

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

**RICARDO CAMBRAIA PARREIRA**

**ESTUDO DO REMODELAMENTO DO  
PROTEOMA CARDÍACO APÓS A INDUÇÃO  
DE HIPERTROFIA POR ISOPROTERENOL  
EM CAMUNDONGOS**

**Belo Horizonte – MG**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**RICARDO CAMBRAIA PARREIRA**

**ESTUDO DO REMODELAMENTO DO  
PROTEOMA CARDÍACO APÓS A INDUÇÃO  
DE HIPERTROFIA POR ISOPROTERENOL  
EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga

**Belo Horizonte – MG**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, minha namorada Larissa De Paolis e meu parceiro Daniel Mendes pela paciência, compreensão e colaboração para realização do trabalho;

Ao professor Dr. Rodrigo Ribeiro Resende pelo apoio e estrutura, além das oportunidades oferecidas;

Ao Professor Dr. Thiago Verano Braga pela recepção em seu laboratório e pelo grande apoio no trabalho descrito. Além disso, agradeço pela relação de amizade construída durante esse momento;

Agradeço aos alunos do Professor Dr. Thiago Verano pela colaboração no trabalho, em especial ao Rafael Lemos e Diana;

À Professora Dra. Silvia Guatimosim e ao aluno Itamar Couto por permitir realizar o isolamento dos cardiomiócitos;

Agradeço à Professora Dra. Adriana Paes Leme e os técnicos do Laboratório Nacional de Biociências pelas análises da matriz extracelular descelularizada;

Ao Professor Dr. Henrique César Pereira Figueiredo e a pesquisadora Cristiana Perdigão Rezende do Laboratório Oficial Central da Rede Nacional de Laboratórios Oficiais do Ministério da Pecuária e Agricultura (RENAQUA) pela análise das proteínas dos cardiomiócitos;

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;

Ao Jamil Silvano e Anderson Santos pelo companheirismo, amizade e colaboração em todos esses anos de mestrado e doutorado;

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

## RESUMO

A análise proteômica tem sido aplicada no estudo da modulação de proteínas em processos fisiopatológicos, como envelhecimento, câncer e doenças cardiovasculares, o que permite identificar vias metabólicas e potenciais alvos moleculares associados às patologias estudadas. Os estudos proteômicos de doenças cardiovasculares demonstraram a regulação de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, proteínas de choque térmico, sistema redox, sinalização de cálcio e do citoesqueleto. Porém esses trabalhos não demonstraram a interação entre as proteínas e possíveis reguladores do processo de remodelamento cardíaco, que poderiam ser utilizados como alvos terapêuticos. O projeto apresentado nesta tese de doutorado utilizou um modelo murino de hipertrofia cardíaca com o uso de isoproterenol, que resulta no desenvolvimento da patologia em camundongos. A partir da análise dos dados, apresentamos as proteínas que compõem a matriz descelularizada e os cardiomiócitos, que podem estar relacionadas ao processo de hipertrofia cardíaca. Neste estudo, evidenciamos as vias de sinalização celular possivelmente envolvidas na hipertrofia, assim como potenciais reguladores do remodelamento do proteoma cardíaco. Desta forma, acreditamos que o nosso estudo contribui para melhor compreendermos as bases moleculares envolvidas na hipertrofia cardíaca, apresentando potenciais alvos para o tratamento desta patologia.

Palavra-chave: hipertrofia cardíaca, proteoma, cardiomiócito, matriz extracelular descelularizada

## **ABSTRACT**

Cardiac hypertrophy is a pathological enlargement of heart muscle resulting from increased cardiomyocytes in size and changes in extracellular matrix. Proteome studies of the cardiovascular diseases have demonstrated altered expression of proteins related to energy metabolism, heat shock proteins, redox system, calcium and cytoskeleton signaling. Nevertheless, the interaction between proteins and key regulators underlying cardiac remodeling are still elusive. To gain a better understanding on hypertrophy, we performed a qualitative proteomic study of heart extracellular matrix after a decellularization process and a quantitative (label-free) cardiomyocytes proteomic analysis in the isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model. Altogether, our proteomic data has shown that the treatment induced changes in biochemical pathways and cell signaling. We also highlighted proteins and gene expression regulators potentially involved in the observed proteome remodeling. This work provides a better understanding about the modulation of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model.

Keywords: Cardiac hypertrophy, heart extracellular matrix, proteomic, decellularization, isoproterenol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do coração.....	17
Figura 2: Estrutura e processo de contração do sarcômero da fibra muscular cardíac. .....	19
Figura 3: Esquema do cálcio intracelular no processo de acoplamento excitação- contração .....	23
Figura 4: Diferenças entre hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica .....	26
Figura 5: Tipos de hipertrofia patológica .....	27
Figura 6: Estrutura química da epinefrina, norepinefrina, dopamina e isoproterenol....	30
Figura 7: Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massa .....	32
Figura 8: Componentes da Matriz Extracelular .....	36
Figura 9: Estratégia experimental para o estudo do remodelamento cardíaco no processo de hipertrofia induzido por isoproterenol .....	50
Figura 10: Área dos cardiomiócitos dos grupos Controle e Tratado.....	55
Figura 11: Microscopia confocal e imunofluorescência dos cardiomiócitos isolados de corações provenientes dos grupos controle e tratado.....	56
Figura 12: Análise por Ontologia Gênica (GO) de todas as proteínas identificadas na matriz descelularizada .....	58
Figura 13: Diagrama de Venn das proteínas identificadas no estudo proteômico qualitativo da matriz descelularizada .....	59
Figura 14: O complexo PRP19.....	64
Figura 15: Histograma das intensidades das proteínas identificadas e quantificadas dos cardiomiócitos.....	66
Figura 16: Boxplot. Distribuição das intensidades das proteínas identificadas e quantificadas em cada grupo experimental.....	67
Figura 17: Volcano plot. Distribuição dos valores-p (Eixo Y) em relação às intensidades das proteínas em escala logarítmica de base 2 (log <sub>2</sub> ) (Eixo X) .....	68
Figura 18: Vias de sinalização celular possivelmente moduladas pelo tratamento com o isoproterenol.....	80
Figura 19: Rede de interações entre a DNMT3A e seus alvos moleculares .....	81
Figura 20: Rede de interações entre a DNMT3B e seus alvos moleculares .....	83
Figura 21: Rede de interações entre o ESRRA e seus alvos moleculares.....	85
Figura 22: Rede de interações entre o GATA6 e seus alvos moleculares.....	86

