, transporte iônico, contração cardíaca e condução da força de contração (Figura 16). No estudo da caracterização morfofisiológica da CMD nos animais *mrgd-ko*, os autores reportaram alterações importantes no perfil de contração cardíaca e dos cardiomiócitos. Além disso, o perfil de condução da força cardíaca também estava

alterado (Oliveira *et al.*, 2019). Por isso, as vias estudadas com mais detalhes no presente estudo foram às relacionadas com a homeostase iônica, sinalização adrenérgica em cardiomiócitos, contração do músculo cardíaco e adesão focal.



**Figura 16** – Vias de sinalização e ontologia gênica enriquecidas nos tecidos cardíacos induzidas pela deleção do gene *MrgD*. A) Rede de interação das vias do banco de dados KEGG utilizando as proteínas reguladas do proteoma do CMV, LVT e ECM. Os nodos representam as vias de sinalização e as arestas mostram a relação entre essas vias. Quanto maior o tamanho do nodo, maior o número de genes encontrados nos datasets. Os nodos em vermelho apresentaram p valor < 0,05, os nodos marrons apresentaram um p valor < 0,001. B) Processos biológicos (BP) e componentes celular (CC) alterados do proteoma CMV, LVT e ECM. Quanto maior o tamanho do nodo maior o número de genes regulados em cada termo. Quanto mais próximo do vermelho o nodo estiver, menor o valor de p. C) Rede de interação das vias do banco de dados KEGG e REACTOME utilizando os fosfopeptídeos reguladas no fosfoproteoma CMV. Os nodos representam as vias de sinalização e as arestas mostram a relação entre essas vias. Quanto maior o tamanho do nodo, maior o número de genes encontrados nos datasets e menor o número de p valor. Só estão sendo mostradas vias com p valor < 0,05. D) Processos biológicos (BP) e componentes celular (CC) alterados nos fosfoproteoma CMV. Quanto maior o tamanho do nodo maior o número de genes regulados em cada termo. Quanto mais próximo do vermelho o nodo estiver, menor o valor de p.

### 5.3 Análises Funcionais dos Dados Proteômicos

### 5.3.1 A deleção do gene MRGD Induziu Alterações na Fosforilação de Proteínas Quinases Importantes no Contexto Cardíaco

A proteína quinase A (PKA) é uma quinase envolvida em muitas vias de sinalização (Aumo *et al.*, 2010). No coração, a PKA também apresenta um papel importante na via de sinalização do estímulo  $\beta$ -adrenérgico, realizando a fosforilação de vários substratos como, por exemplo, a SERCA2, PLN, troponina, MYBPC3 e a TTN (Kruger e Linke, 2006; Hanft e Mcdonald, 2009). A ativação dessa proteína quinase está relacionada a concentração de cAMP no meio intracelular (Koschinski e Zaccolo, 2017). A PKA foi encontrada com maior abundância e mais fosforilada nos animais mrgd-ko no proteoma CMV e fosfoproteoma CMV-P (Anexos 2 e 4). A Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase-1-gama (PIP5K1C) é uma quinase responsável pela fosforilação de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) para formar fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), um segundo mensageiro lipídico que regula vários processos celulares, como transdução de sinal, dinâmica do citoesqueleto de actina, adesão celular e motilidade celular (Di Paolo *et al.*, 2002; Shulga *et al.*, 2012). A PIP5K1C estava mais fosforilada na Ser-555 nos animais mrgd-ko (fosfoproteoma CMV-P) (Anexo 4).

### 5.3.2 A Deleção Gênica do MRGD Induziu Alterações em Transportadores Iônicos

A bomba de Sódio/Potássio ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase/ATP1A1/NKA) é uma enzima que cumpre um papel importante na manutenção do gradiente celular dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em cardiomiócitos. Essa manutenção tem um papel crítico na homeostase iônica e na repolarização das células excitáveis (Feraille *et al.*, 2000). O funcionamento dessa enzima é regulado principalmente por sua fosforilação (Fisone *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1997; Feraille *et al.*, 1999). Além disso, a fosforilação da NKA na Ser-16 estimula o aumento da afinidade dessa enzima pelos íons  $\text{Na}^+$  intracelulares para sua extrusão do citoplasma (Feraille *et al.*, 2000). A abundância da NKA estava maior no grupo mrgd-ko no proteoma LVT (Figura 17A e Anexo 1). Entretanto, nos proteomas do CMV e ECM não houve diferença estatística entre os grupos wt e mrgd-ko para essa proteína (Anexos 2 e 3). Além disso, a NKA foi encontrada menos fosforilada na Ser-16 no grupo mrgd-ko

(fosfoproteoma CMV-P) (Figura 17A e Anexo 4), indicando uma possível inibição da sua atividade.

O NCX1 é um trocador iônico com a função de realizar a extrusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e regular o ritmo da liberação desses íons no meio intracelular (Herrmann *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2021). Em condições fisiológicas, o potencial eletroquímico gerado pelo gradiente dos íons  $\text{Na}^+$  é uma das forças motrizes da NCX1 para a extrusão dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Correll *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que mesmo uma pequena alteração na concentração de íons  $\text{Na}^+$  intracelular é suficiente para modular a funcionalidade da NCX1 (Correll *et al.*, 2014; Mazeto *et al.*, 2021). Além disso, o acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  citoplasmático ativa o modo reverso da NCX1, levando a um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Koh *et al.*, 2017). A abundância do NCX1 estava menor no grupo mrgd-ko do proteoma CMV (Figura 17A), mas sem diferenças estatísticas nos proteomas LVT e ECM (Anexo 1 e 3). Os dados nos sugerem uma possível inibição da NKA pela desfosforilação na Ser-16, o que poderia aumentar os níveis de  $\text{Na}^+$  e ativar o modo reverso da NCX1.

O receptor de Rianodina (RYR2) apresenta um papel importante no processo de acoplamento excitação-contração nos miócitos cardíacos (Marx *et al.*, 2000; Dobrev e Wehrens, 2014). A regulação da atividade desse canal acontece quando os canais de cálcio do tipo L (CACNA1C/ $\text{Ca}_v$ ) se abrem em resposta à despolarização da célula e aumenta a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  em um espaço entre o túbulo T e a membrana do retículo endoplasmático (Walker *et al.*, 2014). Esse aumento na concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  induz a ativação do RYR2, promovendo a passagem de cálcio do retículo endoplasmático para esse mesmo espaço. Essas duas fontes de fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  geram um transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que desencadeia a contração do músculo cardíaco (Peng *et al.*, 2016). O RYR2 estava mais abundante no grupo mrgd-ko no proteoma LVT (Figura 17A). Entretanto, o RYR2 não foi encontrado diferencialmente regulado no proteoma de CMV e ECM em animais mrgd-ko (Anexo 2 e 3).

De forma parecida, a PLN regula a atividade da cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2) do músculo cardíaco. Essa regulação acontece pela fosforilação da PLN na Ser-16 e Thr-17, que induz um aumento da atividade da SERCA2, resultando no aumento da liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático (Doshi e

Marx, 2009). A PLN estava menos abundante no grupo *mrgd-ko* do proteoma CMV (Figura 17A) e sem diferença estatística entre os grupos *wt* e *mrgd-ko* nos proteomas LVT e ECM (Anexos 1 e 3). Os sítios Ser-16 e Thr-17 da PLN estavam com uma tendência de desfosforilação ( $p > 0,05$ ; não regulado) no grupo *mrgd-ko* de CMV-P (Anexo 4). Os dados proteômicos nos sugeriu uma possível alteração nos níveis de cálcio intracelular nos animais *mrgd-ko*. Ensaio de transiente de cálcio confirmaram um nível significativamente menor de íons  $Ca^{2+}$  intracelular em cardiomiócitos isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17B). Além disso, não se pode excluir um possível aumento na concentração de íons  $Na^+$  nos tecidos cardíacos do grupo *mrgd-ko*, possivelmente via diminuição da densidade do trocador NCX e da atividade da bomba  $Na^+/K^+$  (NKA), via diminuição da sua versão fosforilada (mais ativa). Em conjunto, esse potencial desbalanço iônico no tecido cardíaco de animais *mrgd-ko* poderia explicar, pelo menos em parte, as alterações contráteis observadas anteriormente (Oliveira *et al.*, 2019).

### 5.3.3 A Deleção do Gene MRGD Induziu Alterações em Proteínas dos Sarcômeros

O filamento espesso é composto por fibras de miosina, titina e proteína C de ligação a miosina (Palmer, 2005). A miosina é uma proteína formada por três estruturas: i) cadeia pesada de miosina, ii) cadeia leve de miosina e iii) cadeia regulatória de miosina (Palmer, 2005; England e Loughna, 2013). As cadeias pesadas de miosina (MYH7/MYH7B/MHC) são proteínas constitutivas nos ventrículos em todos os estágios de desenvolvimento (England e Loughna, 2013), e a sua regulação acontece quando a porção mais próxima ao N-terminal realiza a hidrólise do ATP, induzindo uma mudança conformacional que resulta no acoplamento da porção C-terminal aos filamentos do filamento espesso (Palmer, 2005). A abundância da MHC estava menor no proteoma de LVT e CMV isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17A), e sem diferença significativa no proteoma de ECM *mrgd-ko* (Anexo 3). Além disso, a fosforilação da Tyr-1460 na MYH7 foi encontrada mais abundante no CMV-P de animais *mrgd-ko* (Figura 17A). As cadeias regulatórias de miosina (MYL1/MYL2/MLC) estão localizadas na região do pescoço  $\alpha$ -helicoidal da MHC e, orientadas de forma antiparalela, servem como estabilizadoras da MHC (England e Loughna, 2013). A regulação da MLC-2 acontece pela fosforilação da Ser-15 (Scruggs *et al.*, 2010), que induz uma conformação com maior afinidade pelos íons  $Ca^{2+}$ , modulando

a sensibilidade na geração de força e na cinética da formação da ponte cruzada entre os filamentos de actina e miosina (England e Loughna, 2013). A abundância da MYL1 e MYL2 estava menor nos grupos *mrgd-ko* nos proteomas CMV e ECM, respectivamente (Figura 17A), e sem diferença significativa no proteoma LVT (Anexo 1). No entanto, houve uma maior fosforilação na Ser-15 do grupo *mrgd-ko* no fosfoproteoma de CMV-P (Figura 17A). A diminuição da MHC e MLC, bem como a fosforilação da MHC na Tyr-1462, podem indicar uma possível alteração na arquitetura e cinética das fibras de miosina nos animais *mrgd-ko*.

A Titina (TTN) é uma proteína de alta massa molecular e forma um filamento contínuo que se estende da banda Z à banda M dos sarcômeros. Diferentemente da miosina, a TTN é uma proteína elástica e que participa do processo de contração de forma passiva (Tskhovrebova e Trinick, 2010). Além disso, o controle da rigidez passiva dessa proteína é regulada principalmente pela sua oxidação e fosforilação (Linke, 2018). A TTN foi encontrada amplamente desfosforilada no fosfoproteoma de CMV-P isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17A e Anexo 4). Seis sítios da TTN foram encontrados significativamente desfosforilados (Thr-266, Ser-34097, Ser-34099, Ser-34451, Ser-34464, Ser-34476) e apenas um fosforilado (Ser-33875), sugerindo uma mudança na rigidez passiva da TTN em animais *mrgd-ko*.

A proteína C de ligação a miosina cardíaca (MYBPC3/MyBP-C) tem um papel essencial na estabilização da estrutura e função dos sarcômeros (Palmer, 2005). A MyBP-C é um filamento transversal proteico que interage com os filamentos espessos e finos do sarcômero (Lynch *et al.*, 2021). Além disso, a fosforilação dos resíduos Ser-273, Ser-282 e Ser-302 aceleram a cinética de formação da ponte cruzada (Lynch *et al.*, 2021). A abundância da MYBPC3 estava menor no proteoma da ECM isolada de animais *mrgd-ko* (Figura 17A) e sem diferenças significativas nos proteomas LVT e CMV (Anexos 1-2). Os resíduos Thr-272 e Ser-307 da MYBPC3 estavam mais fosforilados no fosfoproteoma de CMV-P isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17A e Anexo 4). A alteração da abundância da MyBP-C e as fosforilações em resíduos tão próximos dos sítios regulatórios (Ser-273, Ser-282 e Ser-302) podem indicar uma possível alteração na estrutura e função dessa proteína nos animais *mrgd-ko*.

O filamento fino é composto principalmente por monômeros de actina, tropomiosina e troponina (Squire, 2019). A actina (ACTA1/2) é uma proteína que participa na formação de várias estruturas e está presente em vários processos biológicos (Bareja *et al.*, 2020). A ACTA1 e a ACTA2 formam longos filamentos helicoidais que se estendem dos disco Z à banda M dos sarcômeros (Henderson *et al.*, 2017; Squire, 2019). A principal função da ACTA no sarcômero é se ligar aos filamentos de miosina e “puxar” os discos Z em direção a banda M (Henderson *et al.*, 2017). ACTA1 e ACTA2 estavam menos abundantes nos proteomas de LVT e ECM isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17A, Anexo 1 e 3) e sem diferença significativa no CMV (Anexo 2). A tropomiosina (TPM1) é uma proteína regulatória que se liga aos filamentos de actina, formando duas cadeias contínuas que envolvem o filamento de actina (Henderson *et al.*, 2017). A TPM1 é responsável por regular e estabilizar os filamentos de actina (Bareja *et al.*, 2020). A abundância da TPM1 estava aumentada nos proteomas de LVT e ECM isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17A, Anexos 1 e 3) e sem diferença significativa no CMV (Anexo 2). A baixa abundância de ACTA1 e ACTA2 indica um possível prejuízo na interação da actina com a miosina dos sarcômeros. Em contrapartida, o aumento da TPM1 pode indicar um mecanismo compensatório e/ou uma alteração estrutural nos filamentos finos. Em conjunto, os dados indicam que a estrutura e/ou função dos sarcômeros cardíacos podem estar alterados nos animais *mrgd-ko*, contribuindo para os parâmetros de contração cardíaca deletérios observados nestes animais (Oliveira *et al.*, 2019).

#### 5.3.4 A Deleção do Gene MRGD Induziu Alterações em Proteínas Relacionadas com a Transmissão da Força Biomecânica no Coração

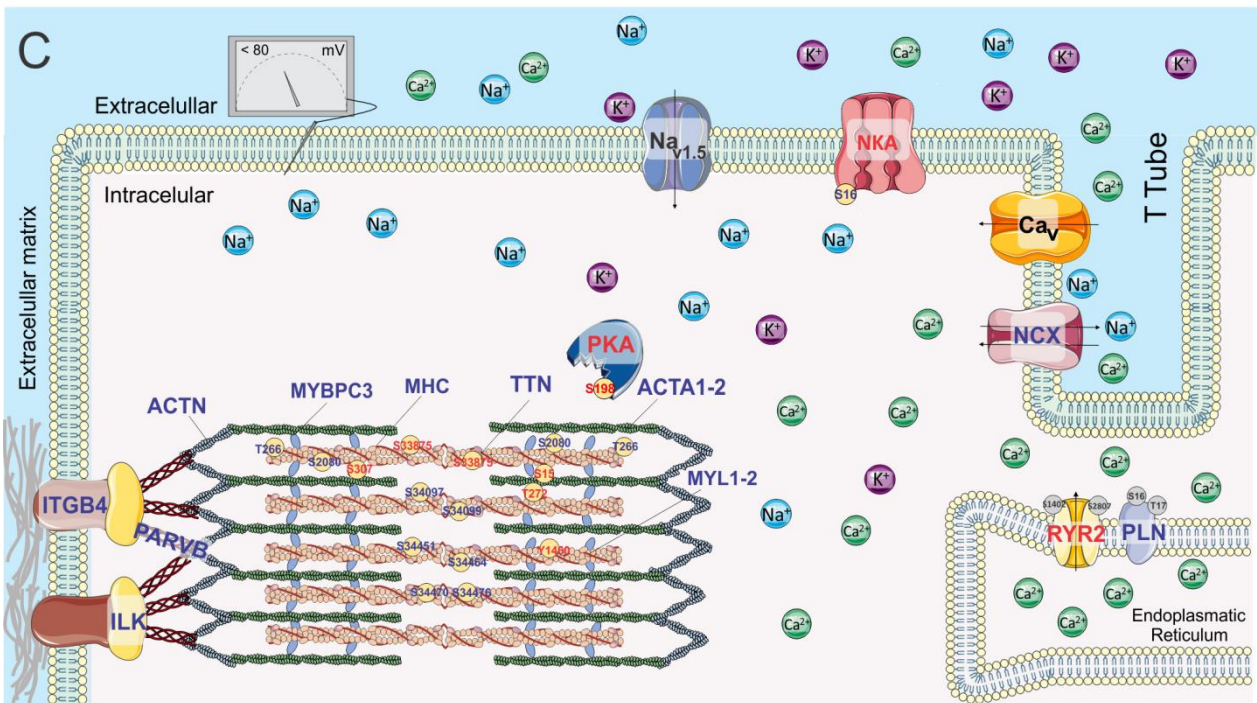
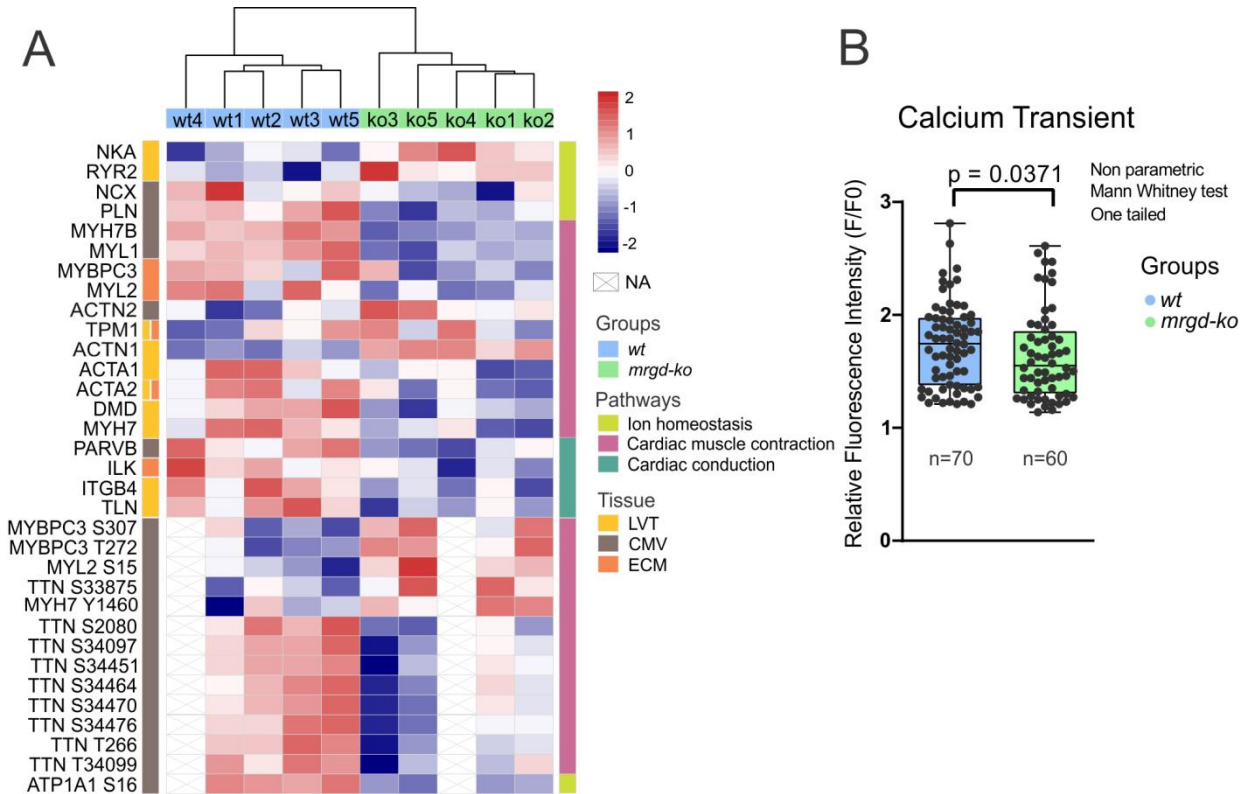
Os ciclos de contração (sístole) e relaxamento (diástole) do coração requerem conexões fortes e estáveis dos cardiomiócitos com a matriz extracelular, para preservar a integridade do sarcolema (membrana plasmática) (Chopra *et al.*, 2018). A quinase ligada a integrina (ILK) é uma proteína serina/treonina quinase responsável pela interação da matriz extracelular com o meio intracelular e com a transmissão de sinais biomecânicos (Zervas *et al.*, 2001; White *et al.*, 2006; Brodehl *et al.*, 2019). A abundância da ILK estava menor no proteoma de ECM isolados de animais *mrgd-ko* do (Figura 17A e Anexo 3), mas essa quinase não foi identificada nos proteomas de LVT e CMV (Anexo 1 e 2). De

forma parecida, a parvina (PARVB) contribui para a interação da matriz com o meio intracelular, por meio de sua ligação com a ILK e com os filamentos de actina dos cardiomiócitos (Vakaloglou e Zervas, 2012). A abundância da PARVB estava menor no proteoma de CMV isolados de animais *mrgd-ko* (Figura 17A e Anexo 2), não sendo identificada nos proteomas de LVT e ECM (Anexos 1 e 3). A diminuição na abundância dessas proteínas (ILK e PARVB) pode indicar uma disfunção na ligação das fibras musculares com a matriz extracelular em animais *mrgd-ko*.

As  $\beta$ -integrinas (ITGB4) são proteínas presentes na membrana que realizam a ligação da matriz extracelular com o citoesqueleto (Campbell e Humphries, 2011). Essa ligação acontece pela formação de complexos localizados ao lado do sarcolema, realizando a adesão entre as células e a matriz extracelular (Wu, Q. *et al.*, 2015). A abundância dessa integrina estava aumentada no proteoma de LVT isolado de animais *mrgd-ko* (Figura 17A e Anexo 1), não sendo identificada nos outros proteomas (CMV e ECM – Anexos 2 e 3). Uma das proteínas desses complexos é a Talina (TLN1), que além de apresentar um papel crítico na estabilização dos discos Z presente nos sarcômeros (Wu, Q. *et al.*, 2015), exerce a função de ligação entre as  $\beta$ -integrinas e o citoesqueleto (Manso *et al.*, 2017). A abundância da TLN1 estava reduzida no proteoma de LVT isolado de animais *mrgd-ko* (Figura 17A e Anexo 1), sem diferença significativa nos proteomas CMV e ECM (Anexos 2 e 3). A regulação dessas proteínas indica uma possível alteração na adesão entre as células cardíacas e a matriz extracelular.

A distrofina (DMD) também exerce um papel essencial na integridade das conexões entre as fibras musculares e a matriz extracelular (Haenggi e Fritschy, 2006). Essa ligação acontece através da formação de um complexo formado pela DMD com proteoglicanos (Gao e McNally, 2015). Além disso, a DMD é importante para a estabilização da membrana durante ciclos de contração (sístole) e na transdução da força (Haenggi e Fritschy, 2006). A abundância da DMD estava menor no proteoma de LVT isolado de animais *mrgd-ko* (Figura 17A e Anexo 1) e sem diferença significativa nos demais proteomas (CMV e ECM – Anexos 2 e 3).

Em conjunto, os dados proteômicos, fosfoproteômicos e de quantificação do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos sugere uma alteração na homeostase iônica assim como na geração e transmissão da força mecânica no coração de animais *mrgd-ko* (Figura 17C).



**Figura 17** – Análise funcional dos dados proteômicos e fosfoproteômicos. A) Heatmap representando a quantificação em valores transformados para  $\log_2$  das proteínas reguladas nos proteomas de LVT, CMV, ECM e no fosfoproteoma CMV-P de animais wt e mrgd-ko. Cada coluna representa uma replicata biológica dos grupos wt e mrgd-ko. A barra de cor ao lado do nome do gene (lado esquerdo) representa o proteoma em que aquela determinada proteína estava regulada. A barra de cor (lado direito) representa a via de sinalização ao qual aquela determinada proteína está associada. B) Quantificação do transiente de cálcio. O gráfico em azul representa o grupo wt (n=70) e o verde o grupo mrgd-ko (n=60). Cada ponto refere-se à medição do nível de cálcio de um cardiomiócito isolado. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste t de student não pareado e não paramétrico. Mrgd-ko = animais knockout para o gene Mrgd. wt = animais wild type. C) Esquema representativo das proteínas das vias alteradas nos animais com o gene MrgD deletado. Houve a regulação de proteínas de transporte iônico, sarcômeros e adesão focal. No esquema, as proteínas (representada pelos genes) ou fosfosítios com os nomes em vermelho, azul ou preto foram encontradas, respectivamente, “mais abundante”, “menos abundante” ou “inalterada estatisticamente” nos tecidos cardíacos de animais mrgd-ko em comparação com os animais wt.

## 6 DISCUSSÃO

Em concordância com o trabalho publicado anteriormente por Oliveira e colaboradores (Oliveira *et al.*, 2019), os corações dos animais *mrgd-ko* apresentaram uma dilatação do ventrículo esquerdo *ex vivo* (Figura 14A), confirmando o fenótipo de CMD. Geralmente, em condições de remodelamento cardíaco em quadros de cardiomiopatias existe a alteração da massa e no tamanho do coração (Göktepe *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2021). Apesar dos corações dos animais *mrgd-ko* serem maiores *in vivo* do que os dos animais *wt* (Oliveira *et al.*, 2019), não observamos diferenças significativas na massa cardíaca *ex vivo* entre os grupos experimentais (Figura 14B). A razão entre a cardíaca e corporal apresentou uma tendência a estar menor nos animais *mrgd-ko* (Figura 14B). Entretanto, a diminuição dessa razão deve estar mais relacionada a maior massa corporal apresentada pelos animais *mrgd-ko* do que pela diminuição da massa cardíaca nesses camundongos (Figura 14B). Diferentemente do fenótipo de CMD nos camundongos *mrgd-ko*, estudos com camundongos transgênicos mostraram uma maior razão entre a massa cardíaca e a massa corporal em comparação com os respectivos controles (Stypmann *et al.*, 2002; Arif *et al.*, 2021).

Embora o número de proteínas e fosfopeptídeos identificadas nos proteomas de LVT, CMV e ECM e no fosfoproteoma de CMV-P não tenha sido tão expressivo (Figura 15A) (Anexos 1-4) quanto outros trabalhos que estudaram o proteoma cardíaco (Doll *et al.*, 2017), os dados apresentaram uma boa reprodutibilidade em todos os grupos estudados (Figura 15B e D), apresentando uma regulação média de 10% do número total de proteínas quantificadas nos proteomas e fosfoproteomas (Figura 15C e E), que é uma proporção usualmente observada em trabalhos utilizando a marcação isotópica com dimetil (Bantscheff *et al.*, 2007).

As vias encontradas reguladas nos proteomas de LVT, CMV e ECM isolados de animais *mrgd-ko* estão intimamente relacionadas com a regulação de processos importantes para a contração muscular e morfologia do coração (Figura 16). Em estudos anteriores de cardiomiopatia dilatada, onde os autores avaliaram o transcriptoma e/ou o proteoma de tecidos cardíacos isolados de coração humano ou de camundongos, vias similares às alteradas no grupo *mrgd-ko* foram encontradas enriquecidas, como por exemplo, “junção

aderente”, “adesão celular”, “oxidação fosforilativa”, “doença de Parkinson”, “doença de Alzheimer”, “doença de Huntington”, “cardiomiopatia dilatada”, “alcoolismo”, “metabolismo de energético”, “peroxissoma”, “resposta ao estresse celular”, “sarcômeros” e “contração muscular” (Isserlin *et al.*, 2010; Colak *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Ameling *et al.*, 2021). De forma parecida, os processos biológicos alterados nos grupos *mrgd*-ko se assemelham a outros modelos de CMD (Lu *et al.*, 2019). Além disso, a regulação de proteínas relacionadas a processos de oxi-redução encontradas nos animais *mrgd*-ko (Figura 16B) está frequentemente associada aos fenótipos de cardiomiopatia (Koyama *et al.*, 2013; Evangelista *et al.*, 2019; Enomoto *et al.*, 2021). Neste sentido, a regulação de proteínas do disco Z (Figura 16B e D) indica uma disfunção estrutural e funcional das fibras cardíacas e do coração (Frank e Frey, 2011). Além disso, a regulação nas vias de metabolismo energético pode estar relacionada com o aumento observado na massa corporal dos animais *mrgd*-ko (Figura 14B e 16A–B).

A regulação positiva da via de sinalização adrenérgica e absorção de cálcio (Figura Anexo FA2) e a regulação negativa das vias de junção aderente e contração do músculo cardíaco (Figura FA3) indicam que a deleção do gene *MrgD* induz a desregulação de proteínas associadas ao transporte iônico e contração no tecido cardíaco. Em estudos anteriores, as vias de sinalização adrenérgica em cardiomiócitos e absorção de cálcio foram reportadas alteradas em quadros de CMD (Wu, H. *et al.*, 2015; Kuzmanov *et al.*, 2016).

A PKA é uma quinase envolvida na fosforilação de proteínas do sarcômero presentes nas bandas A e M, e discos Z (Voelkel e Linke, 2011). A fosforilação da Thr-198 da PKA (Anexo 4) parece apresentar um efeito protetor durante o processo de isquemia-reperfusão (Li, X. D. *et al.*, 2010). Além disso, a fosforilação da titina (TTN) pela PKA é uma etapa importante para o controle da sua rigidez e tensão passiva (Linke, 2018). A fosforilação da phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma (PIP5K1C) na Ser-555 (Anexo 4) parece ativar essa proteína e induzir a fosforilação da talina (TLN) e induzir a formação adequada das adesões focais (Di Paolo *et al.*, 2002), que são

importantes para a excitabilidade dos cardiomiócitos, favorecendo a despolarização rápida de células adjacentes (sincício cardíaco).

Os dados proteômicos indicam uma possível desregulação da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (NKA) em CMV isolados de animais *mrgd-ko* e um possível aumento na concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  nessas células. Em trabalhos anteriores, já foi demonstrado que o tratamento com a Ang-(1-7), após a isquemia do miocárdio, promove a ativação da NKA e reestabelece a hiperpolarização das células e a condução do impulso cardíaco. Em contrapartida, o aumento de AngII induz a inibição da NKA em cardiomiócitos e levam essas células a apresentarem um aumento do volume do líquido intracelular (LIC) (De Mello, 2008; 2009; Shah *et al.*, 2010). Em concordância com esses estudos, os cardiomiócitos dos animais *mrgd-ko* apresentaram os níveis de expressão de ECA2 diminuídos, sugerindo uma menor concentração de Ang-(1-7) e um fenótipo hipertrofiado (Oliveira *et al.*, 2019), possivelmente devido ao aumento do LIC. Por isso, é possível que a alteração na concentração dos íons  $\text{Na}^+$  intracelular cause uma alteração na polarização das células cardíacas, reduzindo o seu potencial de membrana em repouso.

A menor fração de encurtamento e um atraso na liberação de cálcio nos animais *mrgd-ko* (Oliveira *et al.*, 2019), bem como a diminuição da abundância da PLN nos CMV (Figura 17A) nos sugeriu que a ausência do receptor MrgD poderia alterar a homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O ensaio de transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  realizado em CMV corroboraram essa hipótese, já que cardiomiócitos *mrgd-ko* apresentaram níveis reduzidos desse cátion divalente em comparação com células wt (Figura 17B). Em conjunto, os dados nos sugerem que a diminuição da contratilidade dos cardiomiócitos em animais *mrgd-ko* é devido a uma alteração no processo de hiperpolarização celular, alterando a excitabilidade das células, assim como pela diminuição do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , reduzindo a contratilidade dos cardiomiócitos. Essa alteração no processo de acoplamento excitação-contração também parece estar relacionada com a assincronia nos vetores de força observados *in vivo* por ecocardiografia no coração dos camundongos *mrgd-ko* (Oliveira *et al.*, 2019). Além disso, os animais *mrgd-ko* parecem apresentar uma insuficiência cardíaca, evidenciada pela diminuição da abundância do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX1 (Ujihara *et al.*, 2016).

Além da desregulação de proteínas importantes para a manutenção da homeostasia iônica, a deleção do gene *MrgD* também afetou proteínas contráteis e estruturais muito importantes para o processo de contração (sístole) e relaxamento (diástole) do coração. As cadeias pesadas da miosina são essenciais para a formação dos filamentos espessos nos sarcômeros. Essas proteínas desenvolvem um papel importante na regulação da interação dos filamentos espessos de miosina com os filamentos de actina, no desenvolvimento embrionário e na diferenciação do tecido esquelético (Warkman *et al.*, 2012; Mosqueira *et al.*, 2018; Agarwal *et al.*, 2020). A desregulação dessas proteínas também é um fator importante para o desenvolvimento da cardiomiopatia hipertrófica (Chen *et al.*, 2020) e para a formação do septo atrial (Maran *et al.*, 2020). A diminuição drástica dessas proteínas em CMV e LVT isolados de animais *mrgd*-ko, assim como um aumento na fosforilação da Tyr-1460 na MYH7 (Figura 17A), indicam uma possível alteração na organização dos sarcômeros e, também, uma possível alteração na formação das fibras cardíacas e no desenvolvimento do coração (Locher *et al.*, 2011). Corroborando com os nossos dados proteômicos, que indicam uma clara desregulação de proteínas estruturais cardíacas devido à ausência do receptor *MrgD*, evidenciando um papel importante do SRA, já foi demonstrado que o tratamento com Ang-(1-7) restaurou os níveis de miosina e da força muscular em camundongos com sarcopenia (Aguirre *et al.*, 2020).

As miosinas de cadeia leve (MYL ou MLC) são importantes na estabilidade estrutural das miosinas de cadeia pesada (MYH ou MHC). A MYL2/MLC-2 está localizada no pescoço da cadeia de miosina, e é responsável pela tradução da energia química, gerada pela hidrólise de ATP, em energia mecânica, levando ao encurtamento dos miócitos (Sheikh *et al.*, 2015). A porção N-terminal da MLC-2, responsável pela ligação com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , contém um sítio de fosforilação na Ser-15, que regula a interação dos filamentos de actina e miosina (Scruggs *et al.*, 2010). Em um modelo fosfomimético em camundongos, a mutação da Ser-15 por um Asp-15 (S15D) levou ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia hipertrófica em camundongos (Yadav *et al.*, 2019), demonstrando a importância desse sítio de fosforilação. Além disso, a deleção e/ou mutação nessas proteínas leva ao desenvolvimento de fraqueza muscular e cardiomiopatias (Hernandez *et al.*, 2007). A diminuição de proteínas MLC's no proteoma de CMV e ECM isolados de

animais *mrgd-ko* (Figura 17A) indicam uma possível disfunção na estrutura dos sarcômeros. Neste sentido, acreditamos ser um mecanismo compensatório o aumento observado de fosforilação na Ser-15 em MYL-2/MLC-2.

Os filamentos finos dos sarcômeros são formados predominantemente pela  $\alpha$ -actina (ACTA1). Essa proteína interage intimamente com os filamentos de miosina e, por isso, apresenta um papel central na contração muscular (Clarke *et al.*, 2007; Laing *et al.*, 2009). A alteração, mutação e deleção dessa proteína leva a fraqueza muscular e alterações das fibras musculares (Eichbaum, 1975; Tidholm e Jonsson, 2005; Laing *et al.*, 2009). A diminuição da abundância da ACTA1/2 no LVT, juntamente com a diminuição da MHC, indica uma alteração nas fibras musculares dos animais *mrgd-ko*, compatíveis com o fenótipo de CMD.

Outra proteína importante para o processo de contração muscular é a MyBP-C, que auxilia na interação dos filamentos grossos e finos dos sarcômeros durante o processo de encurtamento dos miócitos. A MyBP-C apresenta um motivo (M-Motif) contendo 4 sítios de fosforilação em camundongos (Ser-273, Ser-282, Ser-302 e Ser-307) que são essenciais para o funcionamento correto do sarcômero durante a contração muscular (Dutsch *et al.*, 2019; Mcnamara *et al.*, 2019). A baixa expressão ou a mutação de MyBP-C já foi reportado como um fator deletério durante os ciclos de contração e relaxamento cardíaco (Toepfer *et al.*, 2019). Além disso, a mutação e/ou ausência da MyBP-C é reportado na literatura como um dos fatores indutores de cardiomiopatias (Dementyeva *et al.*, 2021; Pei *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 27

021). A baixa abundância da MyBP-C observada em animais *mrgd-ko* pode estar relacionada com a alteração deletéria dos parâmetros de contração e relaxamento do coração de animais *mrgd-ko* observados anteriormente (Oliveira *et al.*, 2019). Assim como discutido para a MYL-2, o aumento da fosforilação da MyBP-C em sítios tão próximos dos regulatórios pode ser uma adaptação das células *mrgd-ko* à perturbação causada pela diminuição dessa proteína (Dutsch *et al.*, 2019; Mcnamara *et al.*, 2019).

A associação dos filamentos de miosina com os filamentos da TTN é essencial para a transmissão da força gerada pela contração (Chopra *et al.*, 2018). Os filamentos de TTN

desencadeiam papéis importantes na formação do sarcômero e na sinalização mecânica do coração (Labeit *et al.*, 1997; Linke e Hamdani, 2014). Apesar de ser uma proteína muito grande, com mais de 35.000 resíduos de aminoácidos, a TTN é extremamente flexível, com alto potencial de mudança conformacional (Tharp *et al.*, 2019). Em modelos usando cardiomiócitos murinos com a deleção do gene PKD, foi observada uma ampla regulação na fosforilação da TTN, acompanhada pela diminuição da força de contração passiva dos cardiomiócitos (Herwig *et al.*, 2020). De forma similar, a TTN em cardiomiócitos isolados de animais *mrgd*-ko estava diminuída e apresentou uma ampla desfosforilação dos seguintes sítios: (i) Thr-266, pertencente a porção que realiza a ancoragem da TTN com o sarcômero (Disco Z) (Swist *et al.*, 2020), (ii) Ser-2080, localizado na porção elástica da TTN (Banda I) (Kotter *et al.*, 2013) e em (iii) Ser-33875, Ser-34097, Thr-34099, Ser-34451, Ser-34464, Ser-34470 e Ser-34476, que pertencem a porção distal da TTN (Banda M). Trabalhos recentes mostraram que uma desfosforilação ampla da TTN pode gerar um truncamento na sua estrutura, induzindo um prejuízo para o ciclo cardíaco (sístole e diástole), bem como favorece o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca (Linke e Hamdani, 2014; Radke *et al.*, 2019; Slater *et al.*, 2019; Tharp *et al.*, 2019; Vikhorev *et al.*, 2020).

A transmissão da força mecânica, gerada pelos cardiomiócitos, é mediada pelo complexo formado pelas proteínas ILK-PARVB-PITCH (IPP) (Chen *et al.*, 2005). A ausência de ILK reduz drasticamente os níveis proteicos de PARVB, pois esse complexo parece ser essencial para a estabilidade e localização dessa proteína (Vakaloglou e Zervas, 2012). A diminuição dos níveis proteicos da ILK na ECM isolada de animais *mrgd*-ko parece induzir a diminuição dos níveis de PARVB e TLN em CMV e LVT (Figura 17A), indicando que as conexões entre o citoesqueleto, a membrana plasmática e a matriz extracelular podem estar prejudicadas. Além disso, a deleção gênica de ILK em camundongos e peixes também levou ao desenvolvimento espontâneo da cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca (White *et al.*, 2006; Hannigan *et al.*, 2007; Pott *et al.*, 2018).

Por fim, a diminuição da desmina (DMD) no LVT de animais *mrgd*-ko também parece estar associada ao fenótipo deletério da função cardíaca de animais *mrgd*-ko (Oliveira *et al.*, 2019), afetando a contração muscular e a transdução de força (Haenggi e Fritschy,

2006). Em humanos, mutações nesse gene levam ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada ligada ao cromossomo X (Ortiz-Lopez *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2014). Além disso, camundongos DMD duplo knockout ( $DMD^{-/-}$ ) apresentam modificações no tamanho das fibras musculares, fraqueza muscular e força de contração reduzida, caracterizando a distrofia muscular de Duchenne (Saha *et al.*, 2017).

## 7 CONCLUSÃO

As análises proteômica e fosfoproteômica mostraram alterações em proteínas associadas a vias importantes de contração muscular, sinalização adrenérgica, organização dos sarcômeros, homeostase iônica e transmissão de força do coração nos animais *mrgd-ko*. O conjunto dos dados aqui reportados indicam que a deleção do gene *MrgD* está associado a um desbalanço na homeostasia iônica de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , que pode afetar o acoplamento excitação-contração, tão importante para o funcionamento cardíaco. Além disso, a diminuição de abundância observada para proteínas dos sarcômeros, como a MHC, MLC, ACTA, MyPB-C, TTN, assim como de proteínas estruturais, que participam da adesão das fibras musculares com a matriz extracelular, como as proteínas ILK, PARVB, TLN e DMD, também sugerem uma desorganização do citoesqueleto, que culmina com o fenótipo deletério da função cardíaca de animais *mrgd-ko*. Assim, este trabalho apresenta as bases moleculares que podem explicar a CMD observada em animais *mrgd-ko*, reforçando a importância do SRA na homeostasia cardíaca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, A. M. et al. Digenic Inheritance of LAMA4 and MYH7 Mutations in Patient with Infantile Dilated Cardiomyopathy. **Medicina (Kaunas)**, v. 55, n. 1, Jan 15 2019. ISSN 1648-9144 (Electronic)

1010-660X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30650640>  
[https://res.mdpi.com/d\\_attachment/medicina/medicina-55-00017/article\\_deploy/medicina-55-00017-v2.pdf](https://res.mdpi.com/d_attachment/medicina/medicina-55-00017/article_deploy/medicina-55-00017-v2.pdf) >.

ADER, F. et al. FLNC pathogenic variants in patients with cardiomyopathies: Prevalence and genotype-phenotype correlations. **Clin Genet**, v. 96, n. 4, p. 317-329, Oct 2019. ISSN 1399-0004 (Electronic)

0009-9163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31245841> >.

AGARWAL, M. et al. Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development. **Development**, v. 147, n. 7, Apr 6 2020. ISSN 1477-9129 (Electronic)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32094117> >.

AGUIRRE, F. et al. Protective Effect of Angiotensin 1-7 on Sarcopenia Induced by Chronic Liver Disease in Mice. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 11, May 29 2020. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32485991> >.

AKINRINADE, O. et al. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 4093, Mar 11 2019. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30858397> >.

ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Alamandine through MrgD receptor induces antidepressant-like effect in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Horm Behav**, v. 127, p. 104880, Jan 2021. ISSN 1095-6867 (Electronic)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33129833> >.

AMELING, S. et al. Analysis of DCM associated protein alterations of human right and left ventricles. **J Proteomics**, v. 231, p. 104018, Jan 16 2021. ISSN 1876-7737 (Electronic)

1874-3919 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33075551> >.

ARDITO, F. et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). **Int J Mol Med**, v. 40, n. 2, p. 271-280, Aug 2017. ISSN 1791-244X (Electronic)

1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656226> >.

ARIF, M. et al. Upregulated Angiogenesis Is Incompetent to Rescue Dilated Cardiomyopathy Phenotype in Mice. **Cells**, v. 10, n. 4, Mar 31 2021. ISSN 2073-4409 (Electronic)

2073-4409 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33807406> >.

ARIMURA, T. et al. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. **Hum Mutat**, v. 32, n. 12, p. 1481-91, Dec 2011. ISSN 1098-1004 (Electronic)

1059-7794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21898660> >.

ARONSEN, J. M.; SWIFT, F.; SEJERSTED, O. M. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. **J Mol Cell Cardiol**, v. 61, p. 11-9, Aug 2013. ISSN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774049> >.

ASHLEY, E. A. Towards precision medicine. **Nat Rev Genet**, v. 17, n. 9, p. 507-22, Aug 16 2016. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27528417> >.

ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. **J Chromatogr Sci**, v. 55, n. 2, p. 182-196, Feb 2017. ISSN 1945-239X (Electronic)

0021-9665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087761> >.

AUMO, L. et al. Functional roles of protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP) 2 (EPAC2) in cAMP-mediated actions in adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2151-61, May 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233795> >.

AVULA, L. R. et al. Expression and distribution patterns of Mas-related gene receptor subtypes A-H in the mouse intestine: inflammation-induced changes. **Histochem Cell Biol**, v. 139, n. 5, p. 639-58, May 2013. ISSN 1432-119X (Electronic)

0948-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504129> >.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 1017-31, Oct 2007. ISSN 1618-2642 (Print)

1618-2642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668192> >.

BAREJA, I. et al. Dynamics of Tpm1.8 domains on actin filaments with single-molecule resolution. **Mol Biol Cell**, v. 31, n. 22, p. 2452-2462, Oct 15 2020. ISSN 1939-4586 (Electronic)

1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32845787> >.

BATEMAN, N. W. et al. Maximizing peptide identification events in proteomic workflows using data-dependent acquisition (DDA). **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 329-38, Jan 2014. ISSN 1535-9484 (Electronic)

1535-9476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820513> >.

BATTH, T. S.; FRANCAVILLA, C.; OLSEN, J. V. Off-line high-pH reversed-phase fractionation for in-depth phosphoproteomics. **J Proteome Res**, v. 13, n. 12, p. 6176-86, Dec 5 2014. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338131> >.

BEGAY, R. L. et al. FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy. **JACC Basic Transl Sci**, v. 1, n. 5, p. 344-359, Aug 2016. ISSN 2452-302X (Print)

2452-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28008423> >.

BLAGOVA, O. et al. Mixed Hypertrophic and Dilated Phenotype of Cardiomyopathy in a Patient With Homozygous In-Frame Deletion in the MyBPC3 Gene Treated as Myocarditis for a Long Time. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 579450, 2020. ISSN 1663-9812 (Print)

1663-9812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33101033> >.

BOERSEMA, P. J. et al. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. **Nat Protoc**, v. 4, n. 4, p. 484-94, 2009. ISSN 1750-2799 (Electronic)

1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300442> >.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 12, p. 786-801, Dec 2014. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415508> >.

BRODEHL, A. et al. Mutations in ILK, encoding integrin-linked kinase, are associated with arrhythmogenic cardiomyopathy. **Transl Res**, v. 208, p. 15-29, Jun 2019. ISSN 1878-1810 (Electronic)

1878-1810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30802431> >.

BROWN, E. E. et al. Genetic Dilated Cardiomyopathy Due to TTN Variants Without Known Familial Disease. **Circ Genom Precis Med**, v. 13, n. 6, p. e003082, Dec 2020. ISSN 2574-8300 (Electronic)

2574-8300 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33190517> >.

CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 3, Mar 1 2011. ISSN 1943-0264 (Electronic)

1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421922> >.

CAVIEDES BOTTNER, P. et al. Dilated cardiomyopathy and severe heart failure. An update for pediatricians. **Arch Argent Pediatr**, v. 116, n. 3, p. e421-e428, Jun 1 2018. ISSN 1668-3501 (Electronic)

0325-0075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29756716> >.

CHEEDIPUDI, S. M. et al. Genomic Reorganization of Lamin-Associated Domains in Cardiac Myocytes Is Associated With Differential Gene Expression and DNA Methylation in Human Dilated Cardiomyopathy. **Circ Res**, v. 124, n. 8, p. 1198-1213, Apr 12 2019. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30739589> >.

CHEN, H. et al. Role of the integrin-linked kinase/PINCH1/alpha-parvin complex in cardiac myocyte hypertrophy. **Lab Invest**, v. 85, n. 11, p. 1342-56, Nov 2005. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170337> >.

CHEN, P. et al. MYH7B variants cause hypertrophic cardiomyopathy by activating the CaMK-signaling pathway. **Sci China Life Sci**, v. 63, n. 9, p. 1347-1362, Sep 2020. ISSN 1869-1889 (Electronic)

1674-7305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32207065> >.

CHENG, D. et al. A new dimethyl labeling-based SID-MRM-MS method and its application to three proteases involved in insulin maturation. **Biophys Rep**, v. 1, p. 71-80, 2015. ISSN 2364-3439 (Print)

2364-3439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26942221> >.

CHENG, X. J. et al. Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6, p. C1981-6, Dec 1997. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435504> >.

CHOPRA, A. et al. Force Generation via beta-Cardiac Myosin, Titin, and alpha-Actinin Drives Cardiac Sarcomere Assembly from Cell-Matrix Adhesions. **Dev Cell**, v. 44, n. 1, p. 87-96 e5, Jan 8 2018. ISSN 1878-1551 (Electronic)

1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316444> >.

CHU, L. et al. Cardiac Na(+)-Ca(2+) exchanger 1 (ncx1h) is critical for the ventricular cardiomyocyte formation via regulating the expression levels of gata4 and hand2 in zebrafish. **Sci China Life Sci**, v. 64, n. 2, p. 255-268, Feb 2021. ISSN 1869-1889 (Electronic)

1674-7305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32648190> >.

CLARKE, N. F. et al. The pathogenesis of ACTA1-related congenital fiber type disproportion. **Ann Neurol**, v. 61, n. 6, p. 552-61, Jun 2007. ISSN 0364-5134 (Print)

0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387733> >.

COLAK, D. et al. Integrated Left Ventricular Global Transcriptome and Proteome Profiling in Human End-Stage Dilated Cardiomyopathy. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0162669, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27711126> >.

COLPAN, M. et al. The cardiomyopathy-associated K15N mutation in tropomyosin alters actin filament pointed end dynamics. **Arch Biochem Biophys**, v. 630, p. 18-26, Sep 15 2017. ISSN 1096-0384 (Electronic)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28732641> >.

CORRELL, R. N. et al. Overexpression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha2 but not alpha1 isoform attenuates pathological cardiac hypertrophy and remodeling. **Circ Res**, v. 114, n. 2, p. 249-256, Jan 17 2014. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24218169> >.

DA SILVA, A. R. et al. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. **Eur J Clin Invest**, v. 47, n. 2, p. 117-128, Feb 2017. ISSN 1365-2362 (Electronic)

0014-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27930810> >.

DADSON, K.; HAUCK, L.; BILLIA, F. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. **Clin Sci (Lond)**, v. 131, n. 13, p. 1375-1392, Jul 1 2017. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28645928> >.

DE MELLO, W. C. Intracellular and extracellular renin have opposite effects on the regulation of heart cell volume. Implications for myocardial ischaemia. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 9, n. 2, p. 112-8, Jun 2008. ISSN 1470-3203 (Print)

1470-3203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584588> >.

\_\_\_\_\_. Cell swelling, impulse conduction, and cardiac arrhythmias in the failing heart. Opposite effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on cell volume regulation. **Mol Cell Biochem**, v. 330, n. 1-2, p. 211-7, Oct 2009. ISSN 1573-4919 (Electronic)

0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484190> >.

DE SOUZA-NETO, F. P. et al. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. **Clin Sci (Lond)**, v. 133, n. 5, p. 629-643, Mar 15 2019. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30737255> >.

DEMENTYEVA, E. V. et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi029-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.N515del mutation in MYBPC3. **Stem Cell Res**, v. 53, p. 102344, May 2021. ISSN 1876-7753 (Electronic)

1873-5061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33892289> >.

DI PAOLO, G. et al. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. **Nature**, v. 420, n. 6911, p. 85-9, Nov 7 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12422219> >.

DOBREV, D.; WEHRENS, X. H. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. **Circ Res**, v. 114, n. 8, p. 1311-9; discussion 1319, Apr 11 2014. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723656> >.

DOLL, S. et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 1469, Nov 13 2017. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29133944> >.

DOMINGUEZ, F. et al. Dilated Cardiomyopathy Due to BLC2-Associated Athanogene 3 (BAG3) Mutations. **J Am Coll Cardiol**, v. 72, n. 20, p. 2471-2481, Nov 13 2018. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30442290> >.

DONG, X. et al. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. **Cell**, v. 106, n. 5, p. 619-32, Sep 7 2001. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551509> >.

DOSHI, D.; MARX, S. O. Ion channels, transporters, and pumps as targets for heart failure therapy. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 273-8, Oct 2009. ISSN 1533-4023 (Electronic)

0160-2446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365280> >.

DUPREE, E. J. et al. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field. **Proteomes**, v. 8, n. 3, Jul 6 2020. ISSN 2227-7382 (Print)

2227-7382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32640657> >.

DUTSCH, A. et al. Phosphomimetic cardiac myosin-binding protein C partially rescues a cardiomyopathy phenotype in murine engineered heart tissue. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 18152, Dec 3 2019. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31796859> >.

DZIEWIECKA, E. et al. Mortality risk in dilated cardiomyopathy: the accuracy of heart failure prognostic models and dilated cardiomyopathy-tailored prognostic model. **ESC Heart Fail**, v. 7, n. 5, p. 2455-2467, Oct 2020. ISSN 2055-5822 (Electronic)

2055-5822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32853471> >.

EICHBAUM, F. W. 'Wavy' myocardial fibers in spontaneous and experimental adrenergic cardiopathies. **Cardiology**, v. 60, n. 6, p. 358-65, 1975. ISSN 0008-6312 (Print)

0008-6312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/782705> >.

EIJGENRAAM, T. R. et al. The phospholamban p.(Arg14del) pathogenic variant leads to cardiomyopathy with heart failure and is unresponsive to standard heart failure therapy. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 9819, Jun 17 2020. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32555305> >.

EISNER, D. A. et al. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. **Circ Res**, v. 121, n. 2, p. 181-195, Jul 7 2017. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28684623> >.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews** v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009. ISSN

ENGLAND, J.; LOUGHNA, S. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 7, p. 1221-39, Apr 2013. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955375> >.

ENOMOTO, H. et al. Dilated cardiomyopathy-linked heat shock protein family D member 1 mutations cause up-regulation of reactive oxygen species and autophagy through mitochondrial dysfunction. **Cardiovasc Res**, v. 117, n. 4, p. 1118-1131, Mar 21 2021. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32520982> >.

EVANGELISTA, I. et al. Molecular Dysfunction and Phenotypic Derangement in Diabetic Cardiomyopathy. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 13, Jul 2 2019. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31269778> >.

FAN, L. L. et al. Whole exome sequencing identifies a novel mutation (c.333+2T>C) of TNNI3K in a Chinese family with dilated cardiomyopathy and cardiac conduction disease. **Gene**, v. 648, p. 63-67, Mar 30 2018. ISSN 1879-0038 (Electronic)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29355681> >.

FANG, H. J.; LIU, B. P. Prevalence of TTN mutations in patients with dilated cardiomyopathy : A meta-analysis. **Herz**, v. 45, n. Suppl 1, p. 29-36, Dec 2020. ISSN 1615-6692 (Electronic)

0340-9937 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31209521> >.

FANG, X. et al. Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy. **J Clin Invest**, v. 127, n. 8, p. 3189-3200, Aug 1 2017. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28737513> >.

FENG, J. et al. Mutations in the dystrophin gene are associated with sporadic dilated cardiomyopathy. **Mol Genet Metab**, v. 77, n. 1-2, p. 119-26, Sep-Oct 2002. ISSN 1096-7192 (Print)

1096-7192 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359139> >.

FERAILLE, E. et al. Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C? **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 1, p. 39-50, Jan 2000. ISSN 1059-1524 (Print)

1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637289> >.

FERAILLE, E. et al. Insulin-induced stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. **Mol Biol Cell**, v. 10, n. 9, p. 2847-59, Sep 1999. ISSN 1059-1524 (Print)

1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473631> >.

FERNANDEZ-RUIZ, I. Upregulating RBM20 as a therapy for DCM. **Nat Rev Cardiol**, v. 17, n. 11, p. 679, Nov 2020. ISSN 1759-5010 (Electronic)

1759-5002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32973365> >.

FERNLUND, E. et al. Novel Genetic Variants in BAG3 and TNNT2 in a Swedish Family with a History of Dilated Cardiomyopathy and Sudden Cardiac Death. **Pediatr Cardiol**, v. 38, n. 6, p. 1262-1268, Aug 2017. ISSN 1432-1971 (Electronic)

0172-0643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28669108> >.

FERREIRA, A. J. et al. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 207-13, Feb 2010. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20038757> >.

FEYEN, D. A. M. et al. Unfolded Protein Response as a Compensatory Mechanism and Potential Therapeutic Target in PLN R14del Cardiomyopathy. **Circulation**, v. 144, n. 5, p. 382-392, Aug 3 2021. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33928785> >.

FISONE, G. et al. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, v. 269, n. 12, p. 9368-73, Mar 25 1994. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510709> >.

FORRESTER, S. J. et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 98, n. 3, p. 1627-1738, Jul 1 2018. ISSN 1522-1210 (Electronic)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29873596> >.

FRANASZCZYK, M. et al. Titin Truncating Variants in Dilated Cardiomyopathy - Prevalence and Genotype-Phenotype Correlations. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169007, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045975> >.

FRANGOIANNIS, N. G. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. **Circ Res**, v. 125, n. 1, p. 117-146, Jun 21 2019. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31219741> >.

FRANK, D.; FREY, N. Cardiac Z-disc signaling network. **J Biol Chem**, v. 286, n. 12, p. 9897-904, Mar 25 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257757> >.

FRANK, E. et al. Stable isotope metabolic labeling with a novel N-enriched bacteria diet for improved proteomic analyses of mouse models for psychopathologies. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7821, Nov 13 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915716> >.

FRAZIER, A. H.; RAMIREZ-CORREA, G. A.; MURPHY, A. M. Molecular mechanisms of sarcomere dysfunction in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. **Prog Pediatr Cardiol**, v. 31, n. 1, p. 29-33, Jan 1 2011. ISSN 1058-9813 (Print)

1058-9813 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297871> >.

GAO, Q. Q.; MCNALLY, E. M. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. **Compr Physiol**, v. 5, n. 3, p. 1223-39, Jul 1 2015. ISSN 2040-4603 (Electronic)

2040-4603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140716> >.

GÖKTEPEA, S.; ABILEX, O. J.; KUHLDEF, E. A generic approach towards finite growth with examples of athlete's heart, cardiac dilation, and cardiac wall thickening. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 58, n. 10, p. 1661-1680, 2010.

GOMEZ, J. et al. Screening of the Filamin C Gene in a Large Cohort of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 10, n. 2, Apr 2017. ISSN 1942-3268 (Electronic)

1942-3268 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356264> >.

GROBAN, E. S.; NARAYANAN, A.; JACOBSON, M. P. Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. **PLoS Comput Biol**, v. 2, n. 4, p. e32, Apr 2006. ISSN 1553-7358 (Electronic)

1553-734X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16628247> >.

GUAN, S. et al. Data Dependent-Independent Acquisition (DDIA) Proteomics. **J Proteome Res**, v. 19, n. 8, p. 3230-3237, Aug 7 2020. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32539411> >.

GUATIMOSIM, S. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, n. 5, p. C1327-39, May 2001. ISSN 0363-6143 (Print)

0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287346> >.

GUO, W. et al. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 766-73, May 2012. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466703> >.

HAAG, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. **Adv Exp Med Biol**, v. 919, p. 157-169, 2016. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27975216> >.

HAENGGI, T.; FRITSCHY, J. M. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 14, p. 1614-31, Jul 2006. ISSN 1420-682X (Print)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710609> >.

HALCSIK, E. et al. New insights in osteogenic differentiation revealed by mass spectrometric assessment of phosphorylated substrates in murine skin mesenchymal cells. **BMC Cell Biol**, v. 14, p. 47, Oct 22 2013. ISSN 1471-2121 (Electronic)

1471-2121 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24148232> >.

HANFT, L. M.; MCDONALD, K. S. Sarcomere length dependence of power output is increased after PKA treatment in rat cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 5, p. H1524-31, May 2009. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252095> >.

HANNIGAN, G. E.; COLES, J. G.; DEDHAR, S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. **Circ Res**, v. 100, n. 10, p. 1408-14, May 25 2007. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525380> >.

HARDMAN, M.; MAKAROV, A. A. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. **Anal Chem**, v. 75, n. 7, p. 1699-705, Apr 1 2003. ISSN 0003-2700 (Print)

0003-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705605> >.

HEKMAT, A. S. et al. Effect of Prolonged Infusion of Alamandine on Cardiovascular Parameters and Cardiac ACE2 Expression in a Rat Model of Renovascular Hypertension. **Biol Pharm Bull**, v. 42, n. 6, p. 960-967, Jun 1 2019. ISSN 1347-5215 (Electronic)

0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30956259> >.

HENDERSON, C. A. et al. Overview of the Muscle Cytoskeleton. **Compr Physiol**, v. 7, n. 3, p. 891-944, Jun 18 2017. ISSN 2040-4603 (Electronic)

2040-4603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640448> >.

HERMAN, D. S. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 366, n. 7, p. 619-28, Feb 16 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22335739> >.

HERNANDEZ, O. M. et al. Myosin essential light chain in health and disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 4, p. H1643-54, Apr 2007. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142342> >.

HERRMANN, S. et al. The cardiac sodium-calcium exchanger NCX1 is a key player in the initiation and maintenance of a stable heart rhythm. **Cardiovasc Res**, v. 99, n. 4, p. 780-8, Sep 1 2013. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23761399> >.

HERSHBERGER, R. E. et al. Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. **Clin Transl Sci**, v. 1, n. 1, p. 21-6, May 2008. ISSN 1752-8062 (Electronic) 1752-8054 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412328> >.

HERWIG, M. et al. Modulation of Titin-Based Stiffness in Hypertrophic Cardiomyopathy via Protein Kinase D. **Front Physiol**, v. 11, p. 240, 2020. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32351396> >.

HESSE, M. et al. Dilated cardiomyopathy is associated with reduced expression of the cardiac sodium channel Scn5a. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 3, p. 498-509, Aug 1 2007. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512504> >.

HILGER, D.; MASUREEL, M.; KOBILKA, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. **Nat Struct Mol Biol**, v. 25, n. 1, p. 4-12, Jan 2018. ISSN 1545-9985 (Electronic) 1545-9985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29323277> >.

HO, C. S. et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **Clin Biochem Rev**, v. 24, n. 1, p. 3-12, 2003. ISSN 0159-8090 (Print) 0159-8090 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568044> >.

HOMAYOUN, H. et al. Novel mutation in MYH7 gene associated with distal myopathy and cardiomyopathy. **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 3, p. 219-22, Mar 2011. ISSN 1873-2364 (Electronic) 0960-8966 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21211974> >.

HRENAK, J.; PAULIS, L.; SIMKO, F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 7, Jul 20 2016. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27447621> >.

HSU, C. P. et al. Sarcomeric and nonmuscle alpha-actinin isoforms exhibit differential dynamics at skeletal muscle Z-lines. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 75, n. 5, p. 213-228, May 2018. ISSN 1949-3592 (Electronic)

1949-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29518289> >.

HU, Q. et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **J Mass Spectrom**, v. 40, n. 4, p. 430-43, Apr 2005. ISSN 1076-5174 (Print)

1076-5174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838939> >.

HUANG, Y. et al. Alamandine attenuates hepatic fibrosis by regulating autophagy induced by NOX4-dependent ROS. **Clin Sci (Lond)**, v. 134, n. 7, p. 853-869, Apr 17 2020. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32227122> >.

HUMPHREY, S. J.; JAMES, D. E.; MANN, M. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 12, p. 676-687, Dec 2015. ISSN 1879-3061 (Electronic)

1043-2760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498855> >.

HWANG, P. M.; SYKES, B. D. Targeting the sarcomere to correct muscle function. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 5, p. 313-28, May 2015. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881969> >.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 1, p. a004903, Jan 1 2012. ISSN 1943-0264 (Electronic)

1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937732> >.

ISSERLIN, R. et al. Pathway analysis of dilated cardiomyopathy using global proteomic profiling and enrichment maps. **Proteomics**, v. 10, n. 6, p. 1316-27, Mar 2010. ISSN 1615-9861 (Electronic)

1615-9853 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127684> >.

ITO, Y. et al. Disorganization of intercalated discs in dilated cardiomyopathy. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 11852, Jun 4 2021. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34088908> >.

JACHYMOVA, M. et al. Genetic variation screening of TNNT2 gene in a cohort of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy. **Physiol Res**, v. 61, n. 2, p. 169-75, 2012. ISSN 1802-9973 (Electronic)

0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292720> >.

JEFFERIES, J. L.; TOWBIN, J. A. Dilated cardiomyopathy. **Lancet**, v. 375, n. 9716, p. 752-62, Feb 27 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189027> >.

JHA, S.; SPETH, R. C.; MACHEROUX, P. The possible role of a bacterial aspartate beta-decarboxylase in the biosynthesis of alamandine. **Med Hypotheses**, v. 144, p. 110038, Nov 2020. ISSN 1532-2777 (Electronic)

0306-9877 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32758880> >.

JIA, G. et al. Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Activation in Promoting Cardiovascular Fibrosis and Stiffness. **Hypertension**, v. 72, n. 3, p. 537-548, Sep 2018. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29987104> >.

JIA, G.; HILL, M. A.; SOWERS, J. R. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. **Circ Res**, v. 122, n. 4, p. 624-638, Feb 16 2018. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29449364> >.

KAWAKAMI, H. et al. A Novel Truncating LMNA Mutation in Patients with Cardiac Conduction Disorders and Dilated Cardiomyopathy. **Int Heart J**, v. 59, n. 3, p. 531-541, May 30 2018. ISSN 1349-3299 (Electronic)

1349-2365 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29628476> >.

KNOLL, R.; BUYANDELGER, B.; LAB, M. The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 569628, 2011. ISSN 1110-7251 (Electronic)

1110-7243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028589> >.

KOH, C. H. et al. Identification of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition-independent proarrhythmic ionic mechanisms of cardiac glycosides. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2465, May 26 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28550304> >.

KONERMANN, L. et al. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. **Anal Chem**, v. 85, n. 1, p. 2-9, Jan 2 2013. ISSN 1520-6882 (Electronic)

0003-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23134552> >.

KOPYLOVA, G. V. et al. Cardiomyopathy-associated mutations in tropomyosin differently affect actin-myosin interaction at single-molecule and ensemble levels. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 40, n. 3-4, p. 299-308, Dec 2019. ISSN 1573-2657 (Electronic)

0142-4319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643006> >.

KOSCHINSKI, A.; ZACCOLO, M. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 14090, Oct 26 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074866> >.

KOTTER, S. et al. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. **Cardiovasc Res**, v. 99, n. 4, p. 648-56, Sep 1 2013. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764881> >.

KOYAMA, H. et al. Antioxidants improve the phenotypes of dilated cardiomyopathy and muscle fatigue in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1383-93, Jan 24 2013. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348992> >.

KRUGER, M.; LINKE, W. A. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 27, n. 5-7, p. 435-44, 2006. ISSN 0142-4319 (Print)

0142-4319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16897574> >.

KUZMANOV, U. et al. Global phosphoproteomic profiling reveals perturbed signaling in a mouse model of dilated cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 44, p. 12592-12597, Nov 1 2016. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27742792> >.

LABEIT, S.; KOLMERER, B.; LINKE, W. A. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. **Circ Res**, v. 80, n. 2, p. 290-4, Feb 1997. ISSN 0009-7330 (Print)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012751> >.

LAING, N. G. et al. Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). **Hum Mutat**, v. 30, n. 9, p. 1267-77, Sep 2009. ISSN 1098-1004 (Electronic)

1059-7794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19562689> >.

LANDIM-VIEIRA, M. et al. Familial Dilated Cardiomyopathy Associated With a Novel Combination of Compound Heterozygous TNNC1 Variants. **Front Physiol**, v. 10, p. 1612, 2019. ISSN 1664-042X (Print)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32038292> >.

LATORRACA, N. R.; VENKATAKRISHNAN, A. J.; DROR, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. **Chem Rev**, v. 117, n. 1, p. 139-155, Jan 11 2017. ISSN 1520-6890 (Electronic)

0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27622975> >.

LAU, H. T. et al. Comparing SILAC- and stable isotope dimethyl-labeling approaches for quantitative proteomics. **J Proteome Res**, v. 13, n. 9, p. 4164-74, Sep 5 2014. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077673> >.

LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. **Circ Res**, v. 112, n. 8, p. 1104-11, Apr 12 2013. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446738> >.

LEÃO, N. M. et al. Mesoporous silica nanoparticles loaded with alamandine as a potential new therapy against cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, n. 9, p. 101058, Sep 2020. ISSN 1773-2247.

LEE, J. et al. Activation of PDGF pathway links LMNA mutation to dilated cardiomyopathy. **Nature**, v. 572, n. 7769, p. 335-340, Aug 2019. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31316208> >.

LEFKOWITZ, R. J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 52, n. 25, p. 6366-78, Jun 17 2013. ISSN 1521-3773 (Electronic)

1433-7851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650015> >.

LEMBO, P. M. et al. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron--specific GPCRs. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 201-9, Mar 2002. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850634> >.

LI, D. et al. Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy. **Clin Transl Sci**, v. 3, n. 3, p. 90-7, Jun 2010. ISSN 1752-8062 (Electronic)

1752-8054 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20590677> >.

LI, M. et al. Core functional nodes and sex-specific pathways in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 2843, Jun 2 2020. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32487995> >.

LI, X. et al. Cardiac troponin T (TNNT2) mutations in chinese dilated cardiomyopathy patients. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 907360, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110706> >.

LI, X. D. et al. Tongxinluo reduces myocardial no-reflow and ischemia-reperfusion injury by stimulating the phosphorylation of eNOS via the PKA pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, n. 4, p. H1255-61, Oct 2010. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693395> >.

LI, Y. D. et al. TNNT2 Gene Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Idiopathic Dilated Cardiomyopathy in Kazak and Han Chinese. **Med Sci Monit**, v. 21, p. 3343-7, Nov 3 2015. ISSN 1643-3750 (Electronic)

1234-1010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26525169> >.

LI, Z. et al. A PLN nonsense variant causes severe dilated cardiomyopathy in a novel autosomal recessive inheritance mode. **Int J Cardiol**, v. 279, p. 122-125, Mar 15 2019. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30638982> >.

LIEBMAN, S. W.; PALAGANAS, H.; KOBANY, H. A founder mutation in FLNC is likely a major cause of idiopathic dilated cardiomyopathy in Ashkenazi Jews. **Int J Cardiol**, v. 323, p. 124, Jan 15 2021. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32805325> >.

LINDSEY, M. L. et al. Transformative Impact of Proteomics on Cardiovascular Health and Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 132, n. 9, p. 852-72, Sep 1 2015. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195497> >.

LINKE, W. A. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. **Annu Rev Physiol**, v. 80, p. 389-411, Feb 10 2018. ISSN 1545-1585 (Electronic)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29131758> >.

LINKE, W. A.; HAMDANI, N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. **Circ Res**, v. 114, n. 6, p. 1052-68, Mar 14 2014. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625729> >.

LIU, C. et al. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. **Amino Acids**, v. 50, n. 8, p. 1071-1081, Aug 2018. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29752563> >.

LIU, S. et al. In-depth proteomic profiling of left ventricular tissues in human end-stage dilated cardiomyopathy. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 48321-48332, Jul 18 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28427148> >.

LIU, Y. et al. Mechanisms of compartmentalized expression of Mrg class G-protein-coupled sensory receptors. **J Neurosci**, v. 28, n. 1, p. 125-32, Jan 2 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171930> >.

LOCHER, M. R. et al. Effects of low-level  $\alpha$ -myosin heavy chain expression on contractile kinetics in porcine myocardium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 3, p. H869-78, Mar 2011. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217059> >.

LOCKHART, M. et al. Extracellular matrix and heart development. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 91, n. 6, p. 535-50, Jun 2011. ISSN 1542-0760 (Electronic)

1542-0752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618406> >.

LORK, M.; STAAL, J.; BEYAERT, R. Ubiquitination and phosphorylation of the CARD11-BCL10-MALT1 signalosome in T cells. **Cell Immunol**, v. 340, p. 103877, Jun 2019. ISSN 1090-2163 (Electronic)

0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30514565> >.

LU, D. et al. Cardiac Proteome Profiling in Ischemic and Dilated Cardiomyopathy Mouse Models. **Front Physiol**, v. 10, p. 750, 2019. ISSN 1664-042X (Print)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31275164> >.

LYNCH, T. L. T. et al. Cardiac inflammation in genetic dilated cardiomyopathy caused by MYBPC3 mutation. **J Mol Cell Cardiol**, v. 102, p. 83-93, Jan 2017. ISSN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27955979> >.

LYNCH, T. L. T. et al. Amino terminus of cardiac myosin binding protein-C regulates cardiac contractility. **J Mol Cell Cardiol**, v. 156, p. 33-44, Jul 2021. ISSN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33781820> >.

LYNCH, T. L. T. et al. Oxidative Stress in Dilated Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Mutation. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 424751, 2015. ISSN 1942-0994 (Electronic)

1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26508994> >.

MAHDIEH, N. et al. Genotypic effect of a mutation of the MYBPC3 gene and two phenotypes with different patterns of inheritance. **J Clin Lab Anal**, v. 32, n. 6, p. e22419, Jul 2018. ISSN 1098-2825 (Electronic)

0887-8013 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29493010> >.

MAHMALJY, H.; YELAMANCHILI, V. S.; SINGHAL, M. Dilated Cardiomyopathy. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2021.

MANADAS, B. et al. Peptide fractionation in proteomics approaches. **Expert Rev Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 655-63, Oct 2010. ISSN 1744-8387 (Electronic)

1478-9450 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20973639> >.

MANSO, A. M. et al. Loss of mouse cardiomyocyte talin-1 and talin-2 leads to beta-1 integrin reduction, costameric instability, and dilated cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 30, p. E6250-E6259, Jul 25 2017. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28698364> >.

MARAN, S. et al. Mutations in the tail domain of MYH3 contributes to atrial septal defect. **PLoS One**, v. 15, n. 4, p. e0230982, 2020. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32315303> >.

MARON, B. J. The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is the gold standard. **Circ Heart Fail**, v. 1, n. 1, p. 72-5; discussion 76, May 2008. ISSN 1941-3297 (Electronic)

1941-3289 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19808273> >.

MARX, S. O. et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. **Cell**, v. 101, n. 4, p. 365-76, May 12 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830164> >.

MASTROIANNO, S. et al. Double missense mutations in cardiac myosin-binding protein C and myopalladin genes: A case report with diffuse coronary disease, complete atrioventricular block, and progression to dilated cardiomyopathy. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, v. 25, n. 3, p. e12687, May 2020. ISSN 1542-474X (Electronic)

1082-720X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31524317> >.

MAYYA, V.; HAN, D. K. Phosphoproteomics by mass spectrometry: insights, implications, applications and limitations. **Expert Rev Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 605-18, Dec 2009. ISSN 1744-8387 (Electronic)

1478-9450 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929607> >.

MAZETO, I. F. S. et al. Calcium homeostasis behavior and cardiac function on left ventricular remodeling by pressure overload. **Braz J Med Biol Res**, v. 54, n. 4, p. e10138, 2021. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33624728> >.

MAZZACCARA, C. et al. A common polymorphism in the SCN5A gene is associated with dilated cardiomyopathy. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)**, v. 19, n. 7, p. 344-350, Jul 2018. ISSN 1558-2035 (Electronic)

1558-2027 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29782370> >.

MAZZAROTTO, F. et al. Reevaluating the Genetic Contribution of Monogenic Dilated Cardiomyopathy. **Circulation**, v. 141, n. 5, p. 387-398, Feb 4 2020. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31983221> >.

MCDERMOTT-ROE, C. et al. Investigation of a dilated cardiomyopathy-associated variant in BAG3 using genome-edited iPSC-derived cardiomyocytes. **JCI Insight**, v. 4, n. 22, Nov 14 2019. ISSN 2379-3708 (Electronic)

2379-3708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31723063> >.

MCKINNEY, C. A. et al. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 12, p. 815-27, Jun 2014. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24593683> >.

MCNAIR, W. P. et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. **Circulation**, v. 110, n. 15, p. 2163-7, Oct 12 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466643> >.

MCNAIR, W. P. et al. SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism. **J Am Coll Cardiol**, v. 57, n. 21, p. 2160-8, May 24 2011. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596231> >.

MCNALLY, E. M.; MESTRONI, L. Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. **Circ Res**, v. 121, n. 7, p. 731-748, Sep 15 2017. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28912180> >.

MCNAMARA, J. W.; SINGH, R. R.; SADAYAPPAN, S. Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation regulates the super-relaxed state of myosin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 24, p. 11731-11736, Jun 11 2019. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31142654> >.

MEDIN, M. et al. Mutational screening of phospholamban gene in hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy and functional study of the PLN -42 C>G mutation. **Eur J Heart Fail**, v. 9, n. 1, p. 37-43, Jan 2007. ISSN 1388-9842 (Print)

1388-9842 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829191> >.

MELO-BRAGA, M. N. et al. Comprehensive protocol to simultaneously study protein phosphorylation, acetylation, and N-linked sialylated glycosylation. **Methods Mol Biol**, v. 1295, p. 275-92, 2015. ISSN 1940-6029 (Electronic)

1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25820729> >.

MICHALATOU, M. et al. Transdermal Delivery of AT1 Receptor Antagonists Reduce Blood Pressure and Reveal a Vasodilatory Effect on Kidney Blood Vessels. **Curr Mol Pharmacol**, v. 11, n. 3, p. 226-236, 2018. ISSN 1874-4702 (Electronic)

1874-4672 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29676239> >.

MICHALSKI, A. et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 9, p. M111 011015, Sep 2011. ISSN 1535-9484 (Electronic)

1535-9476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642640> >.

MILASTA, S. et al. Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD. **Mol Pharmacol**, v. 69, n. 2, p. 479-91, Feb 2006. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282220> >.

MILLER, A. J.; ARNOLD, A. C. The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. **Clin Auton Res**, v. 29, n. 2, p. 231-243, Apr 2019. ISSN 1619-1560 (Electronic)

0959-9851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30413906> >.

MOKOU, M. et al. Proteomics in cardiovascular disease: recent progress and clinical implication and implementation. **Expert Rev Proteomics**, v. 14, n. 2, p. 117-136, Feb 2017. ISSN 1744-8387 (Electronic)

1478-9450 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27997814> >.

MOSQUEIRA, D. et al. CRISPR/Cas9 editing in human pluripotent stem cell-cardiomyocytes highlights arrhythmias, hypocontractility, and energy depletion as potential therapeutic targets for hypertrophic cardiomyopathy. **Eur Heart J**, v. 39, n. 43, p. 3879-3892, Nov 14 2018. ISSN 1522-9645 (Electronic)

0195-668X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29741611> >.

MURPHY, R. T. et al. Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. **Lancet**, v. 363, n. 9406, p. 371-2, Jan 31 2004. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070570> >.

NADLER, W. M. et al. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. **J Proteome Res**, v. 16, n. 3, p. 1207-1215, Mar 3 2017. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28176526> >.

NAKASHIMA, Y. et al. Lifelong Clinical Impact of the Presence of Sarcomere Gene Mutation in Japanese Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. **Circ J**, v. 84, n. 10, p. 1846-1853, Sep 25 2020. ISSN 1347-4820 (Electronic)

1346-9843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32830170> >.

OLIVEIRA, A. C. et al. Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 316, n. 1, p. H123-H133, Jan 1 2019. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30339496> >.

ORTIZ-LOPEZ, R. et al. Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v. 95, n. 10, p. 2434-40, May 20 1997. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9170407> >.

PALMER, B. M. Thick filament proteins and performance in human heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 10, n. 3, p. 187-97, Sep 2005. ISSN 1382-4147 (Print)

1382-4147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416042> >.

PAPPIREDDI, N.; MARTIN, L.; WUHR, M. A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. **ChemBiochem**, v. 20, n. 10, p. 1210-1224, May 15 2019. ISSN 1439-7633 (Electronic)

1439-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30609196> >.

PARK, B. M. et al. Alamandine Protects the Heart Against Reperfusion Injury via the MrgD Receptor. **Circ J**, v. 82, n. 10, p. 2584-2593, Sep 25 2018. ISSN 1347-4820 (Electronic)

1346-9843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29998915> >.

PARKER, C. E.; WARREN, M. R.; MOCANU, V. Mass Spectrometry for Proteomics. In: ALZATE, O. (Ed.). **Neuroproteomics**. Boca Raton (FL), 2010. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781420076257.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 747-803, Jul 2006. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816138> >.

PAZ OCARANZA, M. et al. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. **Nat Rev Cardiol**, v. 17, n. 2, p. 116-129, Feb 2020. ISSN 1759-5010 (Electronic)

1759-5002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31427727> >.

PEI, J. et al. Multi-omics integration identifies key upstream regulators of pathomechanisms in hypertrophic cardiomyopathy due to truncating MYBPC3 mutations. **Clin Epigenetics**, v. 13, n. 1, p. 61, Mar 23 2021. ISSN 1868-7083 (Electronic)

1868-7075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33757590> >.

PENG, W. et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. **Science**, v. 354, n. 6310, Oct 21 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708056> >.

PETROPOULOU, E. et al. Digenic inheritance of mutations in the cardiac troponin (TNNT2) and cardiac beta myosin heavy chain (MYH7) as the cause of severe dilated cardiomyopathy. **Eur J Med Genet**, v. 60, n. 9, p. 485-488, Sep 2017. ISSN 1878-0849 (Electronic)

1769-7212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28642161> >.

PETTINATO, A. M. et al. Development of a Cardiac Sarcomere Functional Genomics Platform to Enable Scalable Interrogation of Human TNNT2 Variants. **Circulation**, v. 142, n. 23, p. 2262-2275, Dec 8 2020. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33025817> >.

PINTO, J. R. et al. Functional characterization of TNNC1 rare variants identified in dilated cardiomyopathy. **J Biol Chem**, v. 286, n. 39, p. 34404-12, Sep 30 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21832052> >.

POTT, A. et al. Therapeutic Chemical Screen Identifies Phosphatase Inhibitors to Reconstitute PKB Phosphorylation and Cardiac Contractility in ILK-Deficient Zebrafish. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, Nov 19 2018. ISSN 2218-273X (Electronic)

2218-273X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30463267> >.

QARADAKHI, T. et al. Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. **Cardiovasc Ther**, v. 35, n. 6, Dec 2017. ISSN 1755-5922 (Electronic)

1755-5914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28901725> >.

RADKE, M. H. et al. Deleting Full Length Titin Versus the Titin M-Band Region Leads to Differential Mechanosignaling and Cardiac Phenotypes. **Circulation**, v. 139, n. 15, p. 1813-1827, Apr 9 2019. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30700140> >.

RAJAN, S. et al. Tropomyosin pseudo-phosphorylation results in dilated cardiomyopathy. **J Biol Chem**, v. 294, n. 8, p. 2913-2923, Feb 22 2019. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30567734> >.

RASSIER, D. E. Sarcomere mechanics in striated muscles: from molecules to sarcomeres to cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 313, n. 2, p. C134-C145, Aug 1 2017. ISSN 1522-1563 (Electronic)

0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539306> >.

RAUNIYAR, N.; YATES, J. R., 3RD. Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. **J Proteome Res**, v. 13, n. 12, p. 5293-309, Dec 5 2014. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25337643> >.

REHMAN, I.; REHMAN, A. Anatomy, Thorax, Heart. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2021.

ROBYNS, T. et al. Whole exome sequencing in a large pedigree with DCM identifies a novel mutation in RBM20. **Acta Cardiol**, v. 75, n. 8, p. 748-753, Dec 2020. ISSN 1784-973X (Electronic)

0001-5385 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31583969> >.

RODRIGUES-RIBEIRO, L. et al. Assessment of protein extraction and digestion efficiency of well-established shotgun protocols for heart proteomics. **Anal Biochem**, v. 578, p. 51-59, Aug 1 2019. ISSN 1096-0309 (Electronic)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31085165> >.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; G., A. I. Mass Spectrometry | Isotope Dilution Mass Spectrometry. **Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)**, n. 3, p. 411-420, Mar 2019.

ROGGENBUCK, J. et al. A novel TTN deletion in a family with skeletal myopathy, facial weakness, and dilated cardiomyopathy. **Mol Genet Genomic Med**, v. 7, n. 11, p. e924, Nov 2019. ISSN 2324-9269 (Electronic)

2324-9269 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31489791> >.

RYCKEBUSCH, L. et al. Tmem2 regulates cell-matrix interactions that are essential for muscle fiber attachment. **Development**, v. 143, n. 16, p. 2965-72, Aug 15 2016. ISSN 1477-9129 (Electronic)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471259> >.

SAHA, M. et al. Consequences of MEGF10 deficiency on myoblast function and Notch1 interactions. **Hum Mol Genet**, v. 26, n. 15, p. 2984-3000, Aug 1 2017. ISSN 1460-2083 (Electronic)

0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28498977> >.

SANTOS, R. A. S. et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). **Physiol Rev**, v. 98, n. 1, p. 505-553, Jan 1 2018. ISSN 1522-1210 (Electronic)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351514> >.

SCHUBERT, O. T. et al. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. **Nat Protoc**, v. 12, n. 7, p. 1289-1294, Jul 2017. ISSN 1750-2799 (Electronic)

1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28569762> >.

SCHULTHEISS, H. P. et al. Dilated cardiomyopathy. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 1, p. 32, May 9 2019. ISSN 2056-676X (Electronic)

2056-676X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31073128> >.

SCRUGGS, S. B. et al. A novel, in-solution separation of endogenous cardiac sarcomeric proteins and identification of distinct charged variants of regulatory light chain. **Mol Cell Proteomics**, v. 9, n. 9, p. 1804-18, Sep 2010. ISSN 1535-9484 (Electronic)

1535-9476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445002> >.

SHADRIN, I. Y.; KHODABUKUS, A.; BURSAC, N. Striated muscle function, regeneration, and repair. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 22, p. 4175-4202, Nov 2016. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27271751> >.

SHAH, A. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates hyposmolarity-induced ANP secretion via the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump. **Peptides**, v. 31, n. 9, p. 1779-85, Sep 2010. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600428> >.

SHARAD, M. Mass Spectrometry: Detectors Review. **Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, n. 4, p. 102839, Oct 2018.

SHEIKH, F.; LYON, R. C.; CHEN, J. Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease. **Gene**, v. 569, n. 1, p. 14-20, Sep 10 2015. ISSN 1879-0038 (Electronic)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26074085> >.

SHINOHARA, T. et al. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. **J Biol Chem**, v. 279, n. 22, p. 23559-64, May 28 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037633> >.

SHULGA, Y. V. et al. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isoforms exhibit acyl chain selectivity for both substrate and lipid activator. **J Biol Chem**, v. 287, n. 43, p. 35953-63, Oct 19 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22942276> >.

SILVA, M. M. et al. Alamandine improves cardiac remodeling induced by transverse aortic constriction in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 320, n. 1, p. H352-H363, Jan 1 2021. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33124885> >.

SINGH, S. M. et al. Missense mutation Lys18Asn in dystrophin that triggers X-linked dilated cardiomyopathy decreases protein stability, increases protein unfolding, and perturbs protein structure, but does not affect protein function. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110439, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340340> >.

SINGH, V. et al. Phosphorylation: Implications in Cancer. **Protein J**, v. 36, n. 1, p. 1-6, Feb 2017. ISSN 1875-8355 (Electronic)

1572-3887 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108801> >.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Front Microbiol**, v. 6, p. 791, 2015. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300860> >.

SLATER, R. E. et al. Metformin improves diastolic function in an HFpEF-like mouse model by increasing titin compliance. **J Gen Physiol**, v. 151, n. 1, p. 42-52, Jan 7 2019. ISSN 1540-7748 (Electronic)

0022-1295 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30567709> >.

SOARES, E. R. et al. Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. **Peptides**, v. 96, p. 67-75, Oct 2017. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28889964> >.

SOLTANI HEKMAT, A. et al. Differences in Cardiovascular Responses to Alamandine in Two-Kidney, One Clip Hypertensive and Normotensive Rats. **Circ J**, v. 81, n. 3, p. 405-412, Feb 24 2017. ISSN 1347-4820 (Electronic)

1346-9843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28070059> >.

SONG, X. D.; FENG, J. P.; YANG, R. X. Alamandine protects rat from myocardial ischemia-reperfusion injury by activating JNK and inhibiting NF-kappaB. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 23, n. 15, p. 6718-6726, Aug 2019. ISSN 2284-0729 (Electronic)

1128-3602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31378915> >.

SONNENBLICK, E. H.; STAM, A. C., JR. Cardiac muscle: activation and contraction. **Annu Rev Physiol**, v. 31, p. 647-74, 1969. ISSN 0066-4278 (Print)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5190706> >.

SQUIRE, J. Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 22, Nov 14 2019. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31739584> >.

STREFF, H. et al. Amish nemaline myopathy and dilated cardiomyopathy caused by a homozygous contiguous gene deletion of TNNT1 and TNNI3 in a Mennonite child. **Eur J Med Genet**, v. 62, n. 11, p. 103567, Nov 2019. ISSN 1878-0849 (Electronic)

1769-7212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30395933> >.

STULTZ, C. M.; LEVIN, A. D.; EDELMAN, E. R. Phosphorylation-induced conformational changes in a mitogen-activated protein kinase substrate. Implications for tyrosine hydroxylase activation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 49, p. 47653-61, Dec 6 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361946> >.

STYPMANN, J. et al. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6234-9, Apr 30 2002. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972068> >.

SVEINBJORNSSON, G. et al. Variants in NKX2-5 and FLNC Cause Dilated Cardiomyopathy and Sudden Cardiac Death. **Circ Genom Precis Med**, v. 11, n. 8, p. e002151, Aug 2018. ISSN 2574-8300 (Electronic)

2574-8300 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30354339> >.

SWIST, S. et al. Maintenance of sarcomeric integrity in adult muscle cells crucially depends on Z-disc anchored titin. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 4479, Sep 8 2020. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32900999> >.

TANJORE, R. et al. Genetic variations of beta-MYH7 in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. **Indian J Hum Genet**, v. 16, n. 2, p. 67-71, May 2010. ISSN 0971-6866 (Print)

1998-362X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21031054> >.

THARP, C. A. et al. The Giant Protein Titin's Role in Cardiomyopathy: Genetic, Transcriptional, and Post-translational Modifications of TTN and Their Contribution to Cardiac Disease. **Front Physiol**, v. 10, p. 1436, 2019. ISSN 1664-042X (Print)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31849696> >.

TIDHOLM, A.; JONSSON, L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. **Vet Pathol**, v. 42, n. 1, p. 1-8, Jan 2005. ISSN 0300-9858 (Print)

0300-9858 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657266> >.

TOEPFER, C. N. et al. Hypertrophic cardiomyopathy mutations in MYBPC3 dysregulate myosin. **Sci Transl Med**, v. 11, n. 476, Jan 23 2019. ISSN 1946-6242 (Electronic)

1946-6234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30674652> >.

TRUJILLO, E. A. et al. Maximizing Tandem Mass Spectrometry Acquisition Rates for Shotgun Proteomics. **Anal Chem**, v. 91, n. 20, p. 12625-12629, Oct 15 2019. ISSN 1520-6882 (Electronic)

0003-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31509394> >.

TRUSZKOWSKA, G. T. et al. A study in Polish patients with cardiomyopathy emphasizes pathogenicity of phospholamban (PLN) mutations at amino acid position 9 and low penetrance of heterozygous null PLN mutations. **BMC Med Genet**, v. 16, p. 21, Apr 3 2015. ISSN 1471-2350 (Electronic)

1471-2350 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25928149> >.

TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, J. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 612482, 2010. ISSN 1110-7251 (Electronic)

1110-7243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20625501> >.

UJIHARA, Y. et al. Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodelling. **Cardiovasc Res**, v. 111, n. 4, p. 348-61, Sep 2016. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27229460> >.

VAIKHANSKAYA, T. et al. LMNA-related dilated cardiomyopathy. **Oxf Med Case Reports**, v. 2014, n. 6, p. 102-4, Sep 2014. ISSN 2053-8855 (Print)

2053-8855 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988045> >.

VAKALOGLOU, K.; ZERVAS, C. Parvin-ILK: An intimate relationship. **Bioarchitecture**, v. 2, n. 3, p. 91-94, May 1 2012. ISSN 1949-100X (Electronic)

1949-0992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880148> >.

VIKHOREV, P. G. et al. Titin-Truncating Mutations Associated With Dilated Cardiomyopathy Alter Length-Dependent Activation And Its Modulation Via Phosphorylation. **Cardiovasc Res**, Nov 2 2020. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33135063> >.

VOELKEL, T.; LINKE, W. A. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. **Pflugers Arch**, v. 462, n. 1, p. 143-54, Jul 2011. ISSN 1432-2013 (Electronic)

0031-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347754> >.

WALKER, M. A. et al. Superresolution modeling of calcium release in the heart. **Biophys J**, v. 107, n. 12, p. 3018-3029, Dec 16 2014. ISSN 1542-0086 (Electronic)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517166> >.

WANG, L. et al. Alamandine attenuates longterm hypertensioninduced cardiac fibrosis independent of blood pressure. **Mol Med Rep**, v. 19, n. 6, p. 4553-4560, Jun 2019. ISSN 1791-3004 (Electronic)

1791-2997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31059021> >.

WANG, W.; QIAO, Y.; LI, Z. New Insights into Modes of GPCR Activation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 39, n. 4, p. 367-386, Apr 2018. ISSN 1873-3735 (Electronic)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29395118> >.

WARKMAN, A. S. et al. Developmental expression and cardiac transcriptional regulation of Myh7b, a third myosin heavy chain in the vertebrate heart. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 69, n. 5, p. 324-35, May 2012. ISSN 1949-3592 (Electronic)

1949-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22422726> >.

WEINTRAUB, R. G.; SEMSARIAN, C.; MACDONALD, P. Dilated cardiomyopathy. **Lancet**, v. 390, n. 10092, p. 400-414, Jul 22 2017. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28190577> >.

WHITE, D. E. et al. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. **Genes Dev**, v. 20, n. 17, p. 2355-60, Sep 1 2006. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951252> >.

WIDBILLER, M. et al. Shotgun Proteomics of Human Dentin with Different Prefractionation Methods. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 4457, Mar 14 2019. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30872775> >.

WILKINS, M. Proteomics data mining. **Expert Rev Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 599-603, Dec 2009. ISSN 1744-8387 (Electronic)

1478-9450 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929606> >.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (N Y)**, v. 14, n. 1, p. 61-5, Jan 1996. ISSN 0733-222X (Print)

0733-222X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636313> >.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 13, p. 19-50, 1996. ISSN 0264-8725 (Print)

0264-8725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8948108> >.

WU, C. H. et al. Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 38, n. 7, p. e108-e116, Jul 2018. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29950386> >.

WU, H. et al. Epigenetic Regulation of Phosphodiesterases 2A and 3A Underlies Compromised beta-Adrenergic Signaling in an iPSC Model of Dilated Cardiomyopathy. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 89-100, Jul 2 2015. ISSN 1875-9777 (Electronic)

1875-9777 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26095046> >.

WU, Q. et al. Talin1 is required for cardiac Z-disk stabilization and endothelial integrity in zebrafish. **FASEB J**, v. 29, n. 12, p. 4989-5005, Dec 2015. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26310270> >.

WU, R. et al. Correct interpretation of comprehensive phosphorylation dynamics requires normalization by protein expression changes. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 8, p. M111 009654, Aug 2011. ISSN 1535-9484 (Electronic)

1535-9476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551504> >.

YADAV, S. et al. Therapeutic potential of AAV9-S15D-RLC gene delivery in humanized MYL2 mouse model of HCM. **J Mol Med (Berl)**, v. 97, n. 7, p. 1033-1047, Jul 2019. ISSN 1432-1440 (Electronic)

0946-2716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31101927> >.

YANG, Q. L. et al. Gender- and age-related differences in distinct phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy-associated mutation MYBPC3-E334K. **Heart Vessels**, Apr 8 2021. ISSN 1615-2573 (Electronic)

0910-8327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33830315> >.

YAO, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, T. Association of single nucleotide polymorphisms in the 3'UTR region of TPM1 gene with dilated cardiomyopathy: A case-control study. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 44, p. e17710, Nov 2019. ISSN 1536-5964 (Electronic)

0025-7974 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31689804> >.

YOUNG, H. S.; CEHOLSKI, D. K.; TRIEBER, C. A. Deception in simplicity: hereditary phospholamban mutations in dilated cardiomyopathy. **Biochem Cell Biol**, v. 93, n. 1, p. 1-7, Feb 2015. ISSN 1208-6002 (Electronic)

0829-8211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25563649> >.

ZAHR, H. C.; JAALOUK, D. E. Exploring the Crosstalk Between LMNA and Splicing Machinery Gene Mutations in Dilated Cardiomyopathy. **Front Genet**, v. 9, p. 231, 2018. ISSN 1664-8021 (Print)

1664-8021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30050558> >.

ZERVAS, C. G.; GREGORY, S. L.; BROWN, N. H. Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. **J Cell Biol**, v. 152, n. 5, p. 1007-18, Mar 5 2001. ISSN 0021-9525 (Print)

0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238456> >.

ZHANG, L. et al. Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and human. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 133, n. 2, p. 187-97, Feb 18 2005. ISSN 0169-328X (Print)

0169-328X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710235> >.

ZHANG, R. et al. Development of a homogeneous calcium mobilization assay for high throughput screening of mas-related gene receptor agonists. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 1, p. 125-31, Jan 2007. ISSN 1671-4083 (Print)

1671-4083 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184592> >.

ZHAO, L. et al. Comparative evaluation of label-free quantification strategies. **J Proteomics**, v. 215, p. 103669, Mar 20 2020. ISSN 1876-7737 (Electronic)

1874-3919 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31987925> >.

ZHENG, D. D. et al. Mutations in the beta-myosin heavy chain gene in southern Chinese families with hypertrophic cardiomyopathy. **J Int Med Res**, v. 38, n. 3, p. 810-20, May-Jun 2010. ISSN 0300-0605 (Print)

0300-0605 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819418> >.

ZHU, P. et al. Expression and Function of Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D and Its Ligand Alamandine in Retina. **Mol Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 513-527, Jan 2020. ISSN 1559-1182 (Electronic)

0893-7648 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31392515> >.

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 85, n. 11, p. 5288-96, Jun 4 2013. ISSN 1520-6882 (Electronic)

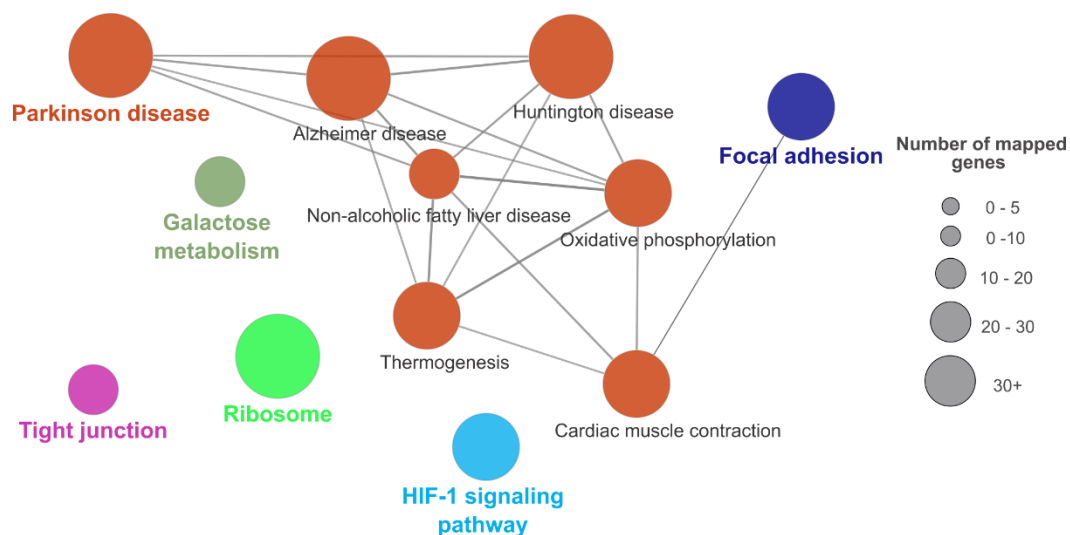
0003-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590404> >.

ZYLKA, M. J. et al. Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 17, p. 10043-8, Aug 19 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909716> >.



Anexo FA2 - Vias enriquecidas nos tecidos cardíacos induzidas pela deleção do gene Mrgd. Rede de interação das vias do banco de dados KEGG utilizando as proteínas reguladas positivamente no proteoma do cmv, ve e ecm. Os nodos representam as vias de sinalização e as arestas mostram a relação entre essas vias. Quanto maior o tamanho do nodo, maior o número de genes encontrados nos datasets e menor o número de p valor. Só estão sendo mostradas vias com pvalor < 0.05.



Anexo FA3 - Vias enriquecidas nos tecidos cardíacos induzidas pela deleção do gene Mrgd. Rede de interação das vias do banco de dados KEGG utilizando as proteínas reguladas negativamente no proteoma do cmv, ve e ecm. Os nodos representam as vias de sinalização e as arestas mostram a relação entre essas vias. Quanto maior o tamanho do nodo, maior o número de genes encontrados nos datasets e menor o número de p valor. Só estão sendo mostradas vias com pvalor < 0.05.