

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

RICARDO CAMBRAIA PARREIRA

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES DA MATRIZ
EXTRACELULAR DO CORAÇÃO DE
CAMUNDONGOS TRATADOS COM
ISOPROTERENOL**

Belo Horizonte – MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

RICARDO CAMBRAIA PARREIRA

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES DA MATRIZ
EXTRACELULAR DO CORAÇÃO DE
CAMUNDONGOS TRATADOS COM
ISOPROTERENOL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia - Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende

Belo Horizonte – MG

2015

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Rodrigo Ribeiro Resende pela recepção em seu laboratório e por oferecer tantas oportunidades que contribuem para minha formação pessoal e profissional. Além disso, agradeço pela relação de amizade construída com todos que fazem parte do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia pela ajuda em todos os momentos de angústia e dificuldade, permitindo assim a superação dos obstáculos;

À Julliane Joviano por ter contribuído com seu conhecimento e habilidade para realização desse trabalho.

À Fenny Hui Fen Tang e todos os colegas do Laboratório de Biologia Vasculuar, que foram fundamentais para finalização do trabalho.

Ao Professor Dr. Ricardo José Giordano, pela paciência, amizade, competência e colaboração no presente trabalho.

Ao Professor Dr. Alfredo Miranda de Goes pelo espaço no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, sendo fundamental para a execução dos experimentos.

À doutoranda Juliana Lott Carvalho pelas informações e conselhos que foram úteis na escolha das metodologias do trabalho.

À UFMG e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia que forneceram toda estrutura e apoio para realização da pós graduação.

RESUMO

A hipertensão está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade na população mundial. Os elevados níveis de pressão sanguínea produzem um intenso estresse tecidual, uma condição progressiva para o desenvolvimento de hipertrofia que compromete a eficiência cardíaca. Os biomarcadores existentes para prever lesões do miocárdio não são capazes de demonstrar outras consequências resultantes dos processos patológicos lesivos, como hipertrofia, inflamação e isquemia e, por isso é necessário a identificação de marcadores que sejam mais específicos às condições estudadas. Com o intuito de encontrar tais marcadores que possam indicar uma situação de hipertrofia cardíaca, desenvolveu-se um modelo animal dessa condição por meio da administração de isoproterenol. Nesse modelo os miócitos murinos são induzidos à apoptose e os fibroblastos aumentam sua produção de colágeno e deposição de proteínas da matriz extracelular, alterando assim o perfil proteico. Para determinação desse perfil, realizou-se um processo de enriquecimento de proteínas denominado descelularização que remove o conteúdo celular e seus remanescentes nucleares, mas mantendo a integridade da matriz. Após o processo de enriquecimento utilizou-se a técnica de *phage display* para determinar a diversidade peptídica presente no tecido cardíaco hipertrófico. Nossos resultados demonstram hipertrofia cardíaca devido ao aumento do peso do coração em relação ao peso corporal e comprimento da tíbia, assim como alterações na frequência cardíaca e pressão arterial condizentes com o uso de isoproterenol. O processo de descelularização teve sua eficiência demonstrada pela quantidade mínima de conteúdo de DNA presente no tecido e pela visualização por meio de histologia e microscopia eletrônica da integridade da matriz destituída de conteúdo celular. A realização do *phage display* permitiu a seleção de peptídeos específicos presentes no músculo cardíaco hipertrófico. Em seguida, obteve-se o sequenciamento dessas moléculas de DNA que codificaram os peptídeos expressos na superfície dos fagos. Essa abordagem abre perspectivas para a descoberta de marcadores que podem prever o desenvolvimento da condição patológica de hipertrofia.

Palavra-chave: hipertensão, hipertrofia, isoproterenol, descelularização, phage display, biomarcadores.

ABSTRACT

Hypertension is associated with high morbidity and mortality rates in the world population. High levels of blood pressure produce intense stress tissue, a progressive condition for the development of cardiac hypertrophy, which affects the efficiency of the heart. The existing biomarkers to predict myocardial lesions are not able to show other harmful consequences resulting from pathological processes such as hypertrophy, ischemia and inflammation, and therefore identification of markers that are more specific to the conditions studied is required. In order to find such markers that may indicate a cardiac hypertrophy situation, we used mice model for this condition which had received isoproterenol. In this model, the myocytes from those mice were induced to apoptosis, and fibroblasts had increased collagen production and extracellular matrix proteins deposition, so modifying protein profile. We used a procedure called decellularization to determine protein profile. This procedure leads to an enrichment of protein contents by removing cell content and its nuclear remnants, while maintaining matrix integrity. After the enrichment procedure, phage display technique was used to determine the diversity of peptide present in hypertrophic cardiac tissue. Our results demonstrated that cardiac hypertrophy due to an increase in heart weight compared to the body weight and tibia's length, as well as changes in heart rate and blood pressure were consistent with the administration of isoproterenol. The decellularization process had its efficiency demonstrated by the minimal amount of DNA content present in tissue and by browsing through histology and electron microscopy of cell integrity devoid of matrix content. After 3 rounds of selection using phage display technique specific peptides were identified in the hypertrophic heart muscle matrix. Then, we have obtained the DNA sequencing of those peptides which were expressed on phage surface. This approach opens up prospects for the discovery of markers that can predict the development of the pathological condition of hypertrophy.

Keyword: hypertension, hypertrophy, isoproterenol, decellularization, phage display, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Componentes da Matriz Extracelular** Modificado de (Santos et al., 2013)
As proteínas estruturais de colágeno (em amarelo) formam fibras que se enrolam em forma de hélice tripla e interagem com as integrinas. Estas moléculas são proteínas de adesão que estão presentes na membrana plasmática e permitem a comunicação entre as células e entre estas e a matriz extracelular. Os proteoglicanos são cadeias de polissacarídeos que se ligam a proteínas e promovem uma maior rigidez à matriz, além de influenciar na permeabilidade do tecido conjuntivo. A fibronectina é uma glicoproteína que pode se ligar as integrinas ou estabelecer ligações com outras moléculas da matriz, como o colágeno. A proteína laminina está associada a membrana basal e interage com as integrinas e outros componentes da superfície da célula, permitindo a ligação das células ao colágeno. 2
- Figura 2 - Processo de Descelularização do VE do coração de camundongo**
Modificado de (de Castro Bras et al., 2013): Comparação entre o ventrículo esquerdo do coração de camundongo contendo todas estruturas e células (A) com o submetido ao processo de descelularização por imersão (B) 7
- Figura 3 - Estrutura química do Isoproterenol** 13
- Figura 4 - Metodologia Brasil (Giordano et al., 2001)** A seleção dos fagos ligantes é realizada por meio de um sistema constituído por uma fase orgânica e outra aquosa. Por meio de centrifugação os fagos que se ligaram aos tecidos/células são fracionados juntamente com a fase orgânica, enquanto os fagos não ligantes permanecem na fase aquosa superior. 20
- Figura 5 - Pressão arterial dos grupos Controle e Tratado** Não há diferenças significativas nos valores de pressão arterial entre o grupo controle dos dias primeiro e sétimo, porém quando se compara o grupo controle do dia primeiro com o grupo tratado do sétimo dia, há diferenças significativas (**). Ao se comparar os valores de pressão dos grupos controle do sétimo dia com o grupo tratado do sétimo dia, observa-se também diferenças significativas (*). $p = 0,9507$; $*p = 0,0204$; $**p = 0,0101$; $n = 10$; (Teste Anova seguido por comparação de Tukey's) 35
- Figura 6 - Frequência cardíaca dos grupos Controle e Tratado** O grupo controle dos dias primeiro e sétimo não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de frequência cardíaca. Entretanto, há diferenças significativas quando se compara o grupo controle do dia primeiro com o grupo tratado do sétimo dia (**). Os valores de frequência cardíaca dos grupos controle do sétimo dia e do grupo tratado do sétimo dia apresentam diferenças significativas (*). $p = 0,9807$; $*p = 0,0492$; $**p = 0,0277$; $n = 10$; (Teste Anova seguido por comparação de Tukey's) 37
- Figura 7 - Relação Pcoração/Pcorporal dos grupos Controle e Tratado** Há uma diferença significativa da relação do Pcoração/Pcorporal entre os grupos controle e tratado, consequência do aumento do peso do coração devido a hipertrofia induzida pelo isoproterenol. $*p = 0.0006$; $n = 10$; (Teste t) 42
- Figura 8 - Relação Pcoração/CompTíbia dos grupos Controle e Tratado** A relação do Pcoração/PcompTíbia apresentou diferenças significativas entre os grupos controle

e tratado. A hipertrofia induzida pelo isoproterenol resultou em aumento do peso do coração. * $p < 0.0001$; $n = 10$; (Teste t) 43

Figura 9 - Avaliação Macroscópica do Coração Descelularizado e Celularizado A) Coração constituído por suas estruturas e células. B) Coração descelularizado com aparência transparente. O processo de remoção do conteúdo celular sem provocar danos a matriz extracelular produz um órgão cardíaco com aparência transparente. . 44

Figura 10 - Análise do conteúdo de DNA no coração descelularizado e com células O coração celularizado possui conteúdo significativo de DNA, enquanto o submetido ao processo de descelularização apresenta valores baixos. * $p = 0,0026$; $n = 3$; (Teste t não-paramétrico)..... 46

Figura 11 - Corte histológico do coração celularizado corado por HE – 20X No corte histológico do coração descelularizado com HE percebe-se ausência de núcleos, indicando que o tecido pode ter perdido células devido ao processo de descelularização. Além disso, observa-se que as fibras colágenas estão íntegras. $n = 10$; Camundongos C57BL/6WT. 48

Figura 12 - Corte histológico do coração descelularizado corado por HE – 20X No corte histológico do coração descelularizado com HE percebe-se ausência de núcleos, indicando que o tecido pode ter perdido células devido ao processo de descelularização. Além disso, observa-se que as fibras colágenas estão íntegras. $n = 10$; Camundongos C57BL/6WT. 49

Figura 13 - Corte histológico do coração descelularizado corado por tricômico de Masson – 20X No corte histológico do coração descelularizado com coloração de tricômico de Masson é possível visualizar que as fibras de colágeno estão coradas de tom arroxeadas. Observa-se que as fibras encontram-se íntegras, indicando que o processo de descelularização não promoveu danos a matriz extracelular do tecido. $n = 10$; Camundongos C57BL/6WT. 50

Figura 14 - Microscopia Eletrônica do coração celularizado – 100X As células cardíacas estão localizadas de forma paralela formando feixes longitudinais que se estendem por todo o corte do tecido. Também é possível visualizar a profundidade do tecido, constituída por células e fibras de colágeno. $n = 10$; Camundongos C57BL/6WT. 52

Figura 15 - Microscopia Eletrônica do coração celularizado – 1000X Em aumento maior pode ser observado com maior detalhe as fibras musculares. Nessa imagem o corte foi realizado de forma transversal, permitindo visualizar a delimitação em torno das fibras. $n = 10$; Camundongos C57BL/6WT. 53

Figura 16 - Microscopia Eletrônica do coração descelularizado – 100X O processo de descelularização foi capaz de eliminar o conteúdo celular e manter a integridade da matriz. Nessa imagem é possível visualizar o arcabouço da matriz extracelular e os vasos sanguíneos de forma íntegra, sem a presença das células cardíacas. $n = 10$; Camundongos C57BL/6WT. 54

Figura 17 - Microscopia Eletrônica do coração descelularizado – 1000X Em maior aumento percebe-se com mais detalhes a estrutura da matriz extracelular, com as fibras de colágenos íntegras e sem conteúdo celular. A integridade da matriz extracelular é

importante para determinação da variedade de moléculas presentes por meio da técnica de *phage display*. n = 10; Camundongos C57BL/6WT. 55

Figura 18 - Enriquecimento de colônias infectadas Titulação das Bibliotecas: $1,86 \times 10^9$. Após os fagos se ligarem ao tecido, este é incubado com a bactéria K91Kan. A infecção dessa bactéria permite que elas sobrevivam no meio de cultura LB sólido, pois o fago apresenta sequência responsável pela resistência ao antibiótico presente no meio. No primeiro *round* não há contagem de colônias devido à grande quantidade de fagos que não são selecionados. A partir do 2º *round* é possível perceber um direcionamento para seleção dos fagos que são específicos para as moléculas presentes no tecido. Isso é demonstrado por meio da redução da quantidade de colônias presentes na cultura. A próxima etapa é verificar um enriquecimento desses fagos selecionados, visto que agora haverá muitas cópias de determinados fagos que foram selecionados na primeira etapa. Esse gráfico demonstra que pelos dois métodos (*Panning* e BRASIL), assim como pelas duas bibliotecas (CX6C e CX8C), há um enriquecimento de colônias, demonstrando o funcionamento da técnica..... 57

Figura 19 - Gel de Agarose do DNA de Fagos Os fragmentos correspondem à sequência de DNA dos fagos amplificados pela PCR. A primeira coluna corresponde ao *lader* (1 Kb) com as respectivas bandas de massa molecular. A coluna marcada com - representa o branco e a coluna número 1 é referente ao fago selvagem. As colunas seguintes correspondem às amostras. Os fagos apresentam os mesmos comprimentos de DNA de 250 pb, diferenciando-se apenas na região do inserto. 59

Figura 20 - Sequenciamento de um fago selecionado no 4º Round do Panning utilizando biblioteca CX8C Realização do sequenciamento de um fago que foi selecionado durante a realização do 4º *round* do *Panning* com a utilização da biblioteca CX8C. A análise do inserto no programa Ridom TraceEdit permite definir a sequência. O inserto está localizado entre duas sequências de cisteína, que correspondem ao TGC das extremidades. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações promovidas pelo tratamento de camundongos com isoproterenol Modificado de (Oudit et al., 2003). Tratamento com isoproterenol em camundongos durante 7 dias. Há alterações significativas nos parâmetros da relação massa do VE/Peso corporal quando se compara os grupos controle e tratado. Observa-se também que a pressão arterial sistólica e média apresentam uma diminuição em comparação ao grupo controle. Essas alterações demonstram alguns dos efeitos do isoproterenol, possibilitando a criação de modelo de hipertrofia bastante referenciado na literatura. * $p < 0.01$ 14

Tabela 2 - Valores dos Parâmetros de Hipertrofia do coração Os valores de peso corporal, peso coração e comprimento tibia são úteis para determinação das relações que são utilizadas como parâmetros de hipertrofia. Esses parâmetros são o $P_{\text{coração}}/P_{\text{corporal}}$ e o $P_{\text{coração}}/CompTibia$, que apresentaram diferenças significativas entre os animais dos grupos controle e tratado. A porcentagem de hipertrofia também é demonstrada na tabela, a partir do cálculo das relações que utilizam os dados de peso corporal, do coração e comprimento da tibia. * $p = 0.0006$; ** $p < 0.0001$; $n = 10$; (Teste t) 40

Tabela 3 - Dados referentes ao sequenciamento dos fagos selecionados pela técnica de *Phage Display* Em processo de patente. A tabela mostra informações a respeito do sequenciamento dos fagos selecionados pela técnica de *Phage Display*. Pode-se observar em qual *Round* os fagos foram selecionados, assim como qual técnica foi utilizada. As sequências dos insertos são apresentadas, juntamente com as respectivas bibliotecas que foram empregadas na metodologia. 61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Concentração dos Reagentes utilizados na PCR convencional.....	30
Quadro 2 - Parâmetros Ciclagem PCR Convencional	31
Quadro 3 - Concentração dos Reagentes para Reação de Sequenciamento.....	31
Quadro 4 - Parâmetros Ciclagem Reação de Sequenciamento.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP - do inglês Atrial natriuretic peptide, Peptídeo Natriurético Atrial

Asp ácido aspártico

BNP - do inglês Brain Natriuretic Peptide, Peptídeo Natriurético Cerebral

BRASIL - do inglês Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands, Seleção e Análise Rápida de Ligantes Interativos

CK - do inglês Creatine Kinase, Creatina Quinase

Cys cisteína

EDTA ácido etilenodiaminotetracético

Fig. – Figura

Figs. - Figuras

IP inibidor de protease

LDH - do inglês, Lactate Dehydrogenase, Lactato Desidrogenase

MEC matriz extracelular

PBS - do inglês Phosphate-Buffer Saline, Tampão Salina de Fosfato

PCR – do inglês Polymerase Chain Reaction, Reação em Cadeia da Polimerase

SDS - do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate, Dodecil Sulfato de Sódio

Ser serina

Tnl - Troponina I

UFC unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
SUMÁRIO	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MATRIZ EXTRACELULAR.....	2
1.2. DESCELULARIZAÇÃO.....	4
1.3. HIPERTROFIA CARDÍACA.....	8
1.3.1 <i>Hipertrofia Fisiológica e Patológica</i>	9
1.3.2 <i>Hipertrofia Patológica: Excêntrica e Concêntrica</i>	9
1.3.3 <i>Hipertrofia Patológica: Fase Compensatória e Descompensada</i>	11
1.3.4 <i>Hipertrofia Induzida por Isoproterenol</i>	12
1.3.5 <i>Biomarcadores</i>	15
1.4. PHAGE DISPLAY.....	17
1.4.1 <i>Biopanning</i>	18
1.4.2 <i>BRASIL</i>	19
1.4.3 <i>Aplicabilidade</i>	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	25
3.2. CAMUNDONGOS	25
3.3. INDUÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA.....	25
3.4. PLETISMOGRAFIA.....	25
3.5. EUTANÁSIA.....	26
3.6. HISTOLOGIA	27
3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA	27
3.8. PARÂMETRO DE HIPERTROFIA	28
3.9. DESCELULARIZAÇÃO.....	28
3.10. EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO	28
3.11. PHAGE DISPLAY	29
3.11.1 <i>Phage-PCR</i>	30
3.11.2 <i>Sequenciamento de produto de phage-PCR</i>	31
3.11.3 <i>Precipitação da reação de Sequenciamento</i>	32

3.11.4 Sequenciamento das Amostras.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. PLETISMOGRAFIA.....	34
4.2. HIPERTROFIA DO CORAÇÃO.....	38
4.3. DESCELULARIZAÇÃO.....	44
4.3.1. Avaliação macroscópica.....	44
4.3.2. Conteúdo de DNA.....	45
4.3.3. Histologia e Coloração HE e Tricômico de Masson.....	47
4.3.4. Microscopia eletrônica.....	51
4.3.5. Phage display.....	56
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) corresponde à fração acelular dos tecidos. Ela é composta por fatores solúveis (fatores de crescimento) e moléculas não solúveis, como as proteínas especializadas (por exemplo, fibrilina, laminina e fibronectina), as proteínas estruturais (por exemplo, colágeno e elastina) e os complexos de glicoproteínas (por exemplo, proteoglicanos) (Rozario and DeSimone, 2010). A fig. 1 representa esses componentes que constituem a matriz extracelular.

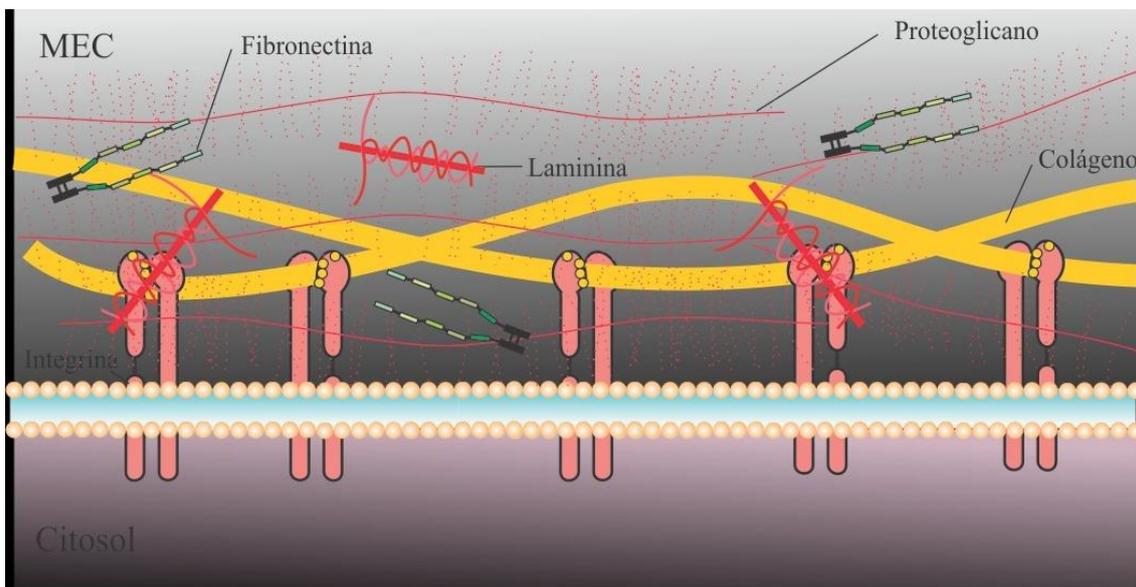


Figura 1 - Componentes da Matriz Extracelular Modificado de (Santos et al., 2013) As proteínas estruturais de colágeno (em amarelo) formam fibras que se enrolam em forma de hélice tripla e interagem com as integrinas. Estas moléculas são proteínas de adesão que estão presentes na membrana plasmática e permitem a comunicação entre as células e entre estas e a matriz extracelular. Os proteoglicanos são cadeias de polissacarídeos que se ligam a proteínas e promovem uma maior rigidez à matriz, além de influenciar na permeabilidade do tecido conjuntivo. A fibronectina é uma glicoproteína que pode se ligar as integrinas ou estabelecer ligações com outras moléculas da matriz, como o colágeno. A proteína laminina está associada a membrana basal e interage com as integrinas e outros componentes da superfície da célula, permitindo a ligação das células ao colágeno.

Por muito tempo, a matriz foi considerada apenas como arcabouço para as células e também como apoio estrutural aos tecidos. Entretanto, hoje se sabe que a matriz interage com as células tanto física quanto quimicamente, e com

isso, influencia o comportamento delas em relação à proliferação, adesão, migração, sobrevivência e secreção proteica (Bornstein and Sage, 2002; Rozario and DeSimone, 2010).

Essa interação se deve ao fato de as células funcionarem como sensores que detectam e respondem às características presentes na MEC, como a composição química, topologia e rigidez/elasticidade, além de responderem a fatores produzidos por outras células, como os fatores parácrinos (Carvalho et al., 2013; Crapo et al., 2011; Discher et al., 2009).

A relação entre as células e a matriz extracelular pode ser exemplificada por meio do direcionamento existente durante o processo de diferenciação das células-tronco cultivadas em superfícies com características diferentes, ou seja, as células se diferenciam em linhagens celulares distintas e apresentam comportamentos que variam de acordo com a elasticidade da superfície (Resende et al., 2014). Isso demonstra que a conformação tridimensional das superfícies constitui fonte de estímulos para as células, influenciando na proliferação e na diferenciação (Discher et al., 2009).

A determinação do conjunto de proteínas codificadas pelo genoma de um organismo é realizada pela análise proteômica, que fornece informações a respeito da função, estrutura e controle dos sistemas biológicos em condições fisiológicas e patológicas (Patterson and Aebersold, 2003). Até os dias atuais, inúmeros estudos de investigação proteômica relacionados a diversas situações clínicas utilizam tecidos lisados que fornecem informações significantes a respeito do perfil proteico celular (Cieniewski-Bernard et al., 2008; Liao et al., 2008; Mayr et al., 2008). Porém, essa abordagem apresenta limitações em detectar as modificações do padrão proteico existente no remodelamento da matriz extracelular, pois o tecido apresenta grande quantidade de proteínas celulares que atrapalham a identificação dos componentes da matriz, que são mais escassos. Isso é ainda mais evidente em tecidos com elevada taxa metabólica, como o coração, que apresenta alto conteúdo de mitocôndrias (de Castro Bras et al., 2013). Além disso, as proteínas da matriz apresentam propriedades bioquímicas (agregação, ligações cruzadas e glicosilação) que

dificultam sua solubilização por meio dos processos de separação e extração utilizados para obtenção do perfil proteico celular (Didangelos et al., 2011).

Com isso, há escassez de estudos proteômicos que visam a detectar proteínas da MEC e do espaço extracelular (Barallobre-Barreiro et al., 2012). Isso limita o conhecimento a respeito da complexidade proteica presente em uma determinada situação clínica, pois a sensibilidade e precisão estão prejudicadas pela limitação de alcance da técnica na detecção de proteínas que estão presentes em pequena quantidade ou que possuem dificuldade de solubilização nos métodos comuns de separação e extração. A solução para este problema pode ser por meio da criação de uma metodologia alternativa que possibilite o enriquecimento das proteínas da MEC, eliminando o máximo de conteúdo intracelular possível, além de não afetar a integridade da matriz do tecido. Com isso, seria possível a detecção das proteínas pelos métodos de análise de perfil proteico.

1.2. Descelularização

A produção de tecidos descelularizados foi iniciada nos anos 80 com o intuito de resolver o processo de rejeição e calcificação nas válvulas e enxertos vasculares transplantados em pacientes com problemas circulatórios (Jones M, 1986). Para se obter a fração correspondente à matriz extracelular foram elaborados protocolos que utilizavam detergentes para tratamento do tecido, a fim de se desestabilizar a camada lipídica, permitindo assim, a eliminação do conteúdo intracelular e dos fosfolípidos que constituem a membrana, além de promover a desnaturação das proteínas celulares (Carvalho et al., 2013; Jones M, 1986). As metodologias mais utilizadas baseiam-se na combinação de fatores ambientais e físico-químicos, como detergentes e agentes quelantes, temperatura e agitação mecânica.

Atualmente, as matrizes extracelulares biológicas destituídas de células estão sendo cada vez mais utilizadas em substituição de órgãos, medicina regenerativa e cirurgias reconstrutivas. Entretanto, a reação do hospedeiro à implantação desses tecidos é dependente da eficácia do processo de descelularização em eliminar o conteúdo celular. Alcançando este objetivo sem

agredir a matriz, os benefícios para a engenharia tecidual e medicina regenerativa são enormes (Crapo et al., 2011).

Para a realização do processo de descelularização dos tecidos de forma eficiente, a fim de produzir os biomateriais para utilização na área de engenharia de tecidos e medicina regenerativa, é necessário eliminar completamente as células presentes no tecido para que o sistema imune do receptor não desenvolva resposta inflamatória (Badylak et al., 2011). A utilização de protocolos com detergentes permitiu a eliminação desse material celular além de não afetar a composição, a integridade mecânica e a atividade biológica da matriz extracelular (Badylak et al., 2011).

O sistema imune é capaz de reconhecer epítomos de proteínas associadas à membrana plasmática e componentes intracelulares, sendo, portanto necessário que ocorra a eliminação eficiente desses componentes. Entretanto, a matriz extracelular apresenta proteínas específicas que poderiam ser imunogênicas, mas devido ao fato de elas serem conservadas evolutivamente, elas não geram resposta imunológica do organismo (Badylak et al., 2011; Carvalho et al., 2013).

Há duas formas de se realizar o processo de descelularização: 1) Perfusão pelo Aparelho de Langendorff e 2) Imersão do Tecido em Soluções para descelularização. A primeira forma consiste em perfusão retrógrada por meio da canulação da aorta, sendo utilizada para isolamento de cardiomiócitos (Louch et al., 2011). Essa técnica necessita de alguns cuidados para que sua eficiência não seja negativamente influenciada, como tamanho da cânula, pressão constante do fluxo da solução de perfusão, utilização de ranhuras na cânula para auxiliar na ligadura da aorta, grande quantidade de soluções para perfusão e treinamento para realização do procedimento.

Já o método de imersão consiste basicamente em incubar o tecido desejado com a solução de descelularização e colocá-los em agitadores que permitem a regulação da temperatura e da velocidade de agitação. Com isso, a quantidade de solução para realização do processo é menor, visto que não há um fluxo de líquido, mas sim uma troca de soluções por tempo determinado. Além disso, não há necessidade de treinamento para canulação, evitando assim

erros que podem surgir nessa etapa, assim como alterações na pressão do fluxo do líquido de perfusão que podem provocar danos à matriz.

A partir dessas informações, optou-se pelo método que apresentava menos interferentes oriundos da habilidade humana, ou seja, a metodologia por imersão. Para sua realização é necessário observar as propriedades dos agentes contidos na solução de descclularização, escolhendo aqueles com capacidade de promover menores danos à matriz extracelular, sem no entanto, permitir que haja resíduos de células.

A utilização de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como agente químico no processo de descclularização é importante devido à capacidade deste em sequestrar íons divalentes, removendo os Ca^{2+} e Mg^{2+} , que são responsáveis por estabilizar proteínas de adesão das células ao colágeno e à fibronectina na matriz (Gailit and Ruoslahti, 1988; Gilbert et al., 2006; Moore et al., 1994). Entretanto, esse agente não é suficiente para remover completamente as células; ele faz isso apenas de forma superficial (Hopkinson et al., 2008).

Para remoção mais profunda é necessária a utilização de SDS (do inglês, sodium dodecyl sulfate, dodecil sulfato de sódio), um detergente iônico que solubiliza as membranas citoplasmática e nuclear. Comparado aos outros detergentes, esse apresenta maior eficiência em eliminar os remanescentes nucleares de células e proteínas citoplasmáticas, como a vimentina, filamento intermediário que compõe o citoesqueleto celular e mantém a posição do núcleo e do fuso mitótico durante ciclo de vida da célula. (Gilbert et al., 2006; Woods and Gratzner, 2005). Esse detergente é, portanto, considerado um diferencial entre a remoção completa e incompleta do núcleo durante o processo de descclularização (Yang et al., 2010). Além de ser mais eficiente do que o Triton X-100, um tipo de detergente não iônico, o SDS também apresenta maior capacidade em preservar a resistência mecânica do tecido (Lumpkins et al., 2008).

Para o processo de descclularização por imersão é conveniente também a utilização de inibidores de proteases (Ser, Cys, Asp e metalopeptidases), como aprotinina e leupeptina. Durante o rompimento das células devido a solubilização das membranas pelo SDS, ocorre liberação de proteases que podem provocar

danos na ultraestrutura da matriz extracelular (Gilbert et al., 2006). Com isso, é interessante utilizar coquetéis de inibidores de proteases, a fim de impedir a degradação de proteínas da matriz.

Na fig. 2 é apresentado um exemplo do resultado de um processo de descelularização por imersão do ventrículo esquerdo de camundongo.



Figura 2 - Processo de Descelularização do VE do coração de camundongo
Modificado de (de Castro Bras et al., 2013): Comparação entre o ventrículo esquerdo do coração de camundongo contendo todas as estruturas e células (A) com o submetido ao processo de descelularização por imersão (B)

As proteínas da matriz permanecem presentes após o método de descelularização; assim esta metodologia contribui para estudos de proteomas envolvendo situações clínicas, pois possibilita que as proteínas da MEC sejam detectadas com mais precisão, visto que o material celular é eliminado (de Castro Bras et al., 2013).

Até pouco tempo, os estudos de investigação proteômica de doenças cardiovasculares focava em proteínas intracelulares devido à dificuldade de detecção de proteínas da MEC em análises proteômicas (de Castro Bras et al., 2013). Por meio desse processo de retirada de células, que não afeta a estrutura biológica do tecido, é possível enriquecer os componentes da matriz extracelular possibilitando um balanço entre a sensibilidade e a precisão quantitativa da complexidade de proteínas do tecido (Barallobre-Barreiro et al., 2012).

Uma condição clínica que pode afetar o perfil proteico da interação existente entre as células e a MEC, alterando o padrão de proteínas, seria o modelo clínico de isoproterenol. Esse modelo é constantemente referido na literatura e promove hipertrofia do coração por meio do aumento do tamanho dos miócitos cardíacos, fibrose intersticial do miocárdio e perivascular, além de estimular produção de colágeno e depósitos de fibronectina e laminina, que são proteínas da matriz extracelular (Boluyt et al., 1995; Grimm et al., 1998; Osadchii, 2007).

Definido o melhor método de enriquecimento das proteínas da matriz extracelular por meio da utilização do processo de descélularização por imersão, como mencionado acima, pode-se avaliar os marcadores presentes na MEC oriundos da indução de hipertrofia pelo isoproterenol.

1.3. Hipertrofia Cardíaca

O sistema cardiovascular é responsável pelo transporte de nutrientes e oxigênio para as células e remoção de metabólitos a partir delas. Além disso, é responsável por estabilizar o pH, transportar e liberar hormônios e peptídeos, assim como manter a homeostase e a temperatura corporal (Boron, 2009).

Esse sistema é composto pelos vasos sanguíneos, sangue e o coração. Os vasos sanguíneos são tubos que se ramificam e conduzem sangue para todo o corpo. O coração é uma bomba pulsátil constituída de quatro câmaras denominadas átrios e ventrículos. As duas câmaras superiores – os átrios - funcionam como compartimentos que bombeiam sangue para os ventrículos. As duas câmaras inferiores, chamadas ventrículos, impulsionam o sangue para circulação pulmonar ou periférica.

Deficiências nos mecanismos que controlam a função cardíaca, como sua contratilidade e ritmo de pulsação, podem produzir patologias cardiovasculares como hipertensão e insuficiência cardíaca (Esler and Kaye, 2000).

Quando ocorre alguma anomalia no funcionamento do órgão cardíaco, as células submetidas a estresses fisiológicos excessivos ou patológicos modulam suas funções e viabilidade por meio de adaptações fisiológicas e morfológicas, como, por exemplo, pelo processo de hipertrofia (Romhilt and Estes, 1968).

1.3.1 Hipertrofia Fisiológica e Patológica

A hipertrofia cardíaca pode ser caracterizada de duas principais formas: a fisiológica e a patológica. A hipertrofia cardíaca fisiológica está relacionada a uma situação que envolve maior demanda energética por tempo determinado, como em casos de gestantes e atletas (Frey and Olson, 2003). Nessa condição ocorre um modesto aumento da espessura da parede do ventrículo, porém não há danos que comprometam a saúde do indivíduo, como acúmulo de colágeno no miocárdio, arritmias e falência do órgão (Frey and Olson, 2003; Ligeti, 1960).

No outro tipo de hipertrofia, chamada patológica, ocorre aumento do volume dos cardiomiócitos, porém essas mudanças são acompanhadas de necrose dos miócitos e fibrose no interstício do miocárdio devido à produção de colágeno e deposição de proteínas da matriz, como fibronectina e laminina (Osadchii, 2007).

O estresse biomecânico que induz a hipertrofia patológica é causado por situações que envolvem aumento de volume e/ou pressão sanguínea, como ocorre na hipertensão e em doenças com perda de função nas válvulas cardíacas (Frey and Olson, 2003).

A situação de hipertensão é um importante fator na progressão para uma hipertrofia patológica, pois essa condição está associada com altas taxas de morbidade e mortalidade na população, sendo considerada um problema de saúde pública. Os elevados níveis de pressão sanguínea nas artérias exigem que o coração realize maior esforço para bombear o sangue através dos vasos sanguíneos. A sobrecarga de pressão gera estresse na parede do ventrículo promovendo um mecanismo de compensação por meio da hipertrofia do músculo cardíaco, caracterizada por crescimento lateral dos cardiomiócitos e deposição dos sarcômeros em paralelo (Dorn et al., 2003).

1.3.2 Hipertrofia Patológica: Excêntrica e Concêntrica

Há duas condições que se desenvolvem na hipertrofia patológica e estão relacionadas à sobrecarga de volume e/ou pressão sanguínea. Na hipertrofia

excêntrica o coração está submetido à uma sobrecarga volumétrica que provoca dilatação da cavidade ventricular. Posteriormente, ocorre um espessamento em menor grau da parede do ventrículo, fazendo com que a geometria do órgão altere de elipsoidal para esférica (Grossman et al., 1975; Weber et al., 1987). Essa condição leva a um desequilíbrio entre a carga/massa do coração, fazendo com que ocorra insuficiência em manter o débito cardíaco necessário para suprir as demandas do organismo.

A hipertrofia concêntrica é resultado de uma sobrecarga de pressão que promove aumento da espessura da parede do ventrículo sem, no entanto, ampliar a cavidade ventricular (Frey et al., 2004). Ao longo do tempo, devido à dificuldade em esvaziar o ventrículo por causa da sobrecarga de pressão, o coração tende a aumentar ainda mais a espessura da parede ventricular, obliterando a saída dessa cavidade e, conseqüentemente, progredindo para insuficiência cardíaca (Katholi and Couri, 2011).

A progressão da hipertrofia não depende apenas da resposta mecânica ao estresse promovido pela sobrecarga da pressão arterial elevada, mas também da influência de citocinas, fatores de crescimento (Díez and Frohlich, 2010) e neuro-hormônios (Hill and Olson, 2008).

Os pacientes que possuem hipertensão associada com hipertrofia ventricular esquerda concêntrica apresentam anormalidade na musculatura das artérias coronárias, acúmulo de fibrose perivascular (Schwartzkopff et al., 1993), aumento do volume dos cardiomiócitos e deposição de matriz extracelular (Drazner, 2011; Spinale, 2007). Essas características, observadas nesses pacientes, são adaptações das células do coração às condições de sobrecarga provocadas pela pressão arterial elevada.

Outras condições que também contribuem para a geração do estresse indutor do remodelamento cardíaco incluem cardiomiopatias hipertróficas, isquemia (Abduch et al., 2009; Du et al., 2010) e excesso de catecolaminas (Choi et al., 2014). Este excesso pode levar à indução de hipertrofia patológica por gerar um estresse que promove adaptações fisiológicas e morfológicas das células e da matriz do tecido cardíaco (Choi et al., 2014). Com isso, surge se a possibilidade de produzir modelos de animais que utilizam da administração

desses compostos químicos a fim de se reproduzir uma condição de hipertrofia similar ao do ser humano.

Essas condições clínicas contribuem para o desenvolvimento de distúrbios hemodinâmicos evolutivos por constituírem fator de sobrecarga para o coração, fazendo com que as células desenvolvam respostas adaptativas ao desempenho do músculo cardíaco sob condições adversas. Entretanto, o processo de hipertrofia apresenta um limite no decorrer do tempo em que o aumento da massa do coração não consegue compensar o aumento da sobrecarga, produzindo assim uma insuficiência cardíaca, ou seja, o músculo cardíaco torna-se incapaz de bombear sangue suficiente para suprir as demandas do metabolismo (Kannel et al., 1987).

1.3.3 Hipertrofia Patológica: Fase Compensatória e Descompensada

Durante o processo de hipertrofia promovido por processo patológico, o órgão desenvolve duas fases: a primeira chamada compensatória, e a segunda, descompensada. A primeira fase corresponde à normalização da relação carga/massa, ou seja, o excesso de carga induz ao aumento da massa do coração promovendo assim a manutenção do débito cardíaco (Luethy et al., 1964; Meerson, 1961).

A fase descompensada representa uma situação de queda do débito cardíaco devido à dilatação excessiva da câmara do ventrículo ou à obliteração da saída do sangue por este compartimento. Apesar de o estímulo para a hipertrofia do coração permanecer, o aumento excessivo da câmara ventricular não permite a manutenção do volume ejetado, provocando assim disfunção e falência cardíaca (Luethy et al., 1964; Meerson, 1961). A outra situação é a câmara ventricular não sofrer dilatação; com isso, a parede espessa do ventrículo resultante da hipertrofia começa a obliterar a saída de sangue por essa câmara (Katholi and Couri, 2011).

1.3.4 Hipertrofia Induzida por Isoproterenol

O coração possui seus próprios sistemas intrínsecos responsáveis pelo seu controle e operação, entretanto o sistema nervoso central é capaz de modificar o desempenho cardíaco por meio da produção de neurotransmissores, como adrenalina, noradrenalina e acetilcolina. O aumento dos níveis circulantes e teciduais de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) resultantes de atividade nervosa simpática aumentada tem sido relacionado à origem de patologias como hipertrofia do coração, hipertensão e insuficiência cardíaca (Esler and Kaye, 2000).

Essa associação se deve ao fato de o coração apresentar células com receptores adrenérgicos na membrana que reconhecem essas catecolaminas. A ativação desses receptores promove um aumento da função cardíaca por elevar a força, a frequência e o débito cardíaco (Benovic et al., 1988; Curi and Procópio, 2009).

O desenvolvimento de patologias cardíacas está relacionado à hiperativação desses receptores que, conseqüentemente, resulta em crescimento patológico do coração por promover remodelamento cardíaco, além de provocar a perda de função do ventrículo, apoptose, disfunção cardíaca e reduzir a expectativa de vida (BEZNAK and HACKER, 1964; Port and Bristow, 2001).

A fim de se compreender os processos envolvidos no desenvolvimento patológico da hipertrofia do coração em humanos, animais têm sido utilizados como modelo para tentar reproduzir com fidelidade os parâmetros característicos do processo patológico em questão.

A partir de informações presentes na literatura, um modelo de hipertrofia do coração utilizado por diversos pesquisadores consiste em administrar isoproterenol por via subcutânea. A utilização dessa metodologia permite a produção, de forma não invasiva, de grande quantidade de amostra em um curto período de tempo (Hasenfuss, 1998), promovendo desenvolvimento de hipertrofia e necrose no coração (RONA et al., 1959), além do fato do modelo ser reprodutível, barato e confiável (Mladenka et al., 2009). A hipertrofia ocorre

devido ao aumento do tamanho dos miócitos cardíacos e da fibrose intersticial do miocárdio e perivascular (Boluyt et al., 1995; Grimm et al., 1998; Osadchii, 2007).

O isoproterenol (fig. 3) pertence à classe de aminas simpaticomiméticas e age como um agonista não-seletivo aos receptores adrenérgicos, predominantemente β_1 e β_2 . A ação vasodilatadora nos músculos lisos dos vasos sanguíneos reduz a resistência vascular periférica, promovendo uma diminuição da pressão arterial diastólica (β_2), porém a pressão arterial sistêmica pode permanecer inalterada devido ao efeito no receptor β_1 .

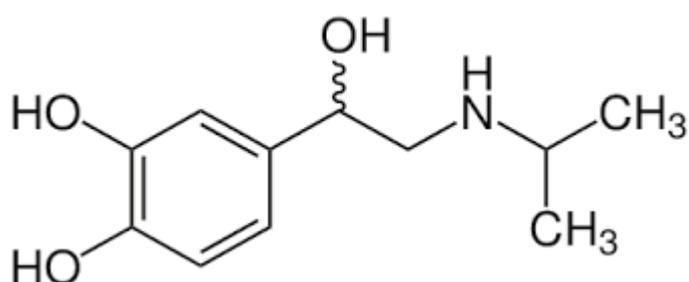


Figura 3 - Estrutura química do Isoproterenol

Este efeito se deve ao fato de o isoproterenol promover no coração aumento de força e frequência devido as suas ações inotrópicas e cronotrópicas positivas e, conseqüentemente, aumentar o débito cardíaco (Golan, 2009).

A tabela 1 representa um modelo de valores referentes às alterações promovidas na indução da hipertrofia dos camundongos pela administração de isoproterenol durante 7 dias.

	Controle	Isoproterenol
Frequência Cardíaca (bpm)	521 ± 13.5	491 ± 17.2
Relação Massa VE/Peso Corporal (mg/g)	3.16 ± 0.18	4.79 ± 0.13*
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	108.3 ± 2.9	75.6 ± 3.3*
Pressão Arterial Média (mmHg)	83.4 ± 3	53.2 ± 2.4*

Tabela 1 - Alterações promovidas pelo tratamento de camundongos com isoproterenol Modificado de (Oudit et al., 2003). Tratamento com isoproterenol em camundongos durante 7 dias. Há alterações significativas nos parâmetros da relação massa do VE/Peso corporal quando se compara os grupos controle e tratado. Observa-se também que as pressões arteriais sistólica e média apresentam uma diminuição em comparação ao grupo controle. Essas alterações demonstram alguns dos efeitos do isoproterenol, possibilitando assim a criação de um modelo de hipertrofia bastante referenciado na literatura. *p < 0.01.

A explicação mais aceita para as mudanças morfológicas provocadas pelo isoproterenol relaciona a hiperatividade miocárdica e a hipotensão dos vasos que irrigam o coração (coronárias), ou seja, a demanda de oxigênio e nutrientes pelo músculo cardíaco é aumentada, mas a baixa tensão nas coronárias leva à diminuição dessa oferta, provocando mudanças bioquímicas e estruturais no tecido cardíaco (Grimm et al., 1998).

As mudanças morfológicas que são constatadas pelo tratamento com isoproterenol incluem o aumento da espessura da parede ventricular e da massa do coração, que são resultados do volume aumentado dos miócitos. Os miócitos que não recebem suprimento adequado são induzidos à apoptose e, com isso, os fibroblastos que compõem o coração aumentam sua produção de colágeno, além de depositar mais proteínas da matriz extracelular, como laminina e fibronectina (Boluyt et al., 1995; Osadchii, 2007; Soonpaa and Field, 1994).

1.3.5 Biomarcadores

Durante o processo de hipertrofia do órgão cardíaco, este expressa novamente genes que são característicos do período embrionário que necessitavam desses estímulos para o desenvolvimento do tecido. A expressão dos genes da alfa-actina esquelética e da cadeia pesada da miosina do tipo beta visam justamente promover aumento da massa muscular do coração a fim de compensar a insuficiência cardíaca (Sütsch et al., 1992). Entretanto, as produções excessivas desses componentes diminuem a velocidade de encurtamento dos sarcômeros, alterando a capacidade contrátil do coração.

Além das proteínas estruturais, alguns genes relacionados ao metabolismo energético (lactato desidrogenase e subunidade β da creatina quinase) e a produção do peptídeo natriurético cerebral (BNP, do inglês Brain Natriuretic Peptide) e atrial (ANP, do inglês Atrial natriuretic peptide) também estão aumentados no processo de hipertrofia (Bing et al., 2002; Iemitsu et al., 2003).

A dilatação ventricular e a sobrecarga de pressão na parede do coração estimulam a produção do BNP, um neuro-hormônio sintetizado pelos átrios e ventrículos (de Lemos et al., 2003). Diversas doenças cardíacas apresentam aumento da concentração desse peptídeo, como acontece na disfunção sistólica ventricular (Paelinck et al., 2006). Porém, situações como insuficiência renal, fibrilação atrial, valvopatias, anemia, sepse, cirrose hepática, hipertireodismo e outras doenças também podem elevar os valores do BNP, demonstrando que este marcador não é específico do coração, e sim marcador de estresse cardíaco (Kim and Januzzi, 2011; Thygesen et al., 2012).

O ANP também é produzido e liberado em condições que promovem estresse mecânico e estiramento das câmaras, como ocorre em pacientes de cardiomiopatias com dilatação grave (French et al., 1988). Entretanto, situações como exercício físico, postura supina, taquicardia, ingestão de líquidos e sódio, hipertensão arterial e outras, também promovem estímulo para liberação do peptídeo, tornando-o inespecífico como biomarcador cardíaco (Espiner, 1994).

A enzima LDH (do inglês, lactate dehydrogenase, lactato desidrogenase) está mais concentrada nos eritrócitos do que no plasma, com isso qualquer situação que promova uma hemólise leve, aumentará a concentração dessa enzima no plasma (Frank et al., 1978). Devido a isso, isoladamente ela não é específica para lesão muscular de nenhum órgão, deixando de ser um biomarcador adequado para infarto do miocárdio.

A creatina quinase (CK) tem sido utilizada para auxílio no diagnóstico de situações de infarto agudo do miocárdio por regular a produção e utilização do fosfato de alta energia em tecidos contráteis (Bessman and Carpenter, 1985). Como as fibras musculares do coração apresentam alto consumo de energia, essa enzima se apresenta em grande concentração no interior das células musculares cardíacas (Hamburg et al., 1991). Porém, essa enzima também se encontra em grande quantidade no músculo esquelético e no cérebro, fazendo com que qualquer lesão nas células destes órgãos resulte em aumento dos níveis séricos de CK. Com isso, a creatina quinase não é um biomarcador adequado para infarto do miocárdio.

A troponina regula a interação cálcio-dependente da miosina com a actina. O componente Troponina I (TnI) inibe a ATPase da actina-miosina e possui 3 isoformas, duas esqueléticas e uma cardíaca. Esta última possui aminoácidos N-terminais que não são expressos nas outras isoformas e, com isso, é detectada imunologicamente por anticorpos monoclonais com baixa reatividade cruzada. Situações que envolvem necrose e destruição das células musculares promovem a liberação dessas isoforma cardíaca na corrente sanguínea, permitindo assim o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (Cummins et al., 1987; Sarko and Pollack, 2002). Embora a detecção do TnI sinalize lesão do músculo cardíaco, algumas situações não são percebidas, como dano isquêmico, inflamação, hipertrofia e apoptose (Aragno et al., 2008; Liu et al., 2014). Com isso, há necessidade de marcadores que indiquem estas condições que ainda não são detectadas pelas metodologias atuais, a fim de que auxiliem na determinação dos processos que estão envolvidos nas patologias cardíacas.

Os marcadores biológicos são importantes para prever lesões ao músculo cardíaco, a fim de atenuar o dano irreversível ou mesmo evitar as lesões. Por isso, há sempre uma busca constante por marcadores que possam auxiliar e complementar as informações já existentes.

A presente dissertação visa justamente analisar as modificações, em termos de marcadores, que a matriz extracelular apresentaria devido ao tratamento com isoproterenol, visto que a indução de hipertrofia promove alterações do tecido cardíaco. A análise desses biomarcadores será feita por meio da técnica de *phage display*, cujas sequências de peptídeos determinadas encontradas na superfície de fagos ligam-se especificamente aos receptores específicos no tecido.

1.4. Phage Display

A técnica de *phage display* permite a identificação da diversidade de peptídeos ligantes em materiais biológicos e não biológicos, sendo considerada uma poderosa ferramenta para seleção de ligantes proteína-proteína. O método baseia-se na utilização de fagos (por exemplo: M13) que apresentam os peptídeos em sua superfície e que, além disso, possuem capacidade de se replicar e montar todas suas estruturas sem provocar a morte da bactéria que foi infectada (Paschke, 2006; Smith, 1985).

A produção de bibliotecas de fagos para realização do *phage display* consiste basicamente em fundir fragmentos de DNA de interesse com sequências do genoma do bacteriófago que codificam proteínas do capsídeo (pIII ou pVIII) do vírus, fazendo com que ocorra na superfície das partículas virais a expressão das moléculas contendo a sequência do inserto (Paschke, 2006).

A biblioteca apresenta duas características que são importantes durante o processo de afinidade dos ligantes aos seus alvos: o título e a diversidade. Durante o processo de eletroporação, a quantidade de sequências únicas de peptídeos que constituem a biblioteca é dependente do número de transformantes que foram obtidas durante o processo, ou seja, a diversidade da

biblioteca está relacionada à quantidade de bactérias que foram capazes de introduzir o genoma do bacteriófago (Resende and Soccol, 2014).

Após a amplificação nas bactérias infectadas, o número de partículas virais totais representa o título da biblioteca. Portanto, o cálculo da titulação é resultado da quantidade de clones obtidos; com isso, seus valores são representados por UFC (unidades formadoras de colônias). Os clones são colônias com cópias únicas de peptídeos que, por se repetirem, superam a diversidade teórica calculada. Essa característica é importante para se determinar o número de cópias de cada peptídeo da biblioteca que está presente na realização da técnica de *phage display* (Resende and Soccol, 2014).

Essa técnica apresenta muitas vantagens em comparação a outros métodos, como os sistemas de levedura híbridos (Mendelsohn and Brent, 1999), pois é simples, apresenta custo baixo, não necessita de equipamentos especiais e sua execução é rápida (Willats, 2002). A técnica de *phage display* permite a criação de bibliotecas com grande diversidade, com fagos que apresentam uma variedade enorme de peptídeos variantes que podem ser utilizadas *in vivo* ou *in vitro* (Hoogenboom et al., 1998; Willats, 2002). A seleção dos peptídeos pode ser realizada em materiais inorgânicos e biológicos (Whaley et al., 2000), com a possibilidade de alterar as condições de estringência e rendimento do processo de ligação dos fagos aos seus ligantes (Hoogenboom et al., 1998; Watters et al., 1997). Além disso, todo esse processo de seleção para rastrear os ligantes presentes no material pode ser realizado em uma semana, enquanto que o sistema de leveduras híbridos leva de duas a quatro semanas (Rodi et al., 2002).

1.4.1 Biopanning

O processo de seleção de ligantes de alta afinidade é denominado *biopanning* e consiste basicamente em incubar a biblioteca de fagos com o alvo. Os fagos com maior afinidade serão selecionados em detrimento dos peptídeos com menor afinidade (Smith and Petrenko, 1997). Após as etapas de lavagens, os fagos aderidos são recuperados por meio de infecção em bactérias com

reamplificação em ciclos de seleção denominados *rounds*, que geralmente são necessários 3 (três) ou 4 (quatro).

Entretanto, frequentemente o intuito é discriminar alvos diferentes e não apenas encontrar ligantes específicos de alta afinidade. Para isso, há uma técnica denominada *pre-clearing* que funciona como uma seleção negativa. Os fagos que apresentam afinidade por controles biológicos são eliminados devido à utilização do sobrenadante dessa incubação na etapa posterior de pesquisa da molécula alvo, ou seja, os fagos específicos se ligam ao tecido controle, e os que não se ligaram permanecem no sobrenadante, que será utilizado na próxima etapa de seleção da molécula alvo (Resende and Soccol, 2014).

Essa técnica pode ser utilizada para identificar marcadores biológicos em células tumorais e infectadas com patógenos ou tecidos que apresentam condições que alteram o padrão de moléculas em comparação com as condições saudáveis.

1.4.2 BRASIL

A fim de melhorar a técnica do *pre-clearing*, uma adaptação foi inovada, chamada de BRASIL (do inglês: *Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*, Seleção e análise rápida de ligantes interativos). Para separar de forma mais adequada e eficiente os fagos que se ligaram ao material controle dos que restaram no sobrenadante, utiliza-se um óleo (constituído de dibutil ftalato:ciclohexano - 9:1) que produz dois ambientes de afinidade, um hidrofóbico e outro hidrofílico (Giordano et al., 2001).

Esse óleo permite a separação, por meio de uma centrifugação diferencial, que direciona as células para uma fase orgânica que não se mistura com a fase aquosa. Com isso, os fagos que se ligaram ao tecido/células são encontrados na fase orgânica inferior, juntamente com o *pellet*, ou precipitado, de células. Já, os fagos não ligantes permanecem na fase aquosa superior, evitando assim as lavagens intensivas e repetitivas que são ineficientes e acabam gerando perdas dos potenciais ligantes de interesse (Giordano et al., 2001). Essa metodologia é representada na fig. 4.

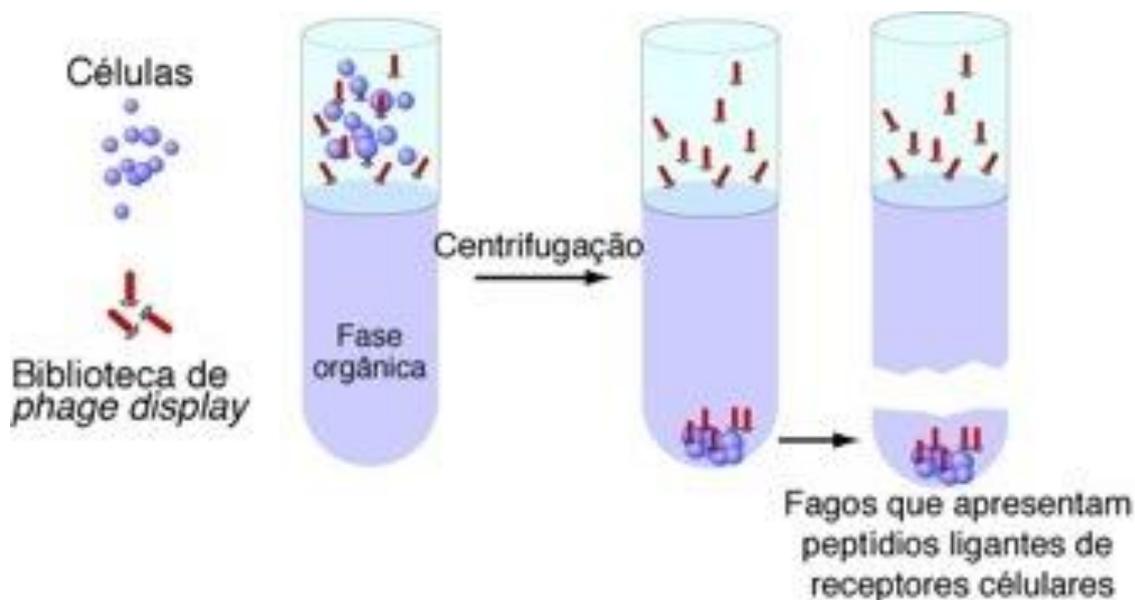


Figura 4 - Metodologia Brasil (Giordano et al., 2001) A seleção dos fagos ligantes é realizada por meio de um sistema constituído por uma fase orgânica e outra aquosa. Por meio de centrifugação os fagos que se ligaram aos tecidos/células são fracionados juntamente com a fase orgânica, enquanto os fagos não ligantes permanecem na fase aquosa superior.

1.4.3 Aplicabilidade

Com base nessas informações, neste trabalho optou-se por utilizar a técnica de *biopanning* com *pre-clearing*, assim como a metodologia BRASIL. Com isso, pode-se avaliar melhor os marcadores biológicos que podem estar presentes no coração hipertrófico, visto que essas duas metodologias visam a promover uma seleção negativa, eliminando aquelas moléculas que estão presentes no coração controle.

As interações proteína-proteína são extremamente importantes em processos moleculares e celulares. A identificação dos pares ligante e receptor ajuda no desenvolvimento de alternativas terapêuticas, caracterização de biomarcadores e na compreensão de fenômenos fisiológicos e patológicos (Corti et al., 2013).

O resultado do mapeamento dos peptídeos específicos pode ser utilizado para o diagnóstico de condições clínicas em sistemas de imagem *in vivo*, por meio do acoplamento dessas moléculas com marcadores radioativos, fluorescentes ou paramagnéticos (Resende and Soccol, 2014). Com isso, a visualização desses marcadores seria realizada por meio de aparelhos de ressonância magnética, tomografia e microendoscopia de fluorescência confocal (Ferro-Flores et al., 2010).

Além dessa aplicabilidade para se ligar a proteínas, a técnica de *phage display* permite identificar outros tipos de compostos como, por exemplo, peptídeos que se ligam especificamente à polímeros biocondutores, nanotubos de carbono, carboidratos e lipídeos (Matsubara, 2012; Resende and Soccol, 2014; Sanghvi et al., 2005; Wang et al., 2011).

Com todo esse alcance, o *phage display* apresenta inúmeras aplicações: pode ser utilizado para mapear epítomos e seus sítios de ligação, pois os peptídeos mimetizam esses ligantes (Rowley et al., 2004); diagnóstico de câncer por meio de seleção de peptídeos tecido-específicos (Arap et al., 2002); criação de agentes quimioterápicos específicos e de baixa afinidade baseados em moléculas isoladas pela técnica (Hajitou et al., 2006) e também em terapia gênica, já que permitiria que os vetores fossem direcionados aos tecidos de interesse (Hajitou et al., 2007). Isto resolveria o problema atual da falta de especificidade que leva aos efeitos indesejáveis dessa terapia.

A utilização da técnica de *phage display* visa a identificar a diversidade de peptídeos nos corações com hipertrofia que podem apresentar diferenças em relação ao tecido cardíaco normal. O uso de isoproterenol que induz aumento da massa muscular promove alterações nas proteínas da matriz extracelular que podem levar a presença de marcadores biológicos específicos e característicos dessa condição patológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é analisar e identificar a presença de marcadores biológicos na matriz extracelular do coração de camundongos tratados com isoproterenol utilizando a técnica de *phage display*.

2.2. Objetivos específicos

- Induzir hipertrofia cardíaca em camundongos machos C57BL/6WT por meio da administração do isoproterenol na dose de 20mg/Kg/dia durante sete dias consecutivos;
- Aplicar um método de descclularização do coração capaz de remover as células sem alterar as propriedades mecânicas e biológicas da matriz extracelular;
- Identificar peptídeos ligantes na matriz extracelular do coração pela técnica de *phage display*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo de número 288/2014. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com o guia para utilização de animais de laboratório.

3.2. Camundongos

Os camundongos machos da linhagem C57BL/6WT foram comprados do Centro de Bioterismo (CEBIO/UFMG) e mantidos no biotério do professor Dr. Alfredo Miranda de Goes, chefe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular na UFMG. Os animais ficaram em gaiolas de polipropileno com dimensões de 49x34x16cm até completarem 12 (doze) semanas. Para cada gaiola foram alocados 10 (dez) animais com acesso livre à água e à ração (Nuvilab). O biotério possui temperatura controlada de 23°C e ciclo de 12/12h escuro/claro. A seleção dos animais para composição dos grupos experimentais (controle e tratado) foi realizada de forma aleatória.

3.3. Indução da hipertrofia cardíaca

Os animais do grupo tratado receberam 20mg/Kg de Isoproterenol diariamente por um período de 7 (sete) dias consecutivos. O Isoproterenol (Sigma-Aldrich®) foi dissolvido em 100µL de PBS (do inglês: *Phosphate-Buffer Saline*, tampão salina de fosfato) e administrado por meio de injeção subcutânea. Os animais do grupo controle receberam aplicação diária de PBS proporcional a sua massa corporal.

3.4. Pletismografia

O método mais utilizado em experimentação animal para monitorização da pressão arterial de forma não invasiva é denominado pletismografia da cauda. Essa técnica é utilizada como forma de triagem da hipertensão arterial,

não exige recursos cirúrgicos, apresenta custo baixo em relação à telemetria e permite aferições repetidas de pressão arterial em experimentos de longa ou curta duração (Kurtz et al., 2005).

Os camundongos foram condicionados por 2 (dois) dias, anteriores a realização do procedimento, por período de 10 (dez) minutos no tubo cilíndrico de acrílico específico da técnica. Essa etapa permite uma adaptação dos animais e estabilização dos parâmetros que serão analisados durante avaliação no dia determinado. Os dias selecionados para realização da pletismografia foram o primeiro e o último dia (sétimo) do tratamento.

O camundongo foi inserido dentro do tubo, com ventilação e temperatura adequadas, e um manguito de borracha foi colocado até a região proximal da cauda, a fim de se avaliar a pressão arterial média. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso que determina a frequência cardíaca. Os sinais captados foram amplificados, convertidos e processados em computador.

3.5. Eutanásia

No oitavo dia os camundongos foram pesados e eutanasiados. Eles receberam heparina (Hemofol, Cristália® 5000UI) por via intraperitoneal e foram submetidos à decapitação sem utilização de anestésico.

Após abertura do tórax, o coração foi retirado e transferido para uma placa de Petri contendo solução de PBS a 4°C. Após seguidas lavagens com PBS para retirada do sangue e excisão dos vasos da base, o coração foi pesado e colocado em microtubo com solução de PBS.

Em seguida, foi também retirada a tíbia para cálculo da relação do peso do coração pelo comprimento da tíbia, com o intuito de avaliar a hipertrofia cardíaca.

3.6. Histologia

Para o preparo das lâminas para avaliação histológica dos tecidos, os corações inteiros foram mantidos em solução fixadora Bouin por 24 (vinte quatro) horas para o tecido criar resistência superficial e permitir o corte histológico. Em seguida, as peças foram desidratadas em séries crescentes de álcool (70 %, 80%, 90% e álcool absoluto) por meia hora cada, diafanizadas em xilol (realizando 3 (três) banhos de 20min) e incluídas em *paraplast*.

Os blocos de *paraplast* contendo os corações foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes com espessura de 5 µm. Os cortes foram montados em lâminas e submetidos aos dois tipos de coloração: hematoxilina e eosina (HE) e tricômico de Masson. A coloração por HE diferencia partes basófilas e acidófilas devido à afinidade dos componentes do tecido pelos corantes hematoxilina e eosina, respectivamente. O HE permite visualizar a presença do núcleo por meio da cor arroxeada e do citoplasma pela cor rósea, contribuindo assim para identificação da presença de núcleo nas células que constituem o tecido. O tricômico de Masson permite a visualização de fibras de colágeno (coloração arroxeada), possibilitando a identificação de áreas com tecido fibroso ou que sofreram lesões, assim como também verificar a integridade das fibras de colágeno.

3.7. Microscopia Eletrônica

As amostras dos tecidos cardíacos foram processadas e analisadas no Centro de Microscopia (CM-UFMG).

Os tecidos foram submetidos ao processamento padrão de fixação primária e fixação secundária com tetróxido de ósmio e ácido tânico, desidratação, fratura em nitrogênio líquido, secagem em ponto crítico de CO₂, montagem e metalização com 5 nm de ouro.

Em seguida, as amostras foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura no Microscópio Eletrônico de Varredura FEG - Quanta 200 FEI.

3.8. *Parâmetro de hipertrofia*

A hipertrofia do coração foi avaliada por meio da relação entre o peso do coração e o peso corporal. Entretanto, essa medida pode apresentar valores falsos, caso o animal perca peso durante o período de tratamento. Para complementar e validar os resultados dessa medida, também foi realizada a relação do peso do coração com o comprimento da tíbia, já que os animais se encontravam na idade adulta e esse osso não sofre alterações devido s flutuações de peso em curto período de tempo.

3.9. *Descelularização*

Os tecidos do coração foram incubados com solução de PBS com 1% de Inibidor de Protease (IP) SIGMAFAST™ Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich®) e agitados em aparelho Thermoshaker Incubator (Nanjing Foinoe Co., Ltd.) para limpeza do sangue presente no tecido. Em seguida retira-se essa solução e coloca-se em solução de 0,05% EDTA 1% IP por 10 min, a 900rpm e 37°C, a fim de remover o conteúdo celular. Após essa etapa, retira-se a solução e adiciona-se solução de 1% SDS mais 1% IP à velocidade de 900rpm e temperatura de 37°C, por cerca de dois dias, sendo a solução renovada de 12 em 12 horas.

Com o tecido já transparente, retira-se a solução de SDS e coloca-se solução de água deionizada, a fim de retirar o detergente. Essa etapa é realizada 3 (três) vezes, por cerca de 30 min cada uma. Por fim, coloca-se em solução de PBS 1% IP e armazena-se em geladeira a 4°C.

3.10. *Extração DNA genômico*

A matriz extracelular do tecido cardíaco foi macerada por meio de pistilo em gral estéril. O conteúdo de DNA das matrizes maceradas foi extraído por

meio de protocolo que utiliza solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (2:1:0,04), cuja finalidade é separar o DNA das proteínas.

Após a adição dessa solução, com inversão do tubo e centrifugação, ocorre a formação de duas fases: orgânica e aquosa. Em seguida, retira-se a fase orgânica, deixando apenas a fase aquosa que contém o DNA. Posteriormente, utiliza-se etanol absoluto para promover a precipitação do DNA e remover o fenol e clorofórmio presentes na amostra. A seguir, adiciona-se etanol 80% para remoção de resíduos de sais, centrifuga-se e ressuspende-se o *pellet* com água DEPC. Finalizado esse processo de extração, o conteúdo de DNA de cada amostra é analisado no espectrofotômetro *Nanovue Plus* (GE *healthcare*[®]).

3.11. Phage display

A técnica de *phage display* foi realizada no Laboratório de Biologia Vasculare do Professor Dr. Ricardo José Giordano, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Os bacteriófagos foram geneticamente modificados para expressarem sequências de peptídeos em sua superfície que permitem a identificação de receptores que se ligam aos ligantes. Os receptores são os alvos a serem encontrados no tecido, enquanto os ligantes são os peptídeos expressos na superfície dos vírus.

O coração descelularizado controle é incubado com a biblioteca de fagos por 30 min sob agitação. Em seguida, o sobrenadante é retirado e incubado com o coração descelularizado tratado por 30 min com agitação. Após essa etapa, retira-se os fagos e incuba o tecido tratado por 30 minutos com bactéria K91Kan para que ocorra a infecção delas com os fagos. As bactérias infectadas são colocadas em meio LB líquido contendo antibiótico durante o período de uma noite, *overnight*, para seu crescimento. No dia seguinte, os fagos são purificados e todas essas etapas são realizadas novamente, totalizando-se quatro *rounds*, ou quatro ciclos. Esse procedimento caracteriza o *Biopanning Pre Clearing*. A diferença para a técnica BRASIL consiste em utilizar o óleo (dibutil

ftalato:ciclohexano - 9:1) para promover a separação dos fagos que se ligaram ao tecido dos que não se ligaram, por meio do gradiente de afinidade hidrofílico e hidrofóbico. Foram realizados também quatro rounds com outras amostras de tecido cardíaco.

As sequências dos ligantes são alinhadas por bioinformática para revelar uma região consenso, que apresenta estrutura primária comparada à molécula alvo.

O processo de seleção dos fagos específicos ocorreu por meio da utilização da metodologia de *biopanning* com *pre-clearing* e pela técnica BRASIL. Após a seleção dos fagos, a bactéria K91kan foi infectada e cada colônia foi selecionada para realização da PCR e sequenciamento, que estão descritas nas seções 3.11.1 até 3.11.4:

3.11.1 Phage-PCR

Os bacteriófagos específicos são recuperados e o DNA é amplificado em vários amplicons, por meio da PCR convencional, para a realização do sequenciamento. Para amplificação dos produtos de DNA, foram utilizadas as concentrações dos reagentes apresentadas no quadro 1:

Quadro 1 - Concentração dos Reagentes utilizados na PCR convencional

Reagentes	Conc. inicial	Conc. Final	Volume
Água ultra-pura			11,5 µL
Tampão com (NH ₄) ₂ SO ₄	10X	1X	2,5 µL
dNTP	2,5 mM	2,5 µM	2,5 µL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2,0 µL
Primer phage forward	10 pmol/µL	0,8 pmol/µL	2,0 µL
Primer phage reverse new	10 pmol/µL	0,8 pmol/µL	2,0 µL
Taq DNA polymerase	5 U/µL	1 U/µL	0,5 µL
Template (1cfu/100µL			2,0 µL

PBS)

Volume Total	25 µL
---------------------	-------

As amostras foram amplificadas em termociclador (Biorad®, modelo T100), utilizando uma desnaturação de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 seg, 60°C por 20 seg, 72°C por 45 seg e a uma extensão final de 72°C por 7 min, conforme apresentado no quadro 2:

Quadro 2 - Parâmetros Ciclagem PCR Convencional

	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94	00:05:00	1
Amplificação	94	00:00:15	} 35
	60	00:00:20	
	72	00:00:45	
Extensão Final	72	00:07:00	1
	4	Infinito	

Após essa etapa, as amostras foram submetidas à eletroforese por gel de agarose 1% para verificar-se os fragmentos apresentavam 250pb, correspondente ao tamanho do inserto.

3.11.2 Sequenciamento de produto de phage-PCR

Após verificar se a PCR ocorreu corretamente, o próximo passo é o sequenciamento do produto da PCR.

O produto da phage-PCR foi diluído em água na proporção 1/16 e com concentração de 28,8ng/µL. Para a reação, foram utilizadas as concentrações apresentadas no quadro 3.

Quadro 3 - Concentração dos Reagentes para Reação de Sequenciamento

Reagentes	Concentração
Água ultra pura	8,75 µL
5X Sequencing buffer	3,0 µL
Big Dye versão 3.1	0,25 µL

Primer fUSE5 reverse new (8 pmol/ μ L) 1,0 μ L

PCR product (28,8ng/ μ L) 2,0 μ L

As amostras foram submetidas à reação para sequenciamento em termociclador (Biorad®, modelo T100), utilizando os seguintes parâmetros descritos no quadro 4:

Quadro 4 - Parâmetros Ciclagem Reação de Sequenciamento

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	00:05:00	1
95	00:00:10	} 35
55	00:00:05	
60	00:01:00	
4	Infinito	0

3.11.3 Precipitação da reação de Sequenciamento

Para precipitação da reação de sequenciamento, acrescenta-se em cada poço da placa 1 μ L de glicogênio, 1 μ L de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 25 μ L de etanol 100% gelado. Mistura-se com a pipeta e incuba-se no gelo por 20 minutos. Centrifuga-se a placa por 4000 RPM por 40 minutos a 4°C. Descarta-se o sobrenadante e lave o *pellet* com 50 μ L de ETOH 70%. Centrifuga-se a 4000 RPM por 40 minutos, a 4°C e descarta-se o sobrenadante. Incuba-se a placa no termociclador (Biorad®, modelo T100) a 95°C por 1 minuto e, em seguida, mantenha a placa a 4°C protegida da luz.

3.11.4 Sequenciamento das Amostras

As amostras foram sequenciadas pelo Serviço de Sequenciamento de DNA (SSDNA) do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (IQ-USP). O equipamento utilizado é um sequenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer/HITACHI.

4. RESULTADOS

4.1. Pletismografia

Os animais foram submetidos à medida indireta da pressão arterial e frequência cardíaca por meio da pletismografia de cauda. O objetivo foi avaliar as alterações promovidas pela utilização do isoproterenol na indução da hipertrofia cardíaca devido as suas ações inotrópica e cronotrópica positivas.

Essas ações promovem o aumento da frequência cardíaca, do débito cardíaco e da ejeção sistólica, porém a pressão arterial média pode não sofrer alterações significativas ou mesmo, apresentar uma diminuição. Na figura 5 são apresentados os valores de pressão arterial (mmHg) do grupo controle no primeiro e sétimo dia, e do grupo tratado no sétimo dia, que correspondem ao período de tratamento com isoproterenol. Os animais controle (n=10) foram tratados com PBS. É possível perceber que não houve diferenças significativas nos valores de pressão arterial entre o grupo controle no primeiro dia ($132,9 \pm 8,98$) e no sétimo dia ($131,4 \pm 12,60$), demonstrando assim que a utilização de PBS não altera a pressão arterial média dos camundongos.

Quando comparados os valores de pressão arterial dos grupos controle do sétimo dia ($131,4 \pm 12,60$) com o grupo tratado do sétimo dia ($117 \pm 9,63$), observa-se que há diferenças significativas, mostrando que o isoproterenol promoveu uma queda da pressão arterial ($\#p = 0,0204$).

Ainda na figura 5 é possível observar também que há diferenças significativas quando se compara o grupo controle do primeiro dia (n=10) com o grupo tratado do sétimo dia (n=10). Os valores de pressão do grupo controle correspondem ao primeiro dia ($132,9 \pm 8,98$) e os valores do grupo tratado são referentes ao sétimo dia ($117 \pm 9,63$). Foi administrado isoproterenol ao grupo tratado durante 7 (sete) dias, e no grupo controle, PBS durante os mesmos 7 (sete) dias ($*p = 0,0101$).

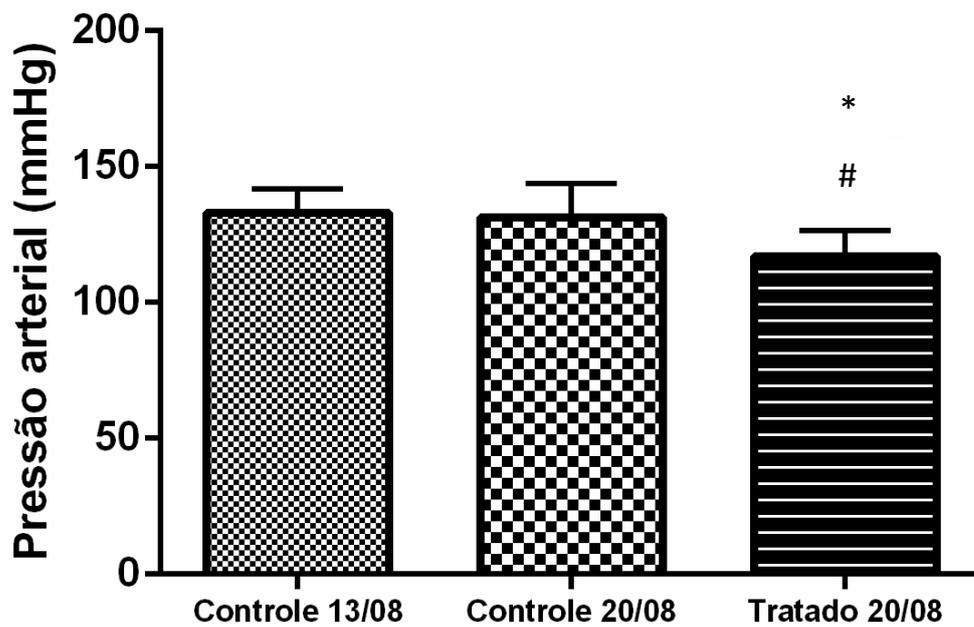


Figura 5 - Pressão arterial dos grupos Controle e Tratado Não há diferenças significativas nos valores de pressão arterial entre o grupo controle dos dias primeiro e sétimo, porém quando se compara o grupo controle do primeiro dia com o grupo tratado do sétimo dia, há diferenças significativas (*). Ao se comparar os valores de pressão dos grupos controle do sétimo dia com o grupo tratado do sétimo dia, observa-se também diferenças significativas (#). # $p = 0,0204$; * $p = 0,0101$; $n = 10$; (Teste Anova seguido por comparação de Tukey's)

Na figura 6 são apresentados os valores da frequência cardíaca (bpm) do grupo controle no primeiro e sétimo dia, além do grupo tratado no sétimo dia. A comparação entre os valores de frequência do grupo controle no primeiro dia ($645 \pm 77,36$) e no dia sétimo ($638,6 \pm 64,63$) não apresentou diferença significativa, ressaltando que o PBS também não promove alterações da frequência cardíaca dos camundongos.

Quando se compara os valores de frequência cardíaca do grupo controle do sétimo dia ($638,6 \pm 64,63$) com o grupo tratado do sétimo dia ($553,7 \pm 78,57$), observa-se que há diferenças significativas, mostrando que o isoproterenol induziu uma queda na frequência dos batimentos cardíacos. ($\#p = 0,0492$).

Observa-se também diferença significativa nos valores da frequência cardíaca (bpm) entre o grupo controle do dia 13/08 ($n=10$) e grupo tratado do dia 20/08 ($n=10$). Os valores de frequência cardíaca do grupo controle correspondem ao primeiro dia ($645 \pm 77,36$) e os valores do grupo tratado são referentes ao sétimo dia ($553,7 \pm 78,57$). Foi administrado PBS ao grupo controle durante 7 (sete) dias, e no grupo tratado, isoproterenol durante os mesmos 7 (sete) dias. ($*p = 0,0277$)

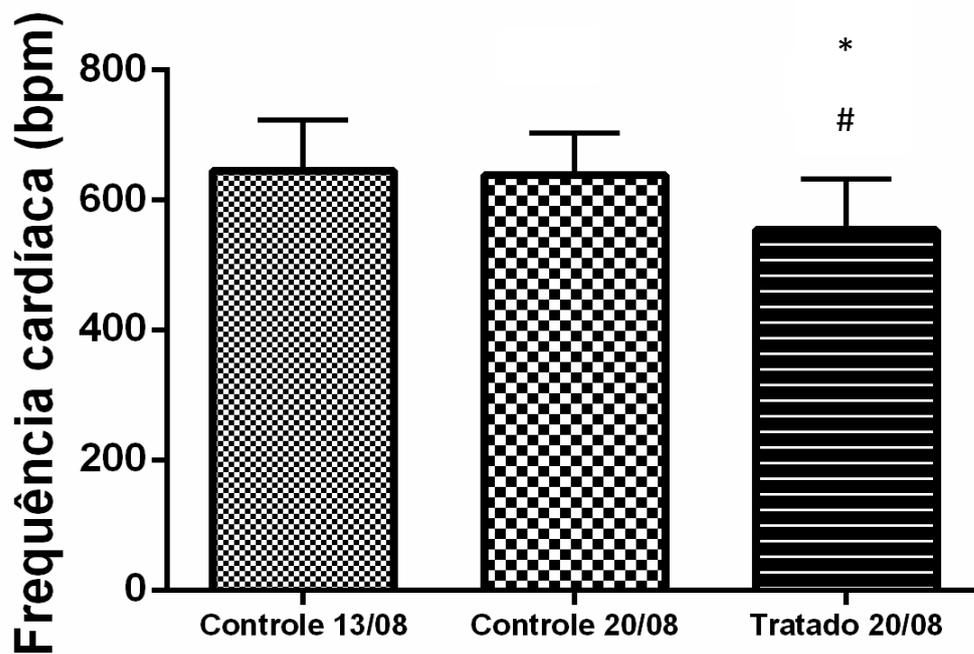


Figura 6 - Frequência cardíaca dos grupos Controle e Tratado O grupo controle dos dias primeiro e sétimo não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de frequência cardíaca. Entretanto, há diferenças significativas quando se compara o grupo controle do dia primeiro com o grupo tratado do sétimo dia (*). Os valores de frequência cardíaca dos grupos controle do sétimo dia e do grupo tratado do sétimo dia apresentam diferenças significativas (#). # $p = 0,0492$; * $p = 0,0277$; $n = 10$; (Teste Anova seguido por comparação de Tukey's)

4.2. Hipertrofia do coração

Com a intenção de avaliar se o processo de indução da hipertrofia foi eficiente, foram analisados alguns parâmetros que relacionam estruturas que são influenciadas pelo tratamento com isoproterenol e estruturas que não sofrem alterações. A massa do coração é influenciada pelo tratamento devido ao remodelamento cardíaco que resulta da indução de hipertrofia. Já a massa corpórea e o comprimento da tibia correspondem aos parâmetros que não alteram devido ao tratamento, funcionando como estruturas padrões.

Na tabela 2 observa-se que o peso corporal dos grupos controle (n=10) e tratado (n=10) não sofreram alterações significativas, sendo, portanto um parâmetro que não se modificou com o tratamento neste experimento. Em muitas situações é comum os animais sofrerem alterações na massa corpórea, levando a incerteza dessa medida como valor não modificável. Para isso, optou-se pela medida do comprimento da tibia, já que no animal adulto não há modificações significativas em suas medidas, podendo assim, funcionar como parâmetro padrão na relação desejada.

Quando o peso do coração (mg) é relacionado com o peso corporal (g), percebe-se que o grupo controle ($5,58 \pm 0,47$) apresenta um valor inferior e significativo em relação ao grupo tratado ($6,65 \pm 0,66$), demonstrando assim um aumento do peso do coração dos animais tratados quando comparados aos animais controles ($*p = 0.0006$). Esse aumento do peso cardíaco deve-se ao remodelamento provocado pela indução de hipertrofia do isoproterenol, sendo possível também notar um aumento do tamanho do coração por meio de observação macroscópica.

Ao avaliar a relação de peso do coração (mg) pelo comprimento da tibia (cm), também mostrado na tabela 2, observa-se que o grupo controle ($84,88 \pm 5,43$) apresenta valor menor e significativo em relação ao grupo tratado ($99,34 \pm 7,14$) ($**p < 0.0001$). Esses dados reforçam os resultados obtidos na relação do peso corporal/peso do coração, demonstrando um aumento efetivo do peso do coração do grupo tratado.

Em termos percentuais de hipertrofia do coração (tabela 2), percebe-se que há uma hipertrofia de $19,61 \pm 12,61\%$, utilizando dados da relação peso coração/peso corporal. Já com os dados da relação peso coração/comprimento tíbia, a hipertrofia foi de $17,21 \pm 7,58\%$.

A tabela 2 também apresenta os dados referentes ao peso do coração. O grupo controle apresentou valores de $146 \pm 11,79$, enquanto que o grupo tratado, de $170,9 \pm 15,18$. Esses dados demonstram a diferença que existe entre o peso do coração dos dois grupos, valores esses utilizados para o cálculo das relações. A necessidade de relacionar esses valores com medidas padrões se deve ao fato de ocorrer interpretações errôneas justamente pela variação do peso corporal do animal durante o tratamento.

Para contornar os problemas de variação do peso e tamanho do animal, utiliza-se a medida do comprimento da tíbia, dados esses mostrados também na tabela 2. Como o animal encontra-se em fase adulta, esse osso não sofre modificações significantes em curto prazo (1 semana). Além disso, essa estrutura não varia suas medidas com as alterações do peso durante o tempo determinado para tratamento.

Grupos	Peso Corporal (g)	Peso Coração (mg)	Comprimento Tíbia (cm)	Quantidade de animais
Controle	26,2 ± 1,36	146 ± 11,79	1,72 ± 0,091	10
Tratado	25,77 ± 1,61	170,9 ± 15,18	1,72 ± 0,078	10

Grupos	Relação Pcoração(mg)/Pcorporal(g)*	Relação Pcoração(mg)/Comp. Tíbia(cm)**	% Hipertrofia Pcoração(mg)/Pcorporal(g)	% Hipertrofia Pcoração(mg)/Comp.Tíbia(cm)
n =10 /Controle	5,58 ± 0,47	84,88 ± 5,43	19,61	17,21
n =10 /Tratado	6,65 ± 0,66	99,34 ± 7,14	± 12,61	± 7,58

Tabela 2 - Valores dos Parâmetros de Hipertrofia do coração Os valores de peso corporal, peso coração e comprimento tíbia são úteis para determinação das relações que são utilizadas como parâmetros de hipertrofia. Esses parâmetros são o Pcoração/Pcorporal e o Pcoração/CompTíbia, que apresentaram diferenças significativas entre os animais dos grupos controle e tratado. A porcentagem de hipertrofia também é demonstrada na tabela, a partir do cálculo das relações que utilizam os dados de peso corporal, do coração e comprimento da tíbia.

* $p = 0.0006$; ** $p < 0.0001$; $n = 10$; (Teste t)

A figura 7 mostra que há diferença significativa entre os valores da relação peso coração (mg)/peso corporal (g). Observa-se que o valor da relação do grupo controle ($5,58 \pm 0,47$) é menor do que o grupo tratado ($6,650 \pm 0,66$), ressaltando que há um aumento do peso do coração. ($*p = 0.0006$)

Os resultados da relação peso coração (mg) / comprimento tibia (cm) representados na figura 8 demonstram que há diferença significativa entre os grupos. Percebe se que o valor da relação do grupo controle ($84,88 \pm 5,43$) é menor do que o grupo tratado ($99,34 \pm 7,14$), resultado do aumento do peso do coração ($*p < 0.0001$)

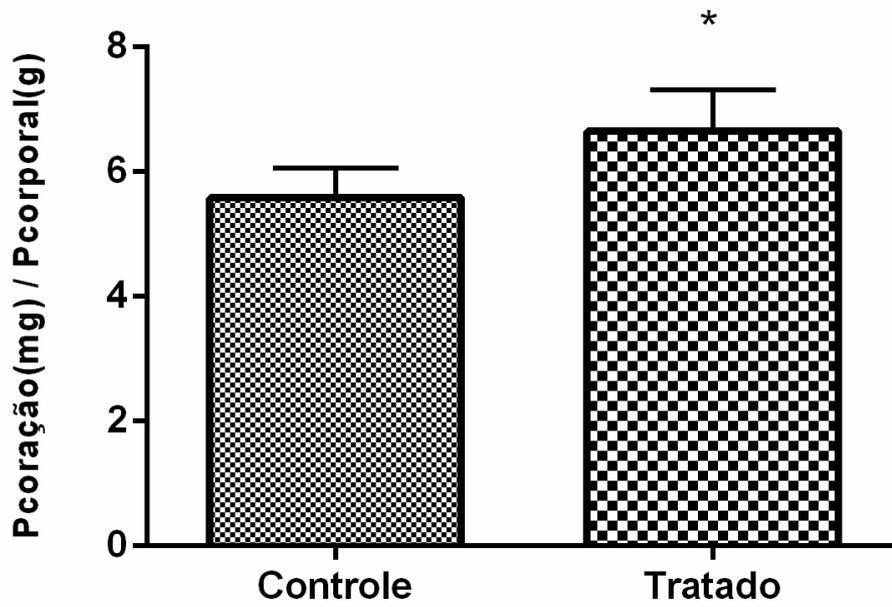


Figura 7 - Relação Pcoração/Pcorporal dos grupos Controle e Tratado Há uma diferença significativa da relação do Pcoração/Pcorporal entre os grupos controle e tratado, consequência do aumento do peso do coração devido a hipertrofia induzida pelo isoproterenol. * $p = 0.0006$; $n = 10$; (Teste t)

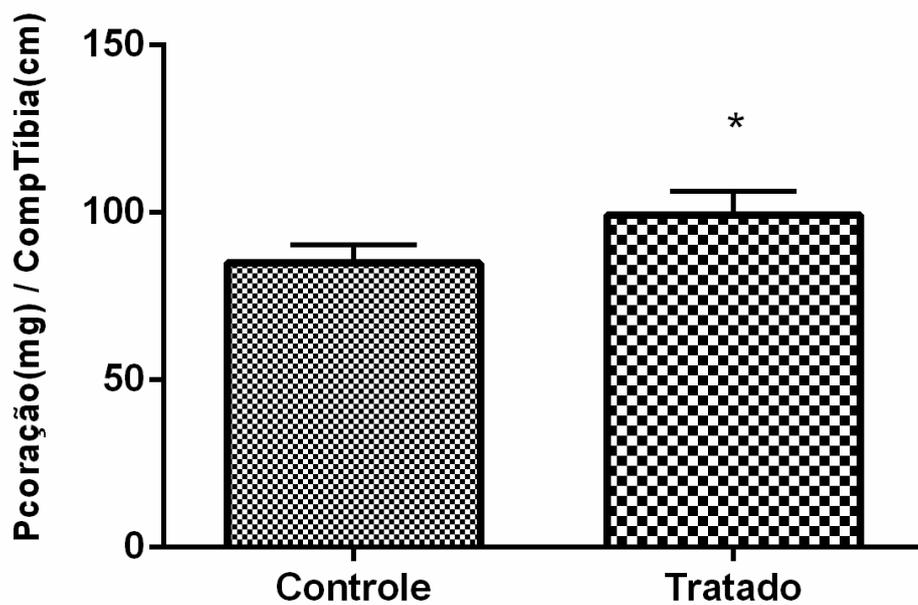


Figura 8 - Relação Pcoração/CompTibia dos grupos Controle e Tratado A relação do Pcoração/PcompTibia apresentou diferenças significativas entre os grupos controle e tratado. A hipertrofia induzida pelo isoproterenol resultou em aumento do peso do coração. * $p < 0.0001$; $n = 10$; (Teste t)

4.3. Descelularização

4.3.1. Avaliação macroscópica

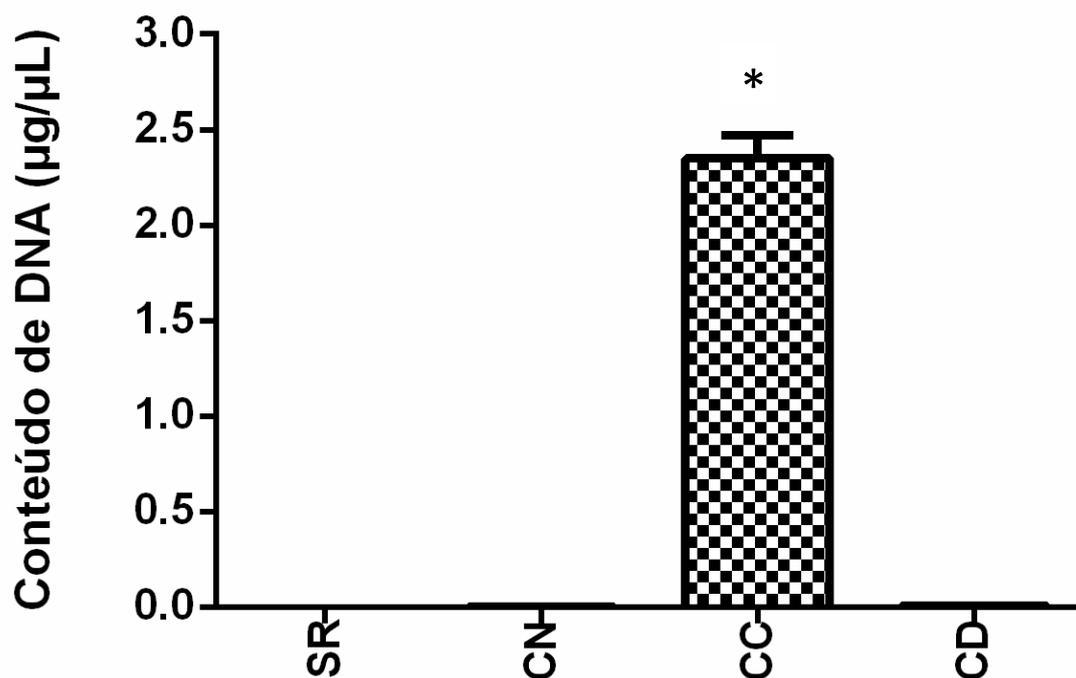
O processo de descelularização consiste em eliminar o conteúdo celular do tecido sem afetar a composição, a integridade mecânica e a atividade biológica da matriz extracelular. O tecido é tratado com SDS que desestabiliza a camada lipídica eliminando o conteúdo celular e os fosfolípidos, além de desnaturar proteínas celulares. Com isso, o material torna-se um tecido de aparência transparente, que auxilia na determinação da eficiência do processo de descelularização. Na fig. 9 é representada uma imagem composta de dois corações: um é composto por todas estruturas e células, e outro foi submetido ao processo de remoção de conteúdo celular pela técnica de descelularização. O coração com todas suas estruturas e células é mostrado na fig. 9A), enquanto a fig. 9B) representa o tecido descelularizado com uma aparência transparente, devido a eliminação do conteúdo de células.



Figura 9 - Avaliação Macroscópica do Coração Descelularizado e Celularizado A) Coração constituído por suas estruturas e células. B) Coração descelularizado com aparência transparente. O processo de remoção do conteúdo celular sem provocar danos a matriz extracelular produz um órgão cardíaco com aparência transparente.

4.3.2. Conteúdo de DNA

Além da avaliação macroscópica, também realizamos uma análise de conteúdo de DNA do coração celularizado (n=3) e descelularizado (n=3). Como o processo de descelularização elimina o conteúdo de células no tecido, a quantidade de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) presente no tecido é reduzida substancialmente. Na figura 10 podemos observar que o coração celularizado apresenta uma quantidade significativa de conteúdo de DNA ($2,352 \pm 0,1697$) em comparação ao coração descelularizado, que possui valores baixos ($0,008 \pm 0,002$).



SR: solução de ressuspensão

CN: controle negativo

CC: coração celularizado

CD: coração descelularizado

Figura 10 - Análise do conteúdo de DNA no coração descelularizado e com células O coração celularizado possui conteúdo significativo de DNA, enquanto o submetido ao processo de descelularização apresenta valores baixos. * $p = 0,0026$; $n = 3$; (Teste t não-paramétrico)

4.3.3. Histologia e Coloração HE e Tricômico de Masson

Cortes histológicos do coração celularizado e descélularizado foram realizados para demonstrar a presença de células musculares e fibras de colágeno no tecido. Os cortes foram submetidos aos dois tipos de coloração: HE e tricômico de Masson. A coloração com HE permite visualizar a presença de núcleo por meio da cor arroxeado e do citoplasma pela cor rósea no coração celularizado, como demonstrado na fig. 11. Já no coração descélularizado, percebe-se ausência dos núcleos em tons arroxeados, sendo possível visualizar apenas a região que envolve as células, composta principalmente por fibras colágenas. Veja fig. 12.

Para visualizar de forma mais específica essas fibras, realizamos coloração de tricômico de Masson, que apresenta afinidade pelas fibras de colágeno, corando-a de cor roxa. Essa coloração então permite verificar a integridade das fibras devido à afinidade por elas, ressaltando se o método de descélularização que o tecido foi submetido promoveu danos ao tecido. Na fig. 13 é possível observar essas características. A integridade da matriz extracelular é importante para que as proteínas presentes não sejam prejudicadas, dificultando o processo de avaliação pela técnica de *phage display*.

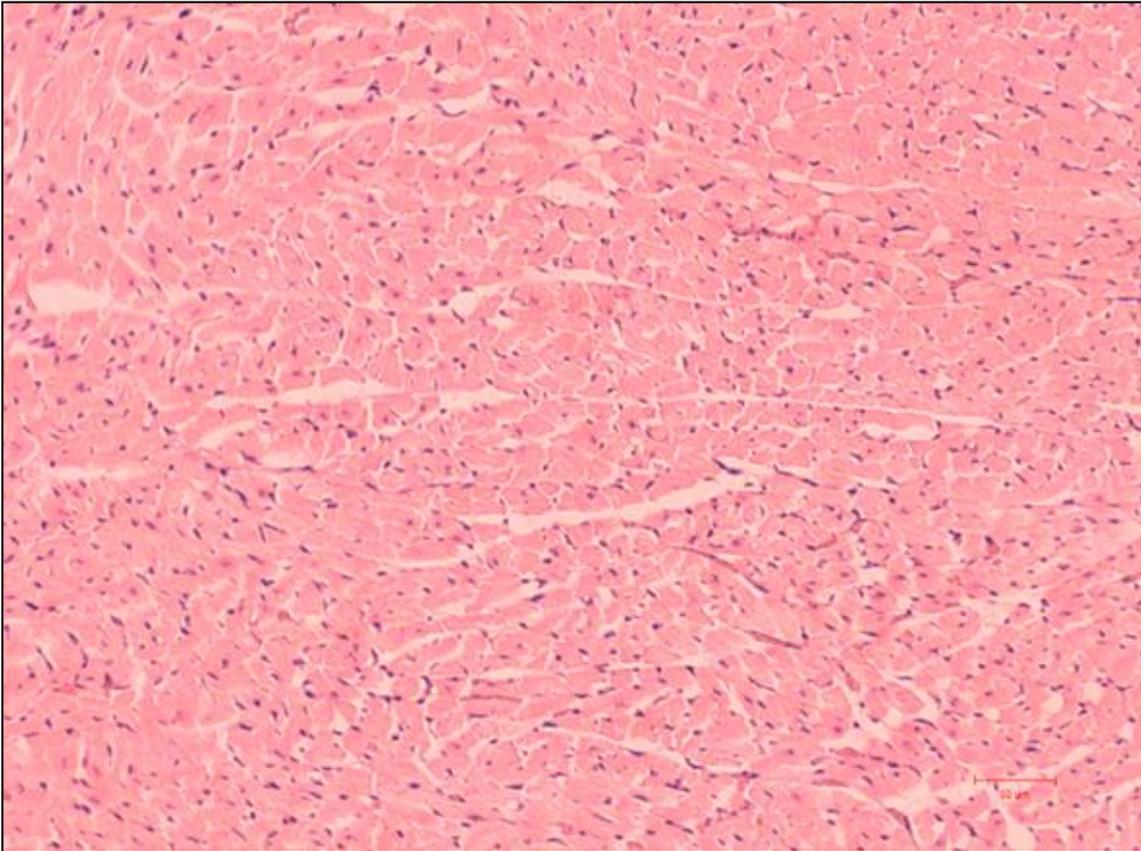


Figura 11 - Corte histológico do coração celularizado corado por HE – 20X No corte histológico do coração descélularizado com HE percebe-se ausência de núcleos, indicando que o tecido pode ter perdido células devido ao processo de descélularização. Além disso, observa-se que as fibras colágenas estão íntegras. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

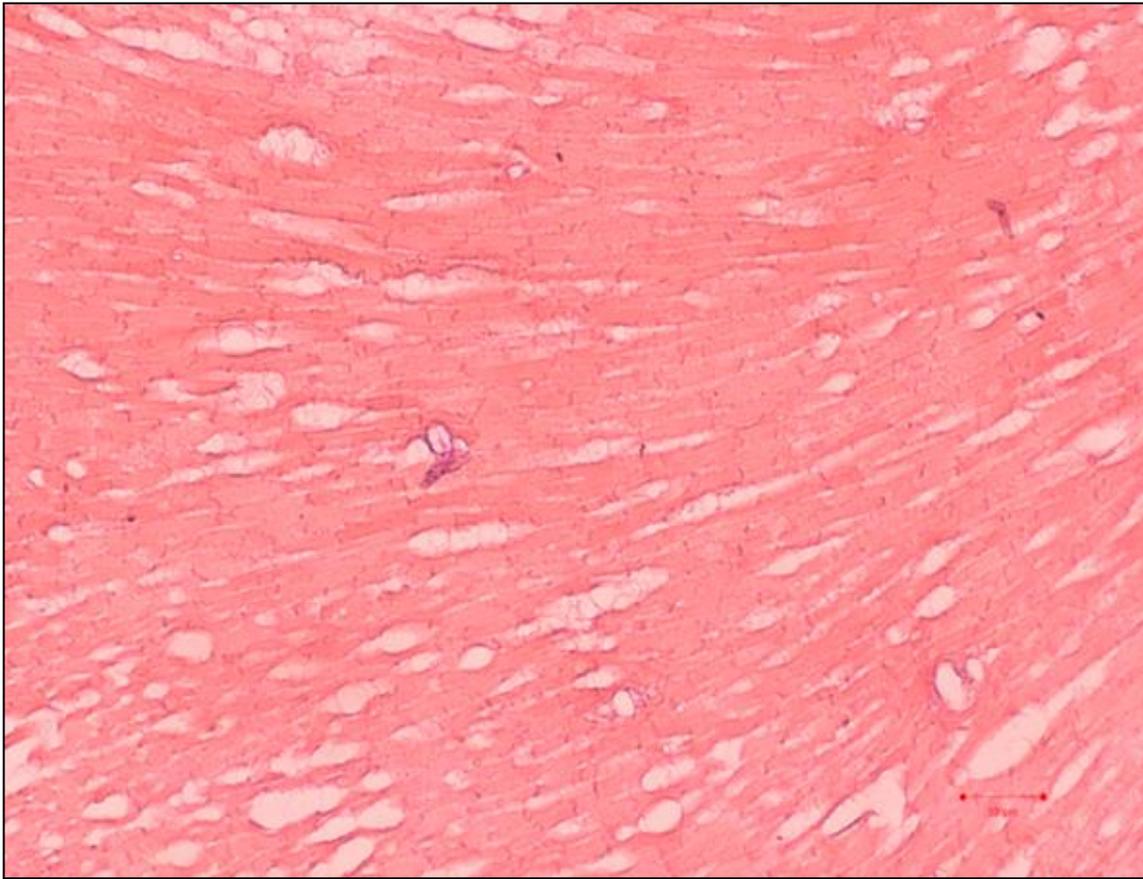


Figura 12 - Corte histológico do coração descelularizado corado por HE – 20X No corte histológico do coração descelularizado com HE percebe-se ausência de núcleos, indicando que o tecido pode ter perdido células devido ao processo de descelularização. Além disso, observa-se que as fibras colágenas estão íntegras. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

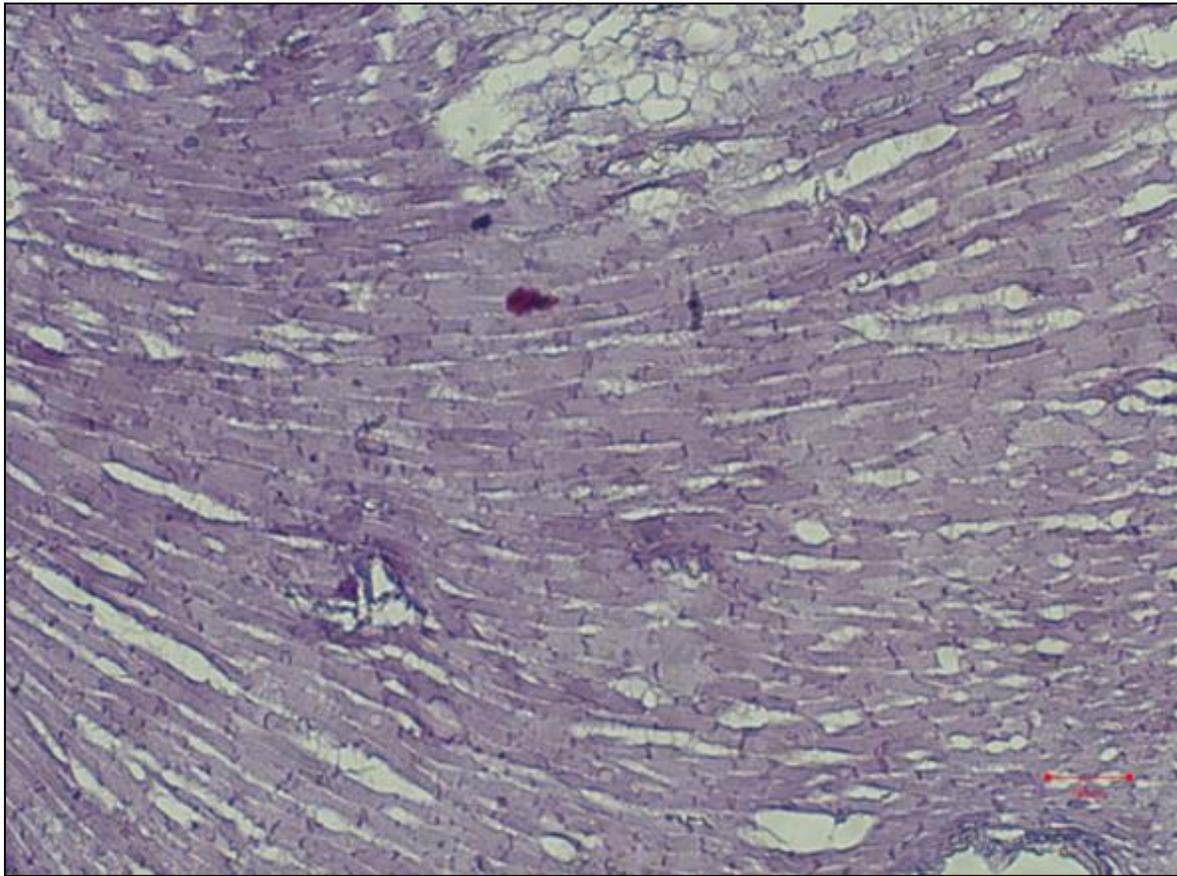


Figura 13 - Corte histológico do coração descclularizado corado por tricômico de Masson – 20X No corte histológico do coração descclularizado com coloração de tricômico de Masson é possível visualizar que as fibras de colágeno estão coradas de tom arroxeadas. Observa se que as fibras encontram se íntegras, indicando que o processo de descclularização não promoveu danos a matriz extracelular do tecido. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

4.3.4. Microscopia eletrônica

Com o intuito de demonstrar a topografia de superfície e as variações espaciais do tecido com células e do que foi submetido ao processo de descelularização, realizou-se microscopia eletrônica de varredura. Essa técnica utiliza um feixe de elétrons que reflete na amostra permitindo obter informações a respeito da microestrutura do tecido, produzindo imagens de alta resolução da superfície.

A microscopia eletrônica do tecido com células representada na fig 14 mostra as células cardíacas em forma de feixes em disposição longitudinal. Percebe-se também a profundidade do tecido, constituído por células e fibras de colágeno.

A fig 15 corresponde à microscopia eletrônica das células musculares cardíacas em corte transversal. É possível observar os limites em torno de cada fibra muscular.

O corte de microscopia eletrônica do coração descelularizado é representado nas figuras 16 e 17. Percebe-se que as células que se encontravam aderidas a matriz não estão mais presentes, constatando a presença do arcabouço da matriz extracelular e de vasos sanguíneos. Por meio da figura podemos verificar que o processo de descelularização alcançou o objetivo de retirar o conteúdo celular, sem, no entanto, danificar a matriz extracelular. Assim, como os resultados demonstrados pela análise de conteúdo de DNA, histologia com HE e tricômico de Masson, a matriz extracelular permaneceu com suas fibras de colágeno íntegras, além de não apresentarem mais conteúdo celular.

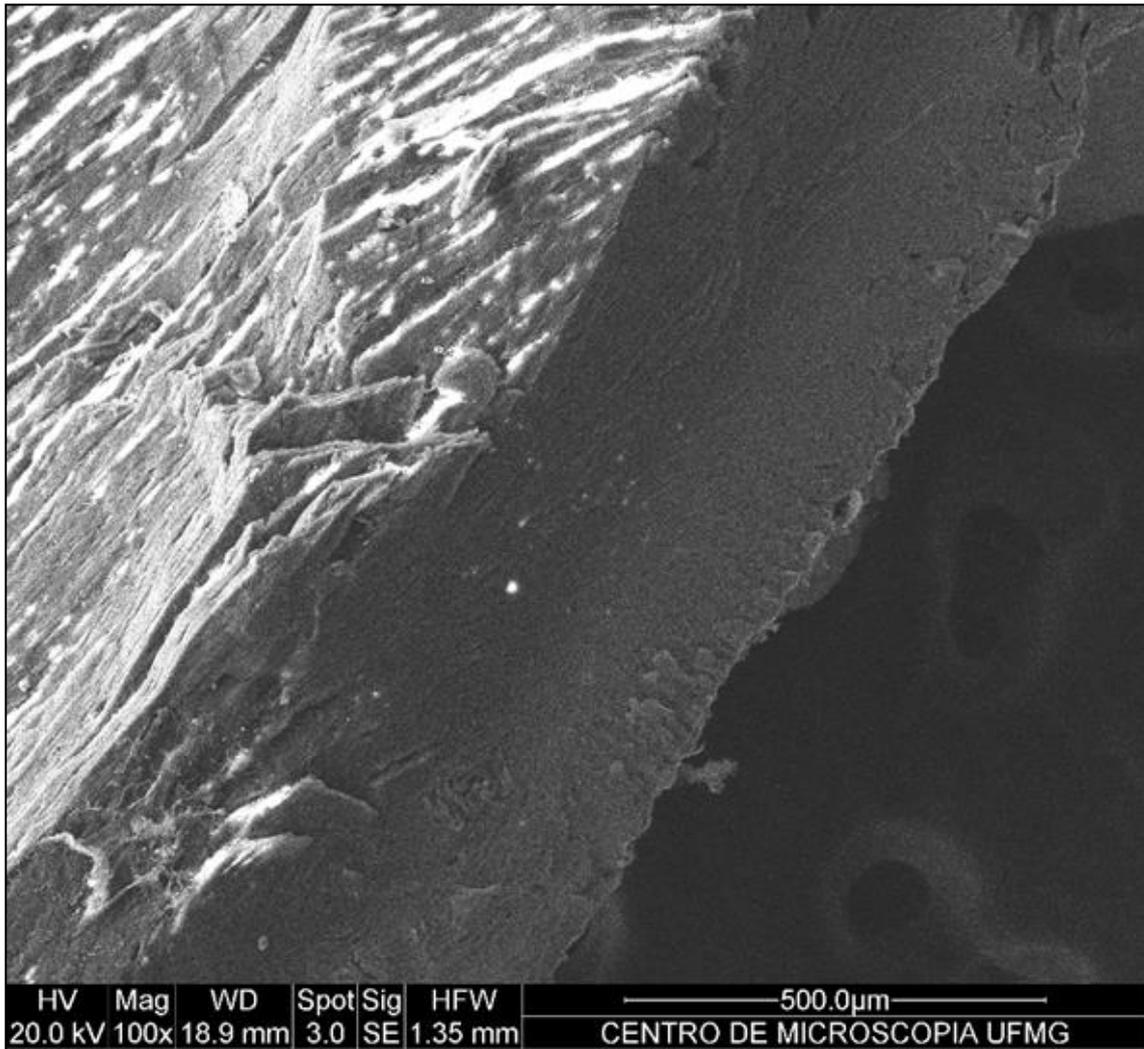


Figura 14 - Microscopia Eletrônica do coração celularizado – 100X As células cardíacas estão localizadas de forma paralela formando feixes longitudinais que se estendem por todo o corte do tecido. Também é possível visualizar a profundidade do tecido, constituída por células e fibras de colágeno. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

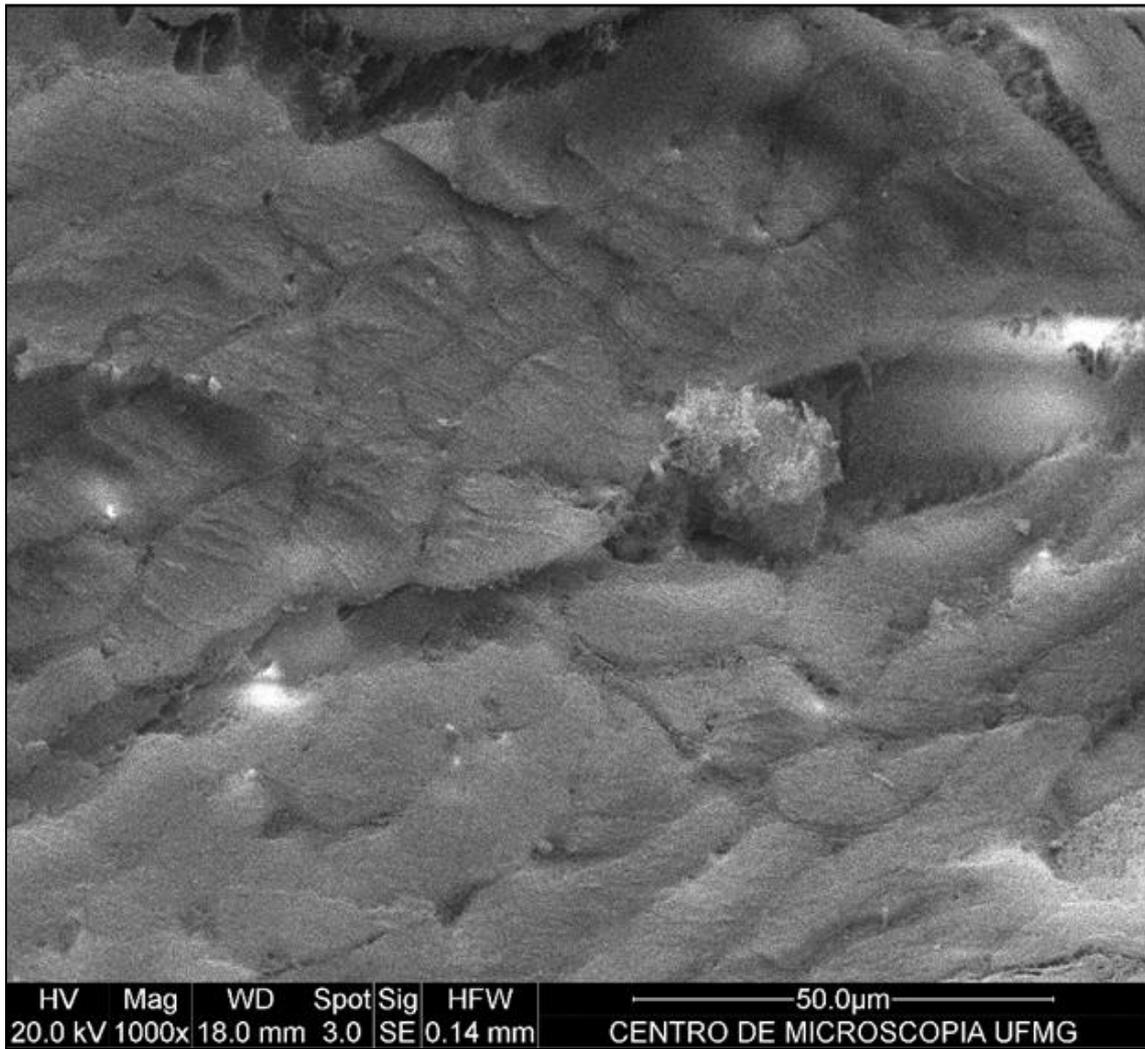


Figura 15 - Microscopia Eletrônica do coração celularizado – 1000X Em aumento maior pode ser observar com maior detalhe as fibras musculares. Nessa imagem o corte foi realizado de forma transversal, permitindo visualizar a delimitação em torno das fibras. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

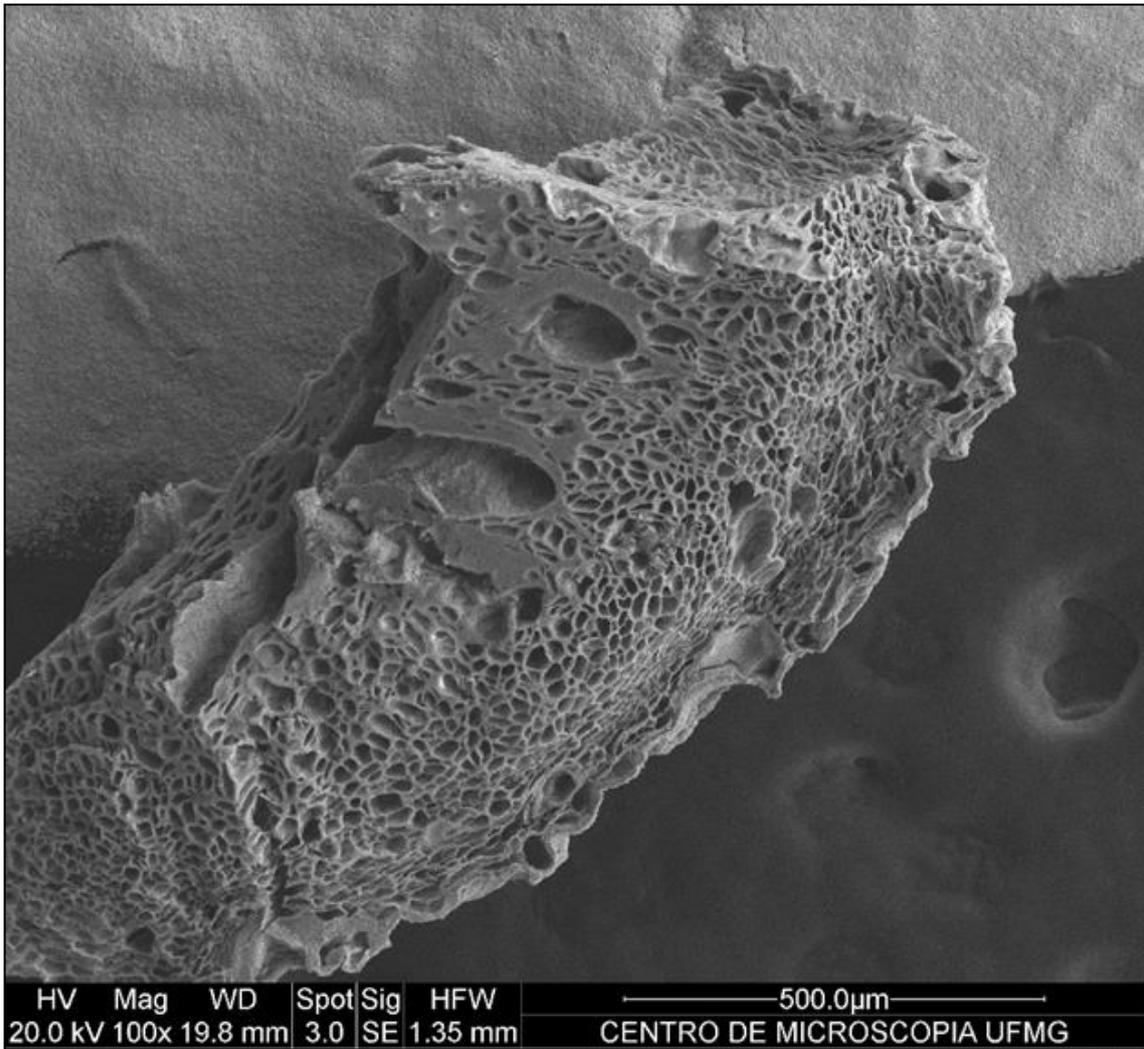


Figura 16 - Microscopia Eletrônica do coração descellularizado – 100X O processo de descellularização foi capaz de eliminar o conteúdo celular e manter a integridade da matriz. Nessa imagem é possível visualizar o arcabouço da matriz extracelular e os vasos sanguíneos de forma íntegra, sem a presença das células cardíacas. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

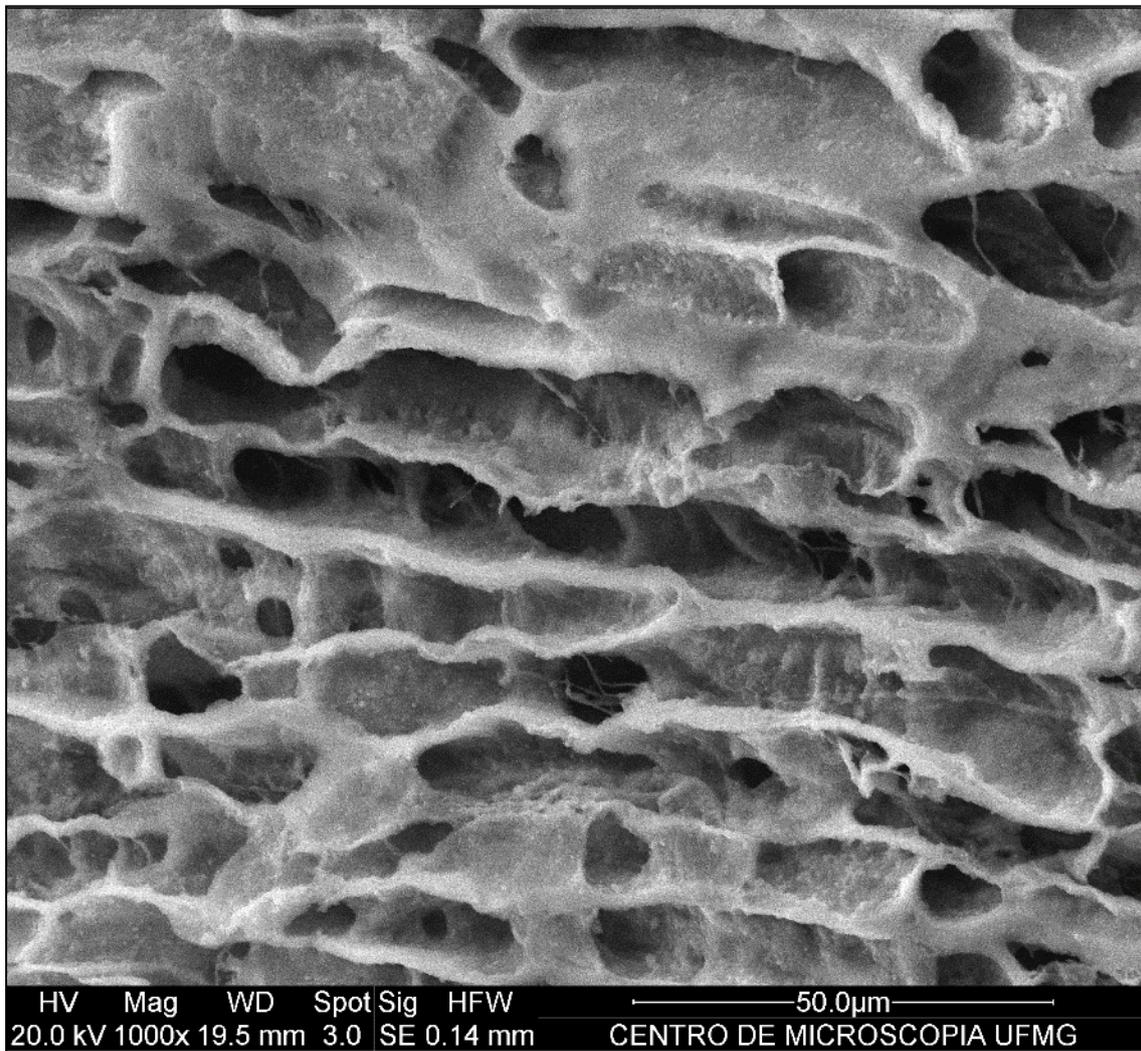


Figura 17 - Microscopia Eletrônica do coração descelularizado – 1000X Em maior aumento percebe com mais detalhes a estrutura da matriz extracelular, com as fibras de colágenos íntegras e sem conteúdo celular. A integridade da matriz extracelular é importante para determinação da variedade de moléculas presentes por meio da técnica de *phage display*. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

4.3.5. Phage Display

Os fagos expressando peptídeos aleatórios (bibliotecas de fagos CX8C e CX6C) são colocados com o tecido dos animais controle para se ligarem aos ligantes específicos. Em seguida, o sobrenadante dessa amostra é colocado com o tecido tratado, ou seja, os peptídeos que não se ligaram ao controle e forem específicos para o tratado se ligarão a ele. Após isso, incuba-se o tecido com bactérias K91Kan para que ocorra infecção. Cada etapa dessa é denominada *round* e um total de 4 foram realizados. Essa técnica é chamada de *pre-clearing* e foi utilizada juntamente com o *panning*, que corresponde aos ciclos de repetição dessas etapas.

O resultado abaixo representa justamente o enriquecimento das colônias de bactérias que foram infectadas com os fagos que possuem afinidade por ligantes no tecido. Nos primeiros *rounds* é observado que há uma redução no número de colônias, resultado do processo de seleção dos fagos com sequências que apresentam afinidade pelos ligantes presentes no órgão. Esses fagos se reproduzem no interior das bactérias e, após a seleção durante os primeiros *rounds*, percebe-se um aumento do número de colônias de bactérias devido ao fato de agora existir apenas sequências que são específicas para os ligantes do tecido cardíaco.

Uma adaptação da técnica de *panning* é chamada de BRASIL e consiste da utilização de um óleo (dibutil ftalato:ciclohexano - 9:1) para separar o tecido com os fagos ligados dos fagos que não se ligaram ao tecido. Essa técnica permite uma separação mais adequada, diminuindo a chance de se perder fagos não ligantes ao tecido controle e que poderiam se ligar ao coração tratado. Para ambas as técnicas, utilizou-se duas bibliotecas, que apresentam 8 (CX8C) ou 6 (CX6C) resíduos de aminoácidos entre duas cisteínas localizadas na extremidade.

Por meio da fig. 18 percebe-se que em todas as situações, ocorreu aumento do número de colônias, demonstrando que há uma seleção de fagos específicos, ou seja, está ocorrendo um enriquecimento.

Enriquecimento de Colônias Infectadas

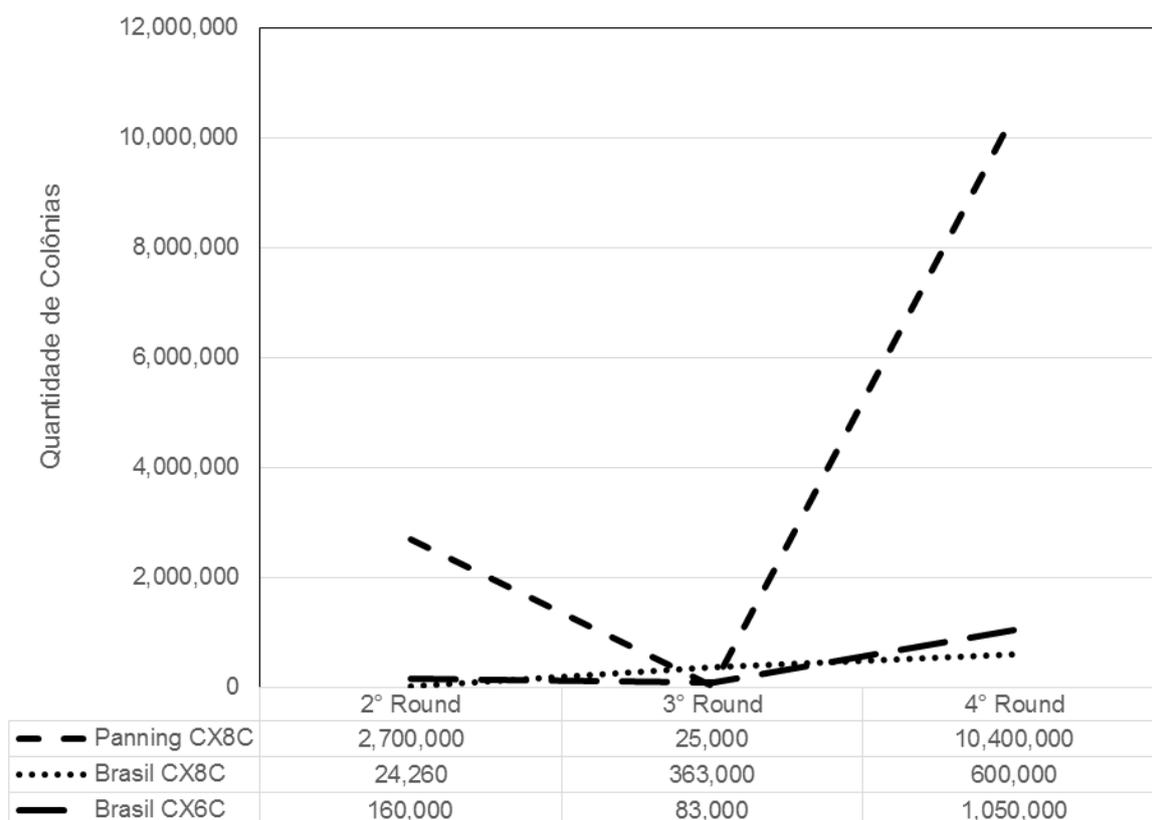


Figura 18 - Enriquecimento de colônias infectadas Titulação das Bibliotecas: $1,86 \times 10^9$. Após os fagos se ligarem ao tecido, este é incubado com a bactéria K91Kan. A infecção dessa bactéria permite que elas sobrevivam no meio de cultura LB sólido, pois o fago apresenta sequência responsável pela resistência ao antibiótico presente no meio. No primeiro *round* não há contagem de colônias devido à grande quantidade de fagos que não são selecionados. A partir do 2º *round* é possível perceber um direcionamento para seleção dos fagos que são específicos para as moléculas presentes no tecido. Isso é demonstrado por meio da redução da quantidade de colônias presentes na cultura. A próxima etapa é verificar um enriquecimento desses fagos selecionados, visto que agora haverá muitas cópias de determinados fagos que foram selecionados na primeira etapa. Esse gráfico demonstra que pelos dois métodos (*Panning* e BRASIL), assim como pelas duas bibliotecas (CX6C e CX8C), há um enriquecimento de colônias, demonstrando o funcionamento da técnica.

Após realizarmos toda a metodologia do *phage display*, isolando os alvos específicos que se ligaram aos tecidos, o DNA dos fagos é amplificado por meio da técnica da PCR e submetido à corrida por gel de agarose. Na fig. 19, observa-se que os DNAs correspondentes aos fagos foram amplificados, sendo visualizados por meio do gel de agarose 1%. Os fagos apresentam o mesmo comprimento de DNA (250 pb), diferenciando apenas na região de inserto. Há também o fago selvagem que não possui a região de inserto e, por isso, se apresenta um pouco mais abaixo no gel, como é observado na coluna de número 1 da fig. 19.

Depois de confirmado a amplificação dos produtos da PCR pela eletroforese, as amostras de DNA são sequenciadas. A fig. 20 representa o sequenciamento de um fago selecionado durante a realização do 4º *round* do *Panning* utilizando a biblioteca CX8C. O inserto da sequência de interesse se encontra entre duas sequências de cisteína (TGC) com tamanho de 24 nucleotídeos, justificando assim a nomenclatura da biblioteca.

O processo de sequenciamento permite identificar as bases de DNA que compõem a região do inserto e, com isso, permite a produção de anticorpos que sejam específicos a essa região para realização da validação dos resultados obtidos. A partir disso, é possível incubar seus tecidos com os fagos específicos e adicionar os anticorpos. Se o tecido realmente apresentar a sequência que foi isolada durante o processo do *phage display*, o órgão ficará marcado com os anticorpos específicos.

As sequências de DNA dos fagos específicos que se ligaram ao tecido são mostradas na tabela 3, onde estão representados os *rounds*, o método e as bibliotecas utilizadas. Entretanto, essas sequências serão submetidas ao processo de validação para comprovação da existência desses ligantes nos tecidos cardíacos estudados.

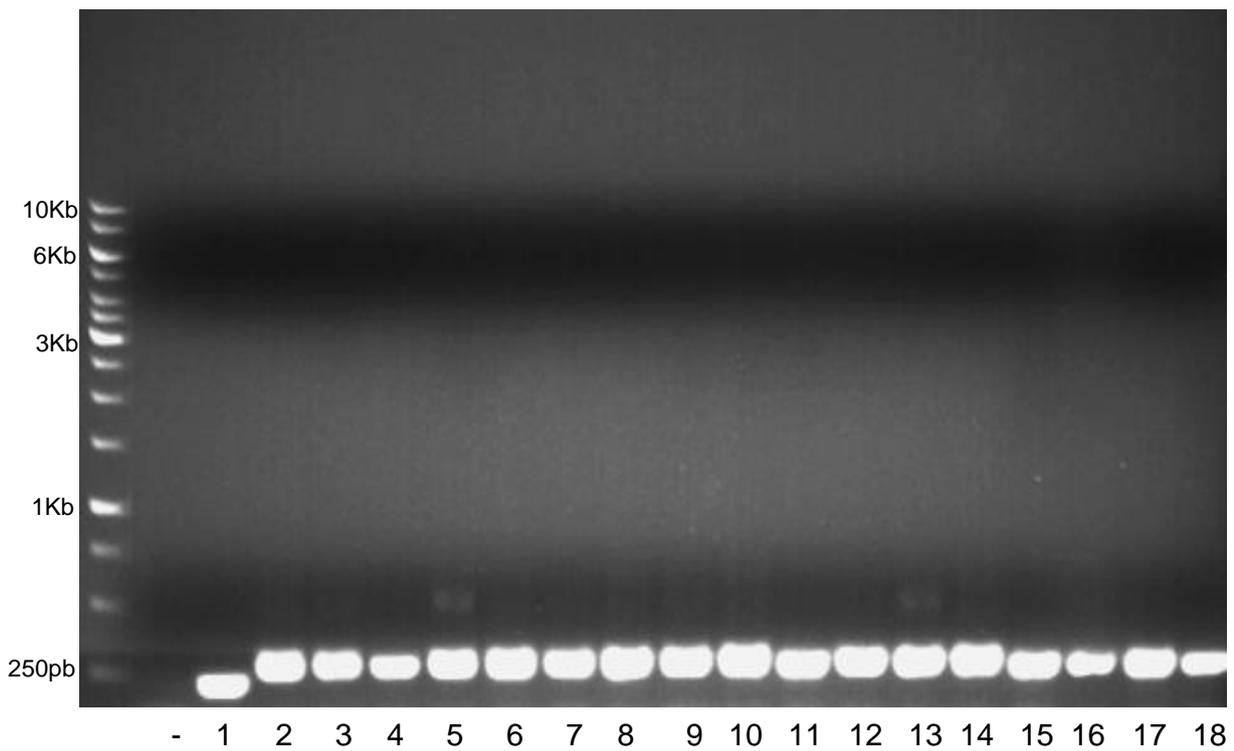


Figura 19 - Gel de Agarose do DNA de Fagos Os fragmentos correspondem à sequência de DNA dos fagos amplificados pela PCR. A primeira coluna corresponde ao *lader* (1 Kb) com as respectivas bandas de massa molecular. A coluna marcada com - representa o branco e a coluna número 1 é referente ao fago selvagem. As colunas seguintes correspondem às amostras. Os fagos apresentam os mesmos comprimentos de DNA de 250 pb, diferenciando-se apenas na região do inserto.

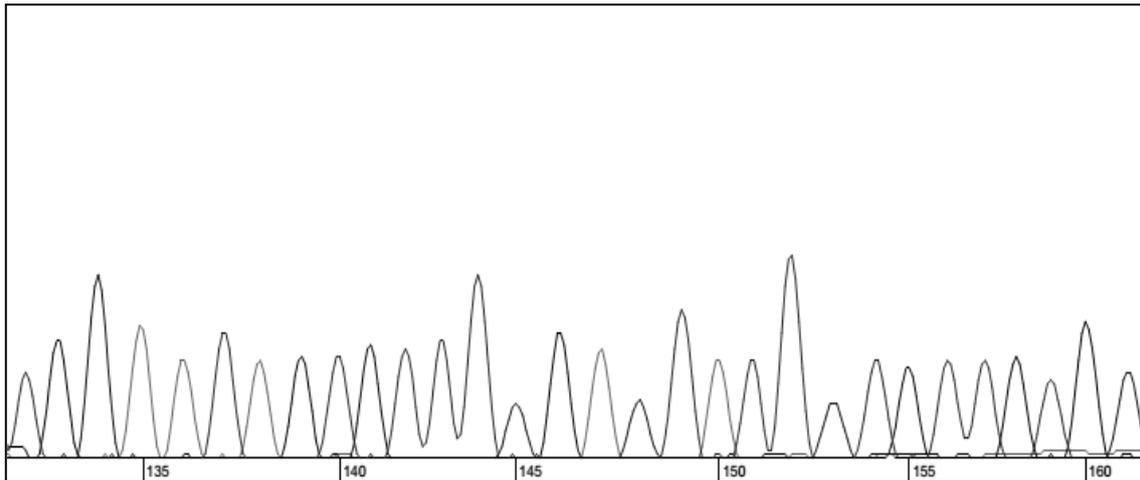


Figura 20 - Sequenciamento de um fago selecionado no 4° Round do Panning utilizando biblioteca CX8C Realização do sequenciamento de um fago que foi selecionado durante a realização do 4° round do Panning com a utilização da biblioteca CX8C. A análise do inserto no programa Ridom TraceEdit permite definir a sequência. O inserto está localizado entre duas sequências de cisteína, que correspondem ao TGC das extremidades.

Obs: As sequências estão em processo de patente, por isso foi retirado as indicações das bases correspondentes, assim como a cor da figura.

Round	Método	Biblioteca	Sequências
4°	<i>Biopanning/ Pre-Clearing</i>	CX8C	HIPERCARD1
			HIPERCARD2
			HIPERCARD3
			HIPERCARD4
			HIPERCARD5
4°	BRASIL	CX8C	HIPERCARD6
			HIPERCARD7
			HIPERCARD8
4°	BRASIL	CX6C	Serão sequenciadas

Tabela 3 - Dados referentes ao sequenciamento dos fagos selecionados pela técnica de *Phage Display* Em processo de patente. A tabela mostra informações a respeito do sequenciamento dos fagos selecionados pela técnica de *Phage Display*. Pode-se observar em qual *Round* os fagos foram selecionados, assim como qual técnica foi utilizada. As sequências dos insertos são apresentadas, juntamente com as respectivas bibliotecas que foram empregadas na metodologia.

5. DISCUSSÃO

O trabalho apresentou como primeiro objetivo desenvolver uma hipertrofia do coração em camundongos. Com isso, procurou se na literatura um modelo animal que se destacasse por sua confiabilidade e reprodutibilidade, além de tentar reproduzir com fidelidade as características patológicas dessa condição em humanos.

A partir dessas pesquisas encontramos um modelo de hipertrofia em animais que utiliza administração de isoproterenol por via subcutânea durante 7 dias. Os resultados obtidos com esse tipo de tratamento incluem hipertrofia do coração, fibrose intersticial e disfunção cardíaca (Oudit et al., 2003).

Sabe-se que o excesso de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) que se ligam aos receptores adrenérgicos está relacionado a patologias como hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e hipertensão (Esler and Kaye, 2000). O isoproterenol é um agonista não seletivo de receptores adrenérgicos β_1 e β_2 , que possui ação vasodilatadora nos músculos lisos dos vasos sanguíneos e promove aumento de força e frequência do coração (Golan, 2009). Essa hiperatividade miocárdica gera um aumento da necessidade de oxigênio e nutrientes pelo músculo cardíaco, entretanto, a hipotensão dos vasos sanguíneos (principalmente das coronárias) devido a ação vasodilatadora não permite o aporte sanguíneo suficiente para suprir as necessidades (Grimm et al., 1998).

Essas ações induzem apoptose dos miócitos e, com isso, os fibroblastos que constituem o coração aumentam a produção de colágeno e a deposição de laminina e fibronectina (proteínas da matriz extracelular). A fim de compensar essa insuficiência, os miócitos aumentam seu volume celular por meio da produção de proteínas, provocando um espessamento da parede do ventrículo (Boluyt et al., 1995; Osadchii, 2007).

Como o tratamento com isoproterenol produz remodelamento cardíaco gerando uma hipertrofia desse tecido, há aumento da massa do coração devido as alterações que as células e a matriz extracelular sofrem. A fim de avaliar essa característica é realizado a pesagem do coração, e por meio dos dados do peso corporal e do comprimento da tíbia, obtém-se relações que são utilizadas como parâmetros para averiguação da hipertrofia do músculo cardíaco.

A tabela 2 demonstra esses dados. Observa-se que o grupo dos animais tratados apresentou o peso do coração superior ao do grupo controle, demonstrando assim ganho de massa miocárdica devido à administração do isoproterenol. Quando realizado o cálculo da relação que utiliza parâmetros padrões como peso corporal e comprimento da tíbia, percebe-se diferenças significativas entre os grupos controle e tratado, indicando uma hipertrofia do músculo cardíaco (Oudit et al., 2003).

As figs. 7 e 8 representam os gráficos das relações peso coração(mg)/peso corporal (g) e peso coração (mg)/comprimento tíbia (cm), respectivamente. Observa-se que há diferenças significativas entre os grupos controle e tratado, ou seja, esses valores são maiores para os animais do grupo tratado devido ao aumento da massa do coração. Esses valores utilizam-se de parâmetros padrões que não se alteram durante o tratamento com isoproterenol, como pode ser verificado pelos dados do peso corporal e do comprimento da tíbia apresentados na tabela 2.

As ações de vasodilatação nos vasos sanguíneos e inotrópica e cronotrópica positivas no coração promovem alterações na pressão sanguínea e a frequência cardíaca. Por meio da realização da pletismografia de cauda é possível avaliar essas alterações durante o processo de tratamento. De acordo com a literatura, as medições são realizadas no primeiro e último dia do tratamento com isoproterenol.

Na fig. 5 é apresentado os valores de pressão arterial dos grupos controle e tratado. É possível perceber que o grupo tratado apresentou valores menores e significativos em relação ao grupo controle do primeiro e do último dia. Essa queda é resultante da ativação dos receptores β_2 presentes no músculo liso dos vasos sanguíneos que promovem o seu relaxamento, reduzindo a resistência vascular periférica. O relaxamento é desencadeado por uma cascata que envolve ativação da adenilato ciclase pela proteína G acoplada ao receptor β adrenérgico. Essas ações levam à geração de inúmeras respostas celulares por meio de ativação da serina/treonina quinase. As respostas que estão relacionadas ao relaxamento incluem: diminuição do influxo de cálcio nas células musculares

lisas e captação do cálcio pelo retículo plasmático (Tanaka et al., 2005; Werstiuk and Lee, 2000).

Com isso, a pressão arterial média sofre uma queda em relação ao controle, ou mesmo permanece inalterada devido ao aumento do débito cardíaco que resulta da ativação dos receptores β_1 localizados no coração (Golan, 2009). Esses dados estão condizentes com os demonstrados na tabela 1, que é resultante de estudo envolvendo tratamento de camundongos com isoproterenol em 7 dias (Oudit et al., 2003).

Quando os valores de frequência cardíaca foram avaliados, apresentados pela fig. 6, observou-se que o grupo tratado apresentava valores menores e significativos em relação ao grupo controle do primeiro e último dia. Esses dados estariam em desacordo com as ações inotrópicas e cronotrópicas positivas do isoproterenol no coração.

Entretanto é relatado na literatura por pesquisadores que a exposição ao agonista de forma crônica (mais de 6 dias) resulta em internalização e dessensibilização funcional dos receptores β adrenérgicos (Kowalski et al., 1990). Com isso, os efeitos crônicos do isoproterenol no coração não resultariam em aumento de força e frequência até que fosse realizado uma forma de recuperação desses receptores, como por exemplo, variando a exposição de catecolamina (Lu and Barnett, 1990). Os resultados encontrados no trabalho estão também em acordo com a tabela 1.

A 2ª etapa do trabalho visa resolver a dificuldade em detectar proteínas da matriz extracelular por meio de um processo de enriquecimento que visa eliminar o conteúdo celular sem afetar a composição, a integridade mecânica e a atividade biológica dessa matriz (Badylak et al., 2011).

Esse processo de enriquecimento é chamado de descelularização. Os agentes necessários para esse procedimento incluem substâncias com capacidade de sequestrar íons importantes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) na adesão das células a matriz extracelular, como por exemplo EDTA (Gailit and Ruoslahti, 1988; Moore et al., 1994). O detergente SDS que permite a solubilização das membranas citoplasmáticas e nuclear, eliminando de forma eficiente as células e

seus remanescentes nucleares (Gilbert et al., 2006; Woods and Gratzner, 2005). Além disso, há também a utilização de inibidor de protease que visa proteger a matriz extracelular da ação de protease liberadas durante o rompimento das células (Gilbert et al., 2006).

A fig 9 representa o aspecto físico do tecido cardíaco após a descclularização, que por eliminar o conteúdo celular torna o órgão com aparência transparente. Com a eliminação das células por solubilização das membranas plasmáticas e nucleares, o conteúdo de DNA presente no tecido submetido a descclularização deve ser mínimo, para evitar, em casos de implantação dessa matriz, respostas inflamatórias do sistema imune do receptor. A fig 10 representa justamente o conteúdo de DNA presente no tecido cardíaco descclularizado, similar ao encontrado em outro trabalho (Carvalho et al., 2012). Em comparação ao coração normal, seus valores são baixos e estão de acordo com dados demonstrados em trabalhos de que o máximo permitido deve ser de 50ng de dsDNA por mg de peso seco de matriz extracelular (Crapo et al., 2011).

Métodos de histologia com coloração de HE e tricômico de Masson são considerados como linha primária de inspeção para avaliar a presença de estruturas nucleares e integridade das fibras de colágeno, e conseqüentemente, a eficiência na eliminação do conteúdo celular (Woods and Gratzner, 2005). As figs. 11, 12 e 13 representam cortes histológicos com estes tipos de coloração. Na coloração de HE do tecido descclularizado (fig. 12) não é observado presença de núcleos de cor arroxeadas, como é mostrado no coração normal (fig. 11), demonstrando que os remanescentes nucleares podem ter sido eliminados. Esse resultado está de acordo com o conteúdo de DNA que observamos na fig. 10. Na coloração com tricômico de Masson do coração descclularizado (fig. 13), percebe se as fibras de colágenos se apresentam de forma íntegra, já que a coloração apresenta afinidade pelas fibras de colágeno da matriz extracelular.

A microscopia eletrônica consiste de uma técnica complexa que permite também examinar a presença de remanescentes nucleares e debris citoplasmáticos (Gilbert et al., 2006). No presente trabalho foi realizado microscopia eletrônica de varredura, que é capaz de demonstrar a topografia de superfície e as variações espaciais do tecido. As figuras 14 e 15 mostram cortes

de coração normal com a presença de células miocárdicas dispostas em forma de feixes em sentido longitudinal (fig. 14) e transversal (fig. 15), além de fibras de colágeno. Já as figuras 16 e 17 representam o tecido cardíaco descelularizado, onde é possível observar vasos sanguíneos e a matriz extracelular de forma íntegra sem conteúdo de células, ou seja, o processo de descelularização foi eficiente em eliminar as células e remanescentes nucleares, sem provocar danos a matriz. Isso foi possível devido a escolha dos agentes que foram utilizados na metodologia, como EDTA, SDS e Inibidor de Proteases.

Com isso, a eficiência em eliminar as células e manter a integridade da matriz permite que as proteínas que a constituem sejam conservadas. Essa característica da descelularização promove um enriquecimento dessas proteínas da matriz extracelular, permitindo assim que se realize estudo de análises proteômicas em diversas condições clínicas. Há trabalhos realizados envolvendo o processo de descelularização e análise proteômicas (de Castro Bras et al., 2013), com resultados que podem complementar as informações existentes a respeito do conteúdo intracelular de determinada condição patológica.

A última etapa do trabalho consiste em avaliar os biomarcadores presentes na matriz extracelular de camundongos com hipertrofia do coração. As duas etapas anteriores foram importantes para produção de modelo de hipertrofia do coração e para enriquecer as proteínas presentes na matriz, que podem sofrer alterações devido a condição patológica.

A necessidade de analisar os biomarcadores da matriz se deve justamente ao fato de os marcadores bioquímicos existentes para detecção de lesões dos músculos cardíacos (LDH, TnI, creatino quinase, ANP, BNP) serem incapazes de determinar condições como hipertrofia, isquemia, inflamação e apoptose (Aragno et al., 2008; Liu et al., 2014).

Os marcadores biológicos são capazes de predizer lesões ao músculo cardíaco e com isso atenuar o dano irreversível ou mesmo evitar lesão ao tecido. Com isso, há sempre uma busca constante por marcadores que possam auxiliar e complementar as informações existentes, a fim de indicar a ocorrência, a gravidade e a progressão de uma determinada patologia.

A metodologia escolhida para essa análise foi a *phage display*, pois ela permite identificar a diversidade peptídica de ligantes presentes na matriz por meio da utilização de fagos contendo peptídeos expressos em sua superfície. As aplicações dessa técnica em inúmeras áreas, devido a especificidade e confiabilidade, justificam a sua escolha para nosso trabalho, pois ela é utilizada para diagnóstico em imagem (Resende and Soccol, 2014), mapear epítomos e seus sítios de ligação (Rowley et al., 2004), em diagnóstico de câncer (Arap et al., 2002), produção de agentes quimioterápicos específicos (Hajitou et al., 2006) e até na terapia gênica (Hajitou et al., 2007).

Para realização do phage display é necessário que a biblioteca de fagos se ligue aos peptídeos específicos presentes na matriz do coração. Com isso, há uma seleção dos fagos que são específicos e durante a infecção das bactérias por esses fagos, irá ocorrer uma queda na quantidade de colônias. Em seguida, esses fagos são purificados das bactérias infectadas e incubados novamente com o tecido cardíaco. Cada etapa dessa é chamada de *round*. Com o aumento do número de *rounds* haverá um processo de enriquecimento, visto que os fagos selecionados se ligam novamente ao tecido, e conseqüentemente, as bactérias serão infectadas, porém agora há um maior número de cópias idênticas de uma mesma sequência em comparação a biblioteca inicial, que apresenta diversidade maior. Com isso, ocorre um enriquecimento na quantidade de unidades formadoras de colônias. Esses acontecimentos são observados na fig. 18, onde é representado uma curva da quantidade de colônias presentes em cada round. Esses dados demonstram que há seleção e enriquecimento de sequências específicas.

Após o processo de seleção dos fagos e captura de uma única colônia, realiza-se PCR para amplificar a sequência do fago contendo o inserto. A fig. 19 representa a eletroforese do DNA amplificado desses fagos, para que a seguir essas moléculas sejam sequenciadas. Na fig 20 é possível observar o sequenciamento de uma colônia de fago. A partir do conhecimento da sequência do DNA, é possível sintetizar esses peptídeos e validá-los por meio de técnicas de fluorescência que demonstram a presença desse ligante apenas no tecido cardíaco hipertrófico. A partir desses resultados, há possibilidade de utilizar

esses ligantes em diagnóstico de imagem para detecção de biomarcadores da condição patológica de hipertrofia do coração. Isso é possível por meio do acoplamento desses peptídeos com marcadores radioativos, fluorescentes ou paramagnéticos e visualização em aparelhos de ressonância magnética, tomografia e microendoscopia de fluorescência confocal (Ferro-Flores et al., 2010) .

6. CONCLUSÃO

A plestismografia demonstrou os efeitos exercidos pelo agonista β não seletivo em seus respectivos receptores situados no coração e no músculo liso dos vasos sanguíneos durante o tratamento. A constatação da queda da pressão arterial e da frequência cardíaca no último dia de tratamento esta condizente com os processos descritos na literatura.

A indução da hipertrofia cardíaca pela administração de isoproterenol foi evidenciada pelo aumento do peso cardíaco em relação ao peso corporal e comprimento da tíbia, assim como também em termos macroscópicos, onde era possível perceber um tamanho maior dos corações correspondentes ao grupo tratado em comparação ao grupo controle.

O processo de descelularização foi eficiente em eliminar o conteúdo celular e conservar a integridade da matriz extracelular do coração, como foi demonstrado pelos cortes histológicos, análise do conteúdo celular e microscopia eletrônica.

A técnica de phage display apresentou resultados intermediários que estão nos direcionando ao caminho desejado. A demonstração do funcionamento do processo de seleção e enriquecimento das colônias nos leva a seguir em frente com o sequenciamento do DNA dos fagos que apresentaram afinidade com o tecido.

Perspectivas Futuras

Finalizando o sequenciamento do DNA dos fagos, pretendemos validar os peptídeos que se ligaram ao tecido por meio da produção de anticorpos específicos. Incubaremos os tecidos com os fagos que apresentaram afinidade e, em seguida, adicionaremos anticorpos para verificar se o tecido realmente apresenta a molécula que se ligou aos peptídeos durante a técnica do phage display.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdouch, M.C., Assad, R.S., and Aiello, V.D. (2009). Experimental ventricular pressure overload in young animals induces cardiomyocyte hypertrophy in addition to hyperplasia of contractile and noncontractile elements of the myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 137, 1573.

Aragno, M., Mastrocola, R., Alloatti, G., Vercellinatto, I., Bardini, P., Geuna, S., Catalano, M.G., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2008). Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. *Endocrinology* 149, 380-388.

Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (2002). Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1527-1531.

Badylak, S., Taylor, D., and Uygun, K. (2011). Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. In *Annual Review of Biomedical Engineering*, pp. 27-53.

Barallobre-Barreiro, J., Didangelos, A., Schoendube, F.A., Drozdov, I., Yin, X., Fernandez-Caggiano, M., Willeit, P., Puntmann, V.O., Aldama-Lopez, G., Shah, A.M., *et al.* (2012). Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 125, 789-802.

Benovic, J.L., Bouvier, M., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1988). Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *Annu Rev Cell Biol* 4, 405-428.

Bessman, S.P., and Carpenter, C.L. (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54, 831-862.

- BEZNAK, M., and HACKER, P. (1964). HEMODYNAMICS DURING THE CHRONIC STAGE OF MYOCARDIAL DAMAGE CAUSED BY ISOPROTERENOL. *Can J Physiol Pharmacol* 42, 269-274.
- Bing, O.H.L., Conrad, C.H., Boluyt, M.O., Robinson, K.G., and Brooks, W.W. (2002). Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart failure reviews* 7, 71-88.
- Boluyt, M.O., Long, X., Eschenhagen, T., Mende, U., Schmitz, W., Crow, M.T., and Lakatta, E.G. (1995). Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *The American journal of physiology* 269, H638-647.
- Bornstein, P., and Sage, E.H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology* 14, 608-616.
- Boron, W.F.B., E.L. (2009). *Medical Physiology: a cellular and molecular approach*, 2 edn (Saunders Elsevier).
- Carvalho, J., Carvalho, P., Gomes, D., and Goes, A. (2012). Characterization of Decellularized Heart Matrices as Biomaterials for Regular and Whole Organ Tissue Engineering and Initial In-vitro Recellularization with Ips Cells. *Journal of Tissue Science & Engineering* S11, 1-6.
- Carvalho, J.L., Carvalho, P.H.d., Gomes, D.A., and Goes, A.M.d. (2013). *Innovative Strategies for Tissue Engineering*.
- Choi, S.Y., Cho, K.I., Han, Y.J., You, G.I., Kim, J.H., Heo, J.H., Kim, H.S., Cha, T.J., and Lee, J.W. (2014). Impact of Pheochromocytoma on Left Ventricular Hypertrophy and QTc Prolongation: Comparison with Takotsubo Cardiomyopathy. *Korean circulation journal* 44, 89-96.
- Cieniewski-Bernard, C., Mulder, P., Henry, J.P., Drobecq, H., Dubois, E., Pottiez, G., Thuillez, C., Amouyel, P., Richard, V., and Pinet, F. (2008). Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *Journal of proteome research* 7, 5004-5016.

Corti, A., Curnis, F., Rossoni, G., Marcucci, F., and Gregorc, V. (2013). Peptide-mediated targeting of cytokines to tumor vasculature: the NGR-hTNF example. *BioDrugs* 27, 591-603.

Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32, 3233-3243.

Cummins, B., Auckland, M.L., and Cummins, P. (1987). Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *American heart journal* 113, 1333-1344.

Curi, R., and Procópio, J. (2009). *Fisiologia Básica* (São Paulo: Guanabara Koogan).

de Castro Bras, L.E., Ramirez, T.A., DeLeon-Pennell, K.Y., Chiao, Y.A., Ma, Y., Dai, Q., Halade, G.V., Hakala, K., Weintraub, S.T., and Lindsey, M.L. (2013). Texas 3-step decellularization protocol: looking at the cardiac extracellular matrix. *Journal of proteomics* 86, 43-52.

de Lemos, J.A., McGuire, D.K., and Drazner, M.H. (2003). B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 362, 316-322.

Didangelos, A., Yin, X., Mandal, K., Saje, A., Smith, A., Xu, Q., Jahangiri, M., and Mayr, M. (2011). Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 10, M111 008128.

Díez, J., and Frohlich, E.D. (2010). A translational approach to hypertensive heart disease. *Hypertension* 55, 1-8.

Discher, D.E., Mooney, D.J., and Zandstra, P.W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324, 1673-1677.

Dorn, G.W., Robbins, J., and Sugden, P.H. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92, 1171-1175.

- Drazner, M.H. (2011). The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 123, 327-334.
- Du, Y., Plante, E., Janicki, J.S., and Brower, G.L. (2010). Temporal evaluation of cardiac myocyte hypertrophy and hyperplasia in male rats secondary to chronic volume overload. *The American journal of pathology* 177, 1155-1163.
- Esler, M., and Kaye, D. (2000). Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *Journal of cardiovascular pharmacology* 35, S1-7.
- Espiner, E.A. (1994). Physiology of natriuretic peptides. *Journal of internal medicine* 235, 527-541.
- Ferro-Flores, G., Ramírez, F.d.M., Meléndez-Alafort, L., and Santos-Cuevas, C.L. (2010). Peptides for in vivo target-specific cancer imaging. *Mini Rev Med Chem* 10, 87-97.
- Frank, J.J., Bermes, E.W., Bickel, M.J., and Watkins, B.F. (1978). Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem* 24, 1966-1970.
- French, A.P., Tonge, C.M., Peake, J.C., and Horton, P.W. (1988). Variability of ejection fraction results using commercial cardiac phantoms. *Nucl Med Commun* 9, 527-532.
- Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., and Hill, J.A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109, 1580-1589.
- Frey, N., and Olson, E.N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology* 65, 45-79.
- Gailit, J., and Ruoslahti, E. (1988). Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* 263, 12927-12932.
- Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., and Badylak, S.F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27, 3675-3683.

Giordano, R.J., Cardó-Vila, M., Lahdenranta, J., Pasqualini, R., and Arap, W. (2001). Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nature medicine* 7, 1249-1253.

Golan, D.E. (2009). *Princípios de Farmacologia* (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan).

Grimm, D., Elsner, D., Schunkert, H., Pfeifer, M., Griese, D., Bruckschlegel, G., Muders, F., Riegger, G.A., and Kromer, E.P. (1998). Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovascular research* 37, 91-100.

Grossman, W., Jones, D., and McLaurin, L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56-64.

Hajitou, A., Pasqualini, R., and Arap, W. (2006). Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives. *Trends Cardiovasc Med* 16, 80-88.

Hajitou, A., Rangel, R., Trepel, M., Soghomonyan, S., Gelovani, J.G., Alauddin, M.M., Pasqualini, R., and Arap, W. (2007). Design and construction of targeted AAVP vectors for mammalian cell transduction. *Nat Protoc* 2, 523-531.

Hamburg, R.J., Friedman, D.L., and Perryman, M.B. (1991). Metabolic and diagnostic significance of creatine kinase isoenzymes. *Trends Cardiovasc Med* 1, 195-200.

Hasenfuss, G. (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular research* 39, 60-76.

Hill, J.A., and Olson, E.N. (2008). Cardiac plasticity. *The New England journal of medicine* 358, 1370-1380.

Hoogenboom, H.R., de Bruijne, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W., and Roovers, R.C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.

Hopkinson, A., Shanmuganathan, V.A., Gray, T., Yeung, A.M., Lowe, J., James, D.K., and Dua, H.S. (2008). Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 14, 371-381.

Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Sakai, S., Fujii, N., Miyazaki, H., Kakinuma, Y., Matsuda, M., and Yamaguchi, I. (2003). Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* 26, 829-837.

Jones M, E.E.E., Walters S M, Ferrans V J, Clark R E. (1986). Effects of 2 types of pre-implantation processes on calcification of bioprosthetic valves'. Paper presented at: Proceedings of the Third international Symposium Yorke Medical Books (New York).

Kannel, W.B., Levy, D., and Cupples, L.A. (1987). Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study. *Journal of cardiovascular pharmacology* 10 Suppl 6, S135-140.

Katholi, R.E., and Couri, D.M. (2011). Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clinical applications. *International journal of hypertension* 2011, 495349.

Kim, H.-N., and Januzzi, J.L. (2011). Natriuretic peptide testing in heart failure. *Circulation* 123, 2015-2019.

Kowalski, M.T., Haworth, D., Lu, X., Thomson, D.S., and Barnett, D.B. (1990). Comparison of the effects of xamoterol and isoprenaline on rat cardiac beta-adrenoceptors: studies of function and regulation. *British journal of pharmacology* 99, 27-30.

Kurtz, T.W., Griffin, K.A., Bidani, A.K., Davison, R.L., Hall, J.E., Subcommittee of, P., and Public Education of the American Heart, A. (2005). Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional

and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension* 45, 299-310.

Liao, M., Liu, Z., Bao, J., Zhao, Z., Hu, J., Feng, X., Feng, R., Lu, Q., Mei, Z., Liu, Y., *et al.* (2008). A proteomic study of the aortic media in human thoracic aortic dissection: implication for oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg* 136, 65-72, 72.e61-63.

Ligeti, I. (1960). [Physiological cardiac enlargement]. *Orvosi hetilap* 101, 598-601.

Liu, L., Aguirre, S.A., Evering, W.E., Hirakawa, B.P., May, J.R., Palacio, K., Wang, J., Zhang, Y., and Stevens, G.J. (2014). miR-208a as a biomarker of isoproterenol-induced cardiac injury in *Sod2*^{+/-} and C57BL/6J wild-type mice. *Toxicologic pathology* 42, 1117-1129.

Louch, W.E., Sheehan, K.A., and Wolska, B.M. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51, 288-298.

Lu, X.Y., and Barnett, D.B. (1990). Differential rates of down regulation and recovery of rat myocardial beta-adrenoceptor subtypes in vivo. *European journal of pharmacology* 182, 481-486.

Luethy, E., Scheu, H., Alsleben, U., Rothlin, M., Krayenbuehl, H.P., and Kako, K. (1964). [Stroke Volume and Pressure Loads in Compensated and Decompensated Hearts]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 94, 692-697.

Lumpkins, S.B., Pierre, N., and McFetridge, P.S. (2008). A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomater* 4, 808-816.

Matsubara, T. (2012). Potential of peptides as inhibitors and mimotopes: selection of carbohydrate-mimetic peptides from phage display libraries. *Journal of nucleic acids* 2012, 740982.

Mayr, M., Yusuf, S., Weir, G., Chung, Y.-L., Mayr, U., Yin, X., Ladroue, C., Madhu, B., Roberts, N., De Souza, A., *et al.* (2008). Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 51, 585-594.

Meerson, F.Z. (1961). On the mechanism of compensatory hyperfunction and insufficiency of the heart. *Cor et vasa* 3, 161-177.

Mendelsohn, A.R., and Brent, R. (1999). Protein interaction methods--toward an endgame. *Science* 284, 1948-1950.

Mladenka, P., Hrdina, R., Bobrovova, Z., Semecky, V., Vavrova, J., Holeckova, M., Palicka, V., Mazurova, Y., and Nachtigal, P. (2009). Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Human & experimental toxicology* 28, 631-640.

Moore, R., Madara, J.L., and MacLeod, R.J. (1994). Enterocytes adhere preferentially to collagen IV in a differentially regulated divalent cation-dependent manner. *The American journal of physiology* 266, G1099-1107.

Osadchii, O.E. (2007). Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart failure reviews* 12, 66-86.

Oudit, G.Y., Crackower, M.A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V.O., Wada, T., *et al.* (2003). Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation* 108, 2147-2152.

Paelinck, B.P., Vrints, C.J., Bax, J.J., Bosmans, J.M., De Hert, S.G., de Roos, A., and Lamb, H.J. (2006). Relation of B-type natriuretic peptide early after acute myocardial infarction to left ventricular diastolic function and extent of myocardial damage determined by magnetic resonance imaging. *The American journal of cardiology* 97, 1146-1150.

Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 2-11.

Patterson, S.D., and Aebersold, R.H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 311-323.

Port, J.D., and Bristow, M.R. (2001). Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33, 887-905.

Resende, R.R., Fonseca, E.A., Tonelli, F.M.P., Sousa, B.R., Santos, A.K., Gomes, K.N., Guatimosim, S., Kihara, A.H., and Ladeira, L.O. (2014). Scale/topography of substrates surface resembling extracellular matrix for tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol* 10, 1157-1193.

Resende, R.R., and Soccol, C.R. (2014). *Biotechnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações*, Vol 2 (São Paulo: Blücher).

Rodi, D.J., Makowski, L., and Kay, B.K. (2002). One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. *Curr Opin Chem Biol* 6, 92-96.

Romhilt, D.W., and Estes, E.H., Jr. (1968). A point-score system for the ECG diagnosis of left ventricular hypertrophy. *American heart journal* 75, 752-758.

RONA, G., CHAPPEL, C.I., BALAZS, T., and GAUDRY, R. (1959). An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 67, 443-455.

Rowley, M.J., O'Connor, K., and Wijeyewickrema, L. (2004). Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol Annu Rev* 10, 151-188.

Rozario, T., and DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology* 341, 126-140.

Sanghvi, A.B., Miller, K.P.-H., Belcher, A.M., and Schmidt, C.E. (2005). Biomaterials functionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer. *Nat Mater* 4, 496-502.

Santos, A., Tonelli, F.P., Silva, D.F., Gomes, K., Ladeira, L., and Resende, R. (2013). The Role of Cell Adhesion, Cell Junctions, and Extracellular Matrix in Development and Carcinogenesis. In Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research, R.R. Resende, and H. Ulrich, eds. (Springer Netherlands), pp. 13-49.

Sarko, J., and Pollack, C.V. (2002). Cardiac troponins. *J Emerg Med* 23, 57-65.

Schwartzkopff, B., Motz, W., Frenzel, H., Vogt, M., Knauer, S., and Strauer, B.E. (1993). Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation* 88, 993-1003.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

Smith, G.P., and Petrenko, V.A. (1997). Phage Display. *Chemical reviews* 97, 391-410.

Soonpaa, M.H., and Field, L.J. (1994). Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis during hypertrophy in adult mice. *The American journal of physiology* 266, H1439-1445.

Spinale, F.G. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 87, 1285-1342.

Sütsch, G., Brunner, U.T., von Schulthess, C., Hirzel, H.O., Hess, O.M., Turina, M., Krayenbuehl, H.P., and Schaub, M.C. (1992). Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circ Res* 70, 1035-1043.

Tanaka, Y., Horinouchi, T., and Koike, K. (2005). New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 503-514.

Thygesen, K., Mair, J., Mueller, C., Huber, K., Weber, M., Plebani, M., Hasin, Y., Biasucci, L.M., Giannitsis, E., Lindahl, B., *et al.* (2012). Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. *European heart journal* 33, 2001-2006.

Wang, J., Liu, Y., Teesalu, T., Sugahara, K.N., Kotamrajua, V.R., Adams, J.D., Ferguson, B.S., Gong, Q., Oh, S.S., Csordas, A.T., *et al.* (2011). Selection of phage-displayed peptides on live adherent cells in microfluidic channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 6909-6914.

Watters, J.M., Telleman, P., and Junghans, R.P. (1997). An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* 3, 21-29.

Weber, K.T., Clark, W.A., Janicki, J.S., and Shroff, S.G. (1987). Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *Journal of cardiovascular pharmacology* 10 Suppl 6, S37-50.

Werstiuk, E.S., and Lee, R.M. (2000). Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol* 78, 433-452.

Whaley, S.R., English, D.S., Hu, E.L., Barbara, P.F., and Belcher, A.M. (2000). Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature* 405, 665-668.

Willats, W.G.T. (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50, 837-854.

Woods, T., and Gratzner, P.F. (2005). Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* 26, 7339-7349.

Yang, B., Zhang, Y., Zhou, L., Sun, Z., Zheng, J., Chen, Y., and Dai, Y. (2010). Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 1201-1211.