Figura 23: Rede de interações entre o IGF1R e seus alvos moleculares.....	87
Figura 24: Rede de interações entre o INSR e seus alvos moleculares .....	88
Figura 25: Rede de interações entre a MAP4K4 e seus alvos moleculares.....	89
Figura 26: Rede de interações entre o MYC e seus alvos moleculares.....	90
Figura 27: Doenças e funções biológicas.....	91
Figura 28: Proteínas reguladas pelo tratamento com o isoproterenol e seus potenciais efeitos na função e proliferação do tecido cardíaco .....	94
Figura 29: Rede de interações proteína-proteína .....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das fases do potencial de ação e principais correntes iônicas .....	22
Tabela 2: Parâmetros utilizados para caracterizar a hipertrofia do coração induzida pelo tratamento com isoproterenol .....	54
Tabela 3: Proteínas identificadas nos grupos controle e tratado.....	61
Tabela 4: Proteínas identificadas apenas no grupo controle .....	62
Tabela 5: Proteínas identificadas apenas no grupo tratado (coração hipertrofiado) .....	63
Tabela 6: Proteínas reguladas após o tratamento com o isoproterenol .....	70



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$ -AR - receptores  $\beta$ -adrenérgicos

ADP – do inglês. “adenosine diphosphate”

ALDOA - do inglês, “aldolase A”

ANP - do inglês, “atrial natriuretic peptide”

ANXA6 - do inglês, “annexin A6”

ATP - do inglês, “adenosine triphosphate”

ATP5O - do inglês, “ATP synthase peripheral stalk subunit”

AVCs - acidentes vasculares cerebrais

BNP - do inglês, “brain natriuretic peptide”

CALM1 - do inglês, “calmodulin 1”

CALU - do inglês, “calumenin”

CD36 - do inglês, “cluster of differentiation 36”

COX4I1 - do inglês, “cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial

DAPI - do inglês “4',6-diamidino-2-phenylindole”

DBcAMP - do inglês, “dibutiril-cAMP”

DECR1 - do inglês, “2,4-dienol-CoA redutase”

DIA - do inglês, “data independent aquisition”

DLAT - do inglês, “dihydrolipoamide S-acetyltransferase”

DNMT3A - do inglês, “DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3<sup>a</sup>”

DNMT3B - do inglês, “DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B”

DNMTs - do inglês, “DNA-metiltransferases”

DTT - do inglês, “dithiothreitol”

EDTA - do inglês, “ethylenediamine tetraacetic acid”

ERK - do inglês, “extracellular signal–regulated kinases”

ESRRA - do inglês, “estrogen-related receptor alpha”

ETFDH - do inglês, “electron transfer flavoprotein dehydrogenase”

FAK – do inglês, “focal adhesion kinase”

GATA4 - do inglês, “GATA binding protein 4”

GATA6 - do inglês, "GATA binding protein 6"

GLUD1 - do inglês, "glutamate dehydrogenase 1"

GPI1 - do inglês, "glucose fosfato isomerase 1"

HE- hematoxilina e eosina

HNRNPA1 - do inglês, "heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1"

HNRNPA2B1 - do inglês, "heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1"

HNRNPs - do inglês, "heterogeneous nuclear ribonucleoproteins"

HVE - hipertrofia ventricular esquerda

IGF1 - do inglês, "insulin-like growth factor 1"

IGF1R - do inglês, "insulin-like growth factor 1 receptor"

INSR - do inglês, "insulin receptor"

IP - inibidor de proteases

IP3 - inositol-3-fosfato

IPA - do inglês, "Ingenuity Pathway Analysis"

JUNK - do inglês, "JUN kinase"

LC-MS – do inglês, liquid chromatography–mass spectrometry"

MAPK - do inglês, "mitogen activated protein kinases"

MARCO - do inglês, "macrophage receptor with collagen structure"

MC – músculo cardíaco

MEC - matriz extracelular

MEF2C - do inglês, "myocyte enhancer factor 2C"

miRNAs – MicroRNAs

MYH7 - do inglês, "myosin heavy chain 7"

MYH7B - do inglês, "myosin heavy chain 7B"

MYL3 - do inglês, "myosin light chain 3"

NAV - nó átrio-ventricular

NCX1 - do inglês, "sodium-calcium exchanger"

NDUFA3 - do inglês, "NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A3 "

NDUFAB1 - do inglês, "NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit AB1"

NDUFB9 - do inglês, "NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B9"

NFAT - do inglês, “nuclear factor of activated T-cells”

NFATC1 - do inglês, “nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1”

NF- $\kappa$ B - do inglês, “factor nuclear kappa B”

NSA, nó sinoatrial

OMS - Organização Mundial de Saúde

PA - potencial de ação

PBS - do inglês, “phosphate-buffer saline”

PDH - do inglês, “pyruvate dehydrogenase”

PDK1 - do inglês, “pyruvate dehydrogenase kinase 1”

PGAM1 - do inglês, “phosphoglycerate mutase 1”

PGC-1 $\alpha$  - do inglês, “peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha”

PGC-1 $\beta$  - do inglês, “peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta”

Pi – fosfato inorgânico

PYGL - do inglês, “glycogen phosphorylase L”

RAB1A - do inglês, “Ras-related protein Rab-1<sup>a</sup>”

RS – retículo sarcoplasmático

RyR – receptor de rianodina

SDS-PAGE – do inglês, “sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis”

SERCA - do inglês, “sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, or SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase”

SIV – septo interventricular

SLC8A1 - do inglês, “solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger)”

SNA - sistema nervoso autônomo

SNPs - do inglês, “single nucleotide polymorphisms”

SRC – “SRC Kinase”

TCEP - do inglês, “tris(2-carboxyethyl)phosphine”

TEAB - do inglês, “tetraethylammonium bromide”

TNNI3 – do inglês, “cardiac troponin I”

TNNT2 – do inglês, “cardiac troponin T”

TXN - do inglês, “thioredoxin”

VCL - do inglês, “vinculin”

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. <b>CORAÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 <i>Microestrutura contrátil do tecido cardíaco</i> .....	<b>18</b>
1.1.2 <i>Excitabilidade do miocárdio</i> .....	<b>20</b>
1.1.3 <i>Canais iônicos e o potencial de ação</i> .....	<b>21</b>
1.1.4 <i>Acoplamento excitação-contração</i> .....	<b>22</b>
1.1.5 <i>Estimulação <math>\beta</math>-adrenérgica</i> .....	<b>24</b>
1.1.6 <i>Hipertrofia Cardíaca</i> .....	<b>25</b>
1.1.7 <i>O uso de agonistas dos receptores <math>\beta</math>-adrenérgicos e a indução da hipertrofia cardíaca</i> .....	<b>29</b>
1.2. <b>PROTEOMA</b> .....	<b>30</b>
1.2.1 <i>Métodos de separação de proteínas e peptídeos</i> .....	<b>31</b>
1.2.2 <i>Espectrometria de Massa (MS)</i> .....	<b>31</b>
1.2.3 <i>Estratégias proteômicas</i> .....	<b>34</b>
1.2.4 <i>A proteômica e o sistema cardiovascular</i> .....	<b>34</b>
1.3. <b>MATRIZ EXTRACELULAR</b> .....	<b>35</b>
1.3.1 <i>Matriz descelularizada</i> .....	<b>37</b>
1.4. <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
1.5. <b>HIPÓTESE</b> .....	<b>39</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1. <b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>41</b>
2.2. <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>41</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
3.1. <b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	<b>43</b>
3.2. <b>CAMUNDONGOS</b> .....	<b>43</b>
3.3. <b>INDUÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA</b> .....	<b>43</b>
3.4. <b>EUTANÁSIA</b> .....	<b>43</b>
3.5. <b>PARÂMETRO DE HIPERTROFIA</b> .....	<b>44</b>
3.6. <b>DESCELULARIZAÇÃO</b> .....	<b>44</b>
3.7. <b>ISOLAMENTO DE CARDIOMIÓCITO VENTRICULAR DE CAMUNDONGOS ADULTOS</b> .....	<b>44</b>
3.8. <b>IMUNOFLORESCÊNCIA</b> .....	<b>45</b>
3.9. <b>PROTEOMA</b> .....	<b>45</b>

3.9.1	<i>Tecido Descelularizado</i> .....	45
3.9.2	<i>Cardiomiócitos</i> .....	46
3.10.	ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	47
3.11.	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	48
3.12.	RESUMO DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	49
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
4.1.	HIPERTROFIA CARDÍACA.....	52
4.2.	PROTEOMA.....	56
4.2.1	<i>Matriz Descelularizada</i> .....	56
4.2.2	<i>Cardiomiócitos</i> .....	65
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>99</b>
<b>7.0</b>	<b>ANEXO 1 – RESULTADOS DESCELULARIZAÇÃO DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>123</b>

# 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2016, sendo que 85% dessas mortes são referentes a acidentes vasculares encefálicos (AVEs) e infarto do miocárdio (1).

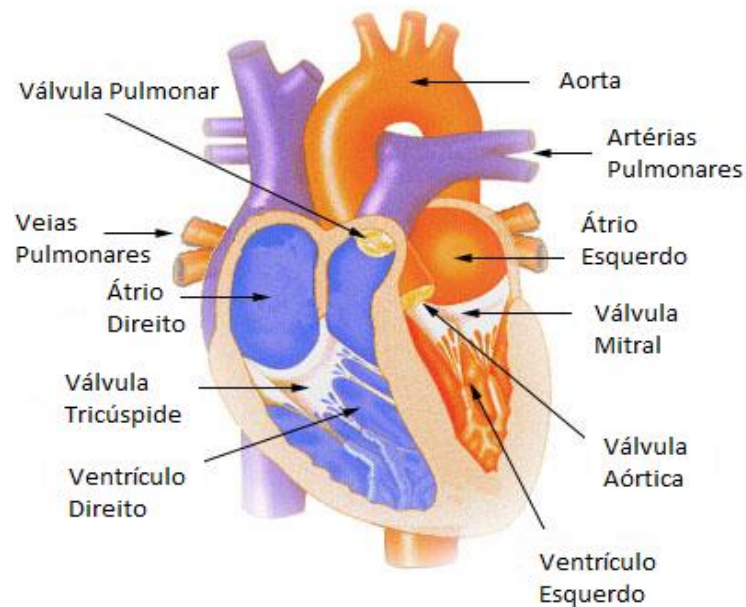
Hábitos alimentares, sedentarismo, genética e o contínuo envelhecimento da população mundial contribuem para esse panorama. As cardiomiopatias são definidas por anormalidades estruturais e funcionais idiopáticas do miocárdio ventricular, ou seja, de causas não claras, que geram uma limitação do fluxo arterial coronariano (2).

A hipertensão é um fator de risco associado às lesões cardíacas, e a consequência principal é um déficit no bombeamento sanguíneo, comprometendo a qualidade de vida do paciente e podendo causar a sua morte. Em resposta à lesão, o músculo cardíaco pode entrar em um processo de hipertrofia e, assim, tentar reequilibrar a insuficiência cardíaca. No entanto, esse processo pode adquirir um contorno patológico, que é a cardiomiopatia propriamente dita. A hipertrofia é uma complicação encontrada em até 30% dos pacientes hipertensos. A hipertensão sistêmica crônica gera alterações estruturais e funcionais no músculo cardíaco. Além da hipertrofia, também podem ocorrer alterações como fibrose do interstício do miocárdio e angiopatia coronariana (3).

A prevenção do desenvolvimento das cardiomiopatias hipertróficas deve ser o principal objetivo do tratamento da hipertensão arterial. O parâmetro clínico mais acessível para atingir esse objetivo é o controle efetivo da pressão arterial, utilizando medicamentos anti-hipertensivos adequados com acompanhamento médico, o incentivo a atividade física e bons hábitos alimentares (4).



## 1.1. Coração



**Figura 1: Estrutura do coração.** O coração é dividido em quatro cavidades: duas superiores, chamadas de átrio direito e esquerdo, e duas inferiores, denominadas ventrículo direito e esquerdo. As válvulas cardíacas são estruturas compostas por um tecido conjuntivo e são localizadas na saída das câmaras cardíacas: 1) válvula tricúspide, localizada entre o átrio direito e o ventrículo direito; 2) válvula mitral, entre o átrio esquerdo e o ventrículo esquerdo; 3) válvula pulmonar, entre o ventrículo direito e a artéria pulmonar; e 4) válvula aórtica, entre o ventrículo esquerdo e a artéria aorta. Essas estruturas são responsáveis pelo fluxo unidirecional do sangue, impedindo seu refluxo. (Fonte: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/cardiovascular/heart/structure.html>)

O sistema cardiovascular é composto pelo sangue, coração e vasos sanguíneos (Figura 1). O sangue é um tecido conjuntivo líquido formado por diferentes tipos de células, responsável pelo transporte de nutrientes, gases e biomoléculas, circulando dentro de complexos sistemas chamados de vasos sanguíneos. O coração é uma bomba pulsátil, constituída por quatro câmaras denominadas átrios e ventrículos (Figura 1). As duas câmaras superiores, os átrios, funcionam como compartimentos que bombeiam o sangue para os ventrículos, que são as duas câmaras inferiores responsáveis por impulsionar o sangue para a circulação pulmonar ou sistêmica. Esse conjunto forma um sistema que permite o transporte de nutrientes e oxigênio para as células e a

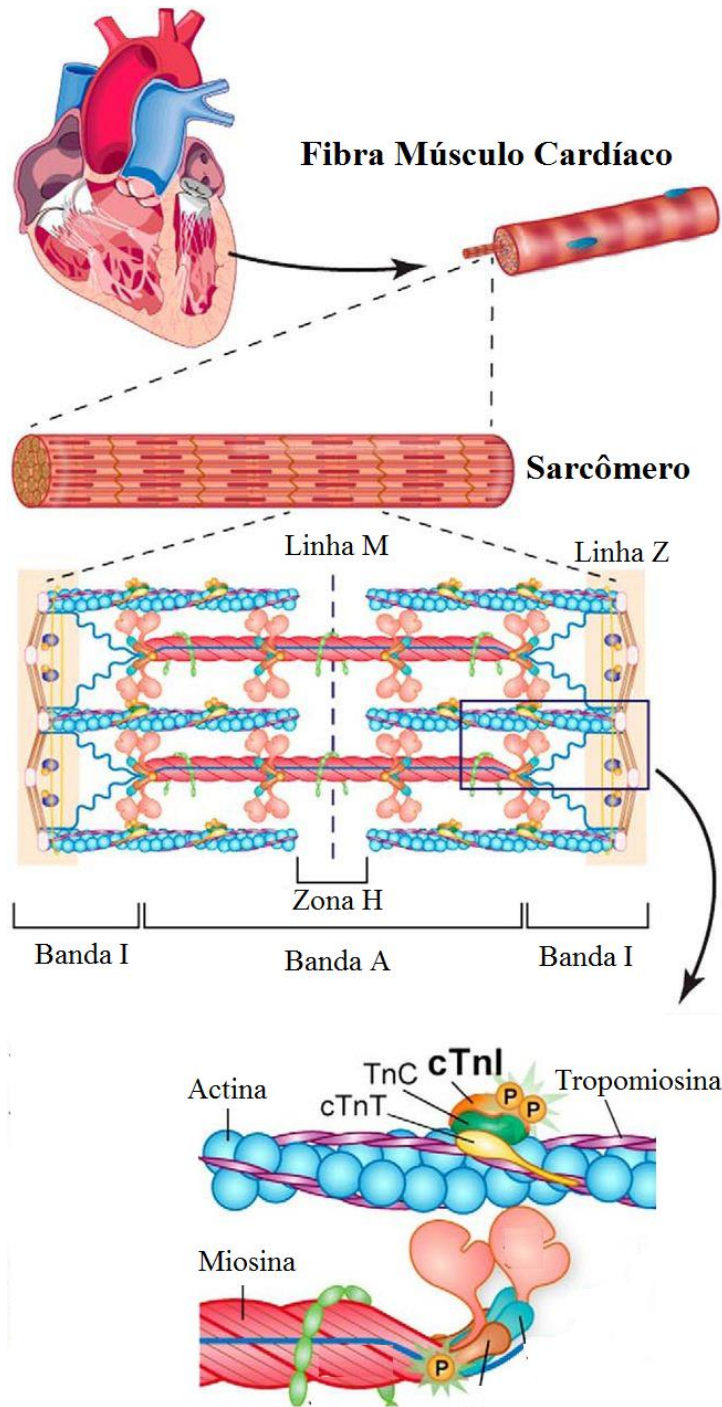
remoção de metabólitos celulares. Além disso, é responsável por estabilizar o pH, transportar e liberar hormônios e peptídeos, assim como manter a homeostase e a temperatura corporal (5).

Deficiências nos mecanismos que controlam a função cardíaca, como sua contratilidade e frequência de despolarização do nó sinoatrial, podem produzir patologias cardiovasculares como a hipertensão e a insuficiência cardíaca (6). Com isso, as células submetidas a estresses fisiológicos excessivos ou patológicos modulam suas funções e viabilidade por meio de adaptações fisiológicas e morfológicas, resultando na hipertrofia do coração (7).

### **1.1.1 Microestrutura contrátil do tecido cardíaco**

Os cardiomiócitos, células contráteis do coração, possuem uma estrutura especializada para cumprir, de forma eficiente, a função propulsora da bomba cardíaca. Além da contratilidade, tais células possuem especializações de membrana as quais possibilitam a contração dessas células de forma síncrona, como um sincício.

A contratilidade dos cardiomiócitos só é possível graças à unidade morfofuncional conhecida como sarcômero, o qual é formado por regiões claras (bandas I, formadas por filamentos finos) e escuras (bandas A, formadas tanto por filamentos finos quanto grossos) delimitadas pelas chamadas linhas Z. Lateralmente à unidade sarcomérica, filamentos finos e grossos se sobrepõem. Centralmente, por outro lado, observa-se a presença somente de filamentos grossos, sendo essa região denominada banda H, uma sub-região dentro da banda A (Figura 2).



**Figura 2: Estrutura e processo de contração do sarcômero da fibra muscular cardíaca.** Representação da unidade morfofuncional, com as regiões formadas pelas bandas claras e escuras, que são delimitadas pela linha Z. Na parte inferior é demonstrado o processo de contração muscular, que envolve as proteínas actina, miosina, tropomiosina e troponina, além das moléculas de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi). Modificado de Peng e colaboradores (8)

Os filamentos finos são formados principalmente pela proteína actina. Essa proteína tem uma organização peculiar, estando complexada às proteínas troponina e tropomiosina, as quais agem como reguladoras da contração

muscular. Esse papel regulador funciona da seguinte forma: a tropomiosina cobre os sítios de ligação da actina com a miosina. Na presença de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), a troponina desloca a tropomiosina desses sítios de ligação, permitindo a interação actina-miosina e, portanto, a formação de pontes cruzadas (Figura 2).

Os filamentos grossos, por sua vez, são formados pela proteína miosina. Estruturalmente, a miosina é formada por duas partes: a “cauda” e a “cabeça”, que possui uma atividade enzimática do tipo ATPase, além de ser a parte que interage com os sítios de ligação na actina, como mostrado na Figura 2. Quando a cabeça da miosina hidrolisa o ATP, o ADP e fosfato inorgânico ( $\text{Pi}$ ) resultante se ligam nessa estrutura da miosina (configuração de alta energia). O fenômeno da contração ocorre devido à formação das pontes cruzadas e ao subsequente movimento dessas pontes com deslizamento entre a “cabeça” da miosina com a actina, encurtando a distância entre as linhas Z adjacentes. As pontes cruzadas são desfeitas na presença de ATP (configuração de baixa energia) que, após a sua hidrólise em ADP e  $\text{Pi}$ , o ciclo pode ser reiniciado, caso haja  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Sendo assim, durante o relaxamento muscular, quando a concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  é baixa, a troponina e a tropomiosina formam um complexo que impede a ligação actina-miosina (9, 10).

### **1.1.2 Excitabilidade do miocárdio**

Juntamente com a contratilidade, o miocárdio possui outra propriedade que o torna um tecido eficiente no bombeamento de sangue: a excitabilidade. Localizado na junção entre o átrio direito e a veia cava superior, o nó sinoatrial (NSA) é o marca-passo primário dos batimentos cardíacos. Essa estrutura é formada por uma massa de miócitos especializados na geração de impulsos elétricos (são células autoexcitáveis que disparam potenciais de ação (PA) independente de estímulos externos).

Uma vez gerado um PA no NSA, esse se propaga através dos átrios, promovendo a sístole (contração) atrial, e pelas fibras de condução até o nó átrio-ventricular (NAV), localizado no átrio direito entre o seio coronariano e o septo interatrial. A partir do NAV, o PA cardíaco trafega ao longo do feixe átrio-ventricular (Feixe de His) até as fibras de Purkinje, as quais conduzem o PA ao

longo de todo o miocárdio ventricular, promovendo a sístole ventricular do ápice do coração em direção à base, o que garante a eficiência na ejeção sanguínea (11, 12).

### **1.1.3 Canais iônicos e o potencial de ação**

Para que ocorra a excitação (geração do PA) e, desse modo, a contração dos cardiomiócitos, deve haver correntes iônicas fluindo através de canais específicos na membrana sarcoplasmática, que se abrem e fecham de forma ordenada. A geração do PA pelo NSA ocorre porque essas células apresentam um canal iônico especial, denominado  $I_f$ , que permite a despolarização lenta durante a fase de repouso (fase 4, Tabela 1). Quando o potencial de membrana atinge o seu limiar de ativação, ocorre a despolarização dessas células, com o influxo de  $Ca^{2+}$  (fase 0). Na repolarização (fase 3), a corrente de  $Ca^{2+}$  cessa, iniciando a abertura de canais de  $K^+$ -voltagem dependente ( $K_v$ ) e consequente efluxo desse íon.

Nas células contráteis do coração (cardiomiócitos), essas fases do PA são diferentes. Neste caso, a despolarização (fase 0) só ocorre na presença de um PA (gerado pelas células do NSA e transmitido pelo sistema especializado). Nesta fase, ocorre o influxo de  $Na^+$ , mediante abertura de canais voltagem-dependente ( $Na_v$ ). A fase 1, também chamada de repolarização inicial (efluxo de  $K^+$ ), é sucedida pela fase 2 ou platô, onde ocorre a estabilização do potencial de membrana positivo (despolarizado) devido ao influxo de  $Ca^{2+}$ , igualando as correntes de influxo ( $i_{Ca^{2+}}$ ) e efluxo ( $i_{K^+}$ ). Inclusive, parte do  $Ca^{2+}$  utilizado na contração vem do meio extracelular, em um processo denominado acoplamento excitação-contração. Outra parte do  $Ca^{2+}$  usado na contração dos cardiomiócitos vem de estoques intracelulares, como consequência de alterações no potencial elétrico da membrana sarcoplasmática. A repolarização dos cardiomiócitos (fase 3) é igual a das células do NSA, ocorrendo o efluxo de  $K^+$ . Cessado o PA, o cálcio é recuperado do citoplasma para reservas internas (o retículo sarcoplasmático), cessando o fenômeno da contração (11-14) (Figura 3).

**Tabela 1: Características das fases do potencial de ação e principais correntes iônicas**

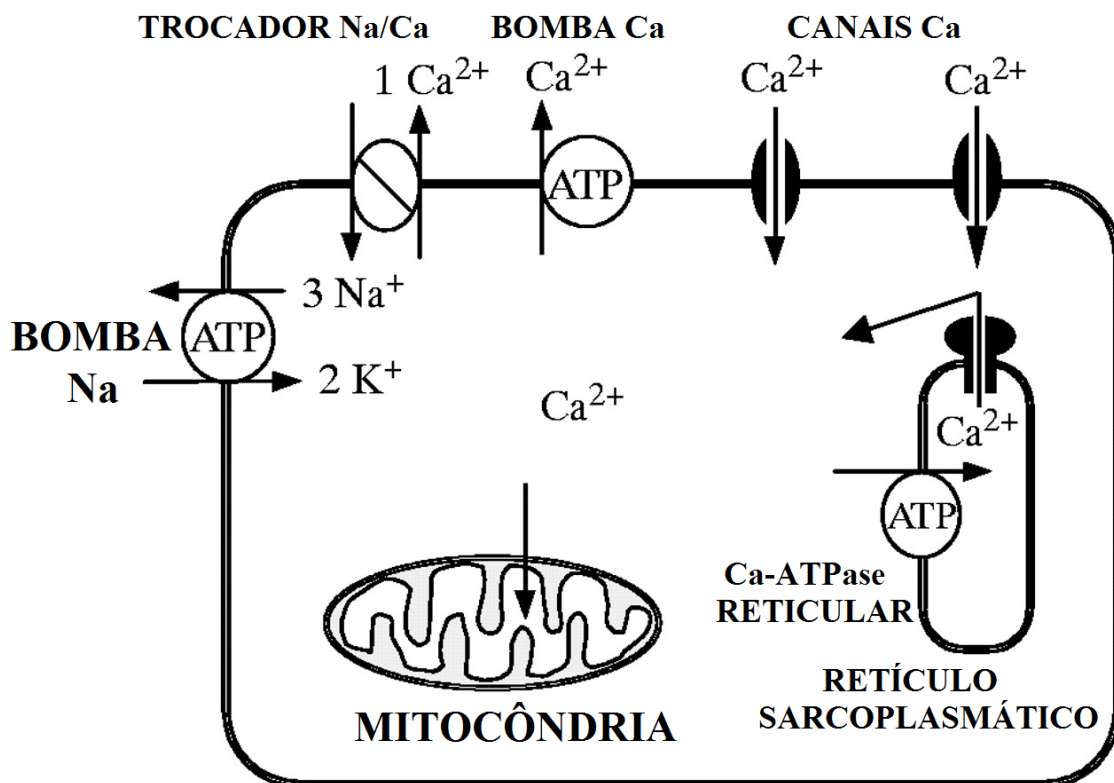
Fases	Características	Principais Correntes Iônicas (i)
<b>Fase 0 (despolarização)</b>	<b>NSA / NAV:</b> Despolarizam devido a corrente de influxo de $\text{Ca}^{2+}$	$i_{\text{Ca}^{2+}}$
	<b>Cardiomiócitos:</b> Despolarizam rapidamente devido à ativação de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) e influxo maciço de $\text{Na}^+$	$i_{\text{Na}^+}$
<b>Fase 1 (repolarização inicial)</b>	Ocorre apenas nos cardiomiócitos. Efluxo inicial de $\text{K}^+$ através de canais Kv	$i_{\text{K}^+}$
<b>Fase 2 (platô)</b>	Ocorre apenas nos cardiomiócitos. Corrente de efluxo de $\text{K}^+$ (Kv) é igual a corrente de influxo de $\text{Ca}^{2+}$ (CavL)	$i_{\text{Ca}^{2+}} = i_{\text{K}^+}$
<b>Fase 3 (repolarização final)</b>	<b>NSA / NAV:</b> Efluxo de $\text{K}^+$ via canais voltagem-dependentes (Kv)	$i_{\text{K}^+}$
	<b>Cardiomiócitos:</b> Com a inativação dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ , e do aumento da condutância para o $\text{K}^+$ , promovida pelas correntes de potássio lentas, o potencial de membrana volta para valores negativos.	$i_{\text{K}^+}$
<b>Fase 4 (repouso da membrana)</b>	<b>NSA / NAV:</b> Aumento lento do potencial de membrana devido ao influxo de cátions pelo canal $I_f$ (principalmente $\text{Na}^+$ ). Mesmo estando em repouso, essas células se despolarizam lentamente.	$i_{\text{Na}^+}$
	<b>Cardiomiócitos:</b> Grande parte dos canais dependentes de voltagem estão inativos e somente contribuem ativamente os canais HCN (canais catiónicos não seletivos ativados pela hiperpolarização da fase 3).	$i_{\text{Na}^+} = i_{\text{K}^+}$

#### 1.1.4 Acoplamento excitação-contração

Conforme mencionado, o disparo do PA nos cardiomiócitos é o evento causador do processo de contração muscular. Ou seja, há um evento elétrico desencadeando fenômenos bioquímico (a formação das pontes cruzadas) e

físico (o encurtamento dos sarcômeros). Esse processo é conhecido como “acoplamento excitação-contração” e depende principalmente do cátion  $\text{Ca}^{2+}$  (15, 16)

À medida que o PA cardíaco viaja ao longo da membrana do cardiomiócito, e chegando nas estruturas denominadas túbulos T (invaginações da membrana plasmática), o PA ativa os canais  $\text{CavL}$ , através dos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular penetra no citoplasma. Com isso, eleva-se a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, o que resulta na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por cálcio, ou seja, o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ativa receptores rianodina (RyR) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), permitindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  estocado nessa organela seja liberado para o citoplasma (17, 18), como demonstrado na Figura 3.



**Figura 3: Esquema do cálcio intracelular no processo de acoplamento excitação- contração.** Para a contração muscular, o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular penetra no citoplasma após o potencial de ação alcançar os túbulos T, localizados na membrana plasmática. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular induz a liberação de mais  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático, onde esse cátion promove a formação das pontes cruzadas e a contração do músculo. Para retornar ao estado de repouso, os cátions  $\text{Ca}^{2+}$  são bombeados para o retículo sarcoplasmático pelas proteínas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase reticular (SERCA) e por meio do uniporter mitocondrial. Além disso, esse  $\text{Ca}^{2+}$  é retirado para o meio extracelular pela ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  e pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . A bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

reestabelece as concentrações citoplasmática ( $K^+$ ) e extracelular ( $Na^+$ ) destes íons. Modificado de Wang e colaboradores (19)

Para que a contração muscular cesse, e a miofibrila entre no estado relaxado, os cátions  $Ca^{2+}$  são bombeados do citoplasma de volta para os estoques internos (no RS). Como representado na Figura 3, esse transporte é mediado por diferentes proteínas presentes na membrana do RS, sendo as principais a  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (20, 21).

Sozinha, a SERCA é responsável por em média 80% da reabsorção do  $Ca^{2+}$  citoplasmático. Essa proteína com atividade ATPásica executa o transporte ativo, ou seja, há gasto energético para que o  $Ca^{2+}$  seja reconduzido de volta ao RS. A outra proteína transportadora mencionada, o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  recaptura em média 10% do  $Ca^{2+}$ , enquanto o restante dos cátions é recapturado por transportadores mitocondriais ou ejetados para fora da célula (22, 23). Uma vez que a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  está baixa, as moléculas de troponina voltam a inibir a formação das pontes cruzadas (interação actina-miosina).

### **1.1.5 Estimulação $\beta$ -adrenérgica**

O sistema nervoso autônomo (SNA) promove a regulação de diversos processos fisiológicos em praticamente todos os órgãos e sistemas. Suas duas divisões, simpática e parassimpática, emitem ramos nervosos para o coração e modulam (i) a frequência cardíaca, modulando a geração de PAs no NSA; (ii) a velocidade de condução do PA pelo sistema condutor, principalmente no NAV; e (iii) a capacidade propulsora do coração (força contrátil dos cardiomiócitos). O aumento do tônus simpático cardíaco induz a ativação de receptores adrenérgicos (AR) do subtipo  $\beta_1$ , o principal subtipo de AR no coração. Os ARs são receptores acoplados à proteína G possuindo, portanto, sete domínios transmembrana (24, 25).

As proteínas G são heterotriméricas, ou seja, formadas por três subunidades distintas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Antes de o receptor ser ativado por um ligante, um agonista do receptor  $\beta$ -adrenérgico, por exemplo, a epinefrina (Figura 6), a

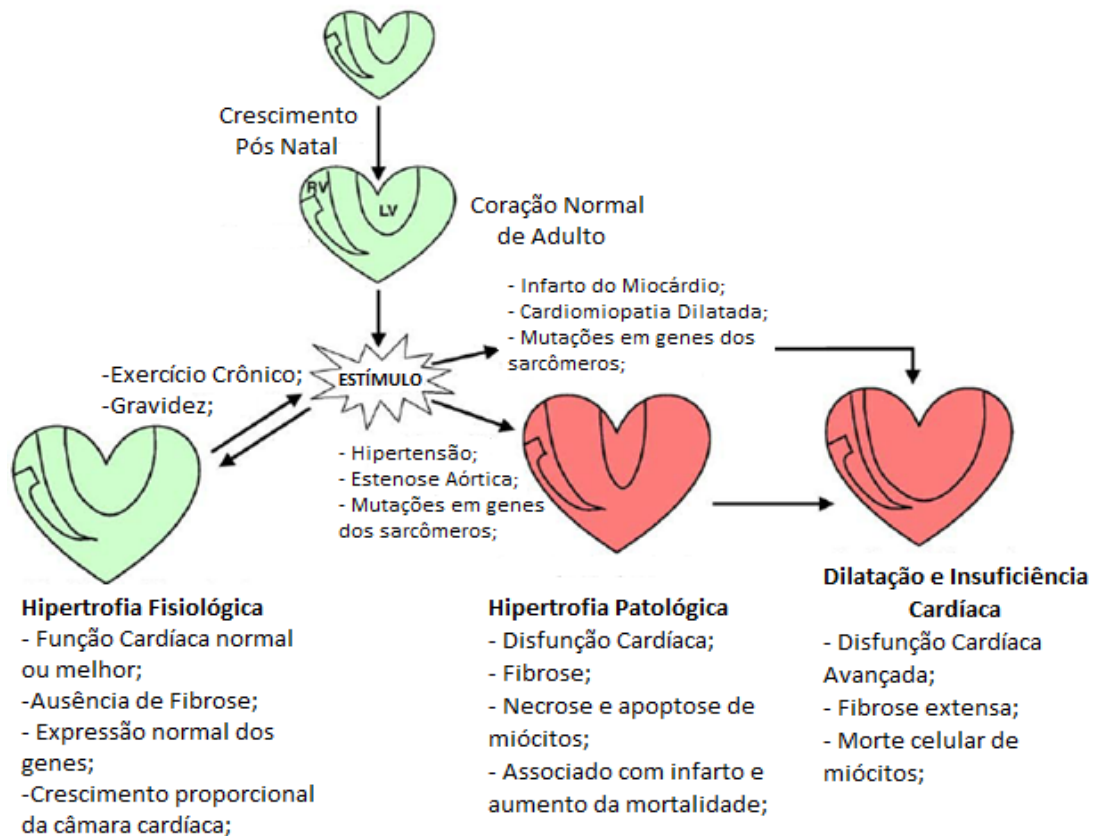


subunidade  $\alpha$  está ligada a uma molécula de guanosina difosfato (GDP) na superfície interna da membrana plasmática. Após a ativação do receptor, ocorre uma alteração conformacional na proteína G, que libera o GDP e se liga a guanosina trifosfato (GTP), fazendo com que a subunidade  $\alpha$  se desligue do dímero  $\beta\gamma$  e promova a ativação da enzima adenilato ciclase. Essa enzima cataliza a ciclização de moléculas de adenosina monofosfato (AMP), formando o AMP cíclico (AMPc). O AMPc é um importante segundo mensageiro, que ativa a fosfoquinase A (PKA), enzima que fosforila e modula alvos específicos no meio intracelular (26). No coração, a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) e, conseqüentemente, da PKA, promove uma cascata de reações que resulta nos efeitos inotrópico e cronotrópico positivos, ou seja, há um aumento da frequência cardíaca e da força de contração do miocárdio. Esses efeitos estão ligados ao aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando é deflagrado o PA cardíaco (27).

#### **1.1.6 Hipertrofia Cardíaca**

A hipertrofia cardíaca é uma adaptação do tecido ao aumento do débito cardíaco (volume de sangue bombeado pelos ventrículos por minuto), a indução hormonal ou ao elevado volume e/ou carga pressórica. Isso eleva a massa cardíaca por causa do aumento das dimensões dos cardiomiócitos e do estroma conjuntivo (28, 29).

Existem dois tipos de hipertrofia cardíaca, a fisiológica e a patológica (Figura 4). Na primeira situação, ocorre um aumento modesto da parede do ventrículo esquerdo devido a uma necessidade maior de energia pelo tecido por tempo determinado, como acontece com atletas e gestantes. Nesse caso não se observa acúmulo de proteínas fibrosas (colágeno, por exemplo), no miocárdio, arritmias, nem a falência do órgão cardíaco, ou seja, não há o comprometimento da saúde do indivíduo, pelo contrário, ocorre uma melhora da função cardíaca (30, 31).



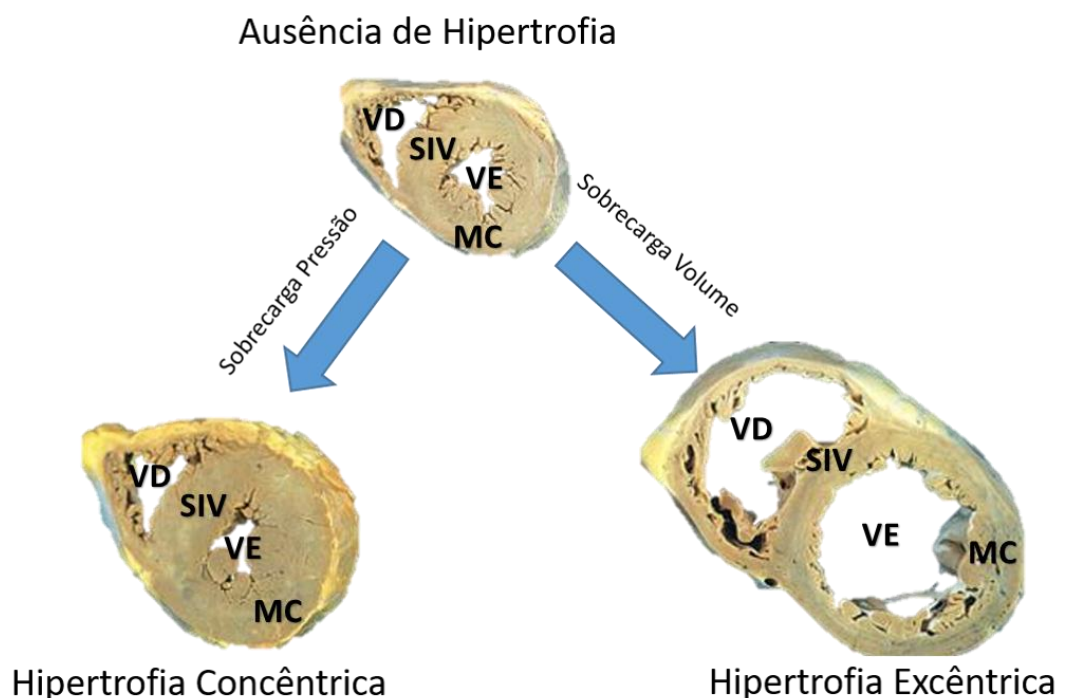
**Figura 4: Diferenças entre hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.** Processo de desenvolvimento do coração normal adulto e os estímulos que podem induzir a hipertrofia fisiológica, patológica ou dilatação com insuficiência cardíaca. Fonte: Bernardo e colaboradores (32)

Já na hipertrofia patológica, ocorre um aumento da produção de colágeno e deposição de proteínas (fibronectina e laminina) da matriz extracelular (ECM) no interstício do miocárdio devido a necrose dos cardiomiócitos. A substituição do tecido cardíaco por um fibroso resulta no aumento do volume dos cardiomiócitos para compensar a insuficiência cardíaca resultante desse processo patológico. A hipertrofia patológica pode ainda ser subdividida em duas condições: a excêntrica e a concêntrica (Figura 5).

Na hipertrofia patológica excêntrica, o coração está submetido a uma sobrecarga volumétrica, que provoca uma 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 (33, 34). Essa condição leva a um desequilíbrio entre a relação

carga/massa do coração, fazendo com que ocorra uma insuficiência em manter o débito cardíaco necessário para suprir as demandas do organismo.

A segunda condição, a hipertrofia patológica concêntrica, é resultado de uma sobrecarga de pressão que promove o aumento da espessura da parede do ventrículo sem, no entanto, ampliar a cavidade ventricular (35). 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 uma insuficiência cardíaca (36).



**Figura 5: Tipos de hipertrofia patológica.** Relação da sobrecarga de pressão e volume com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca dos tipos concêntrica e excêntrica. Corte no plano sagital do coração evidenciando os dois ventrículos. VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito; MC, músculo cardíaco (miocárdio); SIV, septo interventricular. **Tecido cardíaco humano.** Modificado de Abbas e colaboradores (37)

Dentre as possíveis condições que induzem o remodelamento cardíaco está o excesso de catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina), representadas na Figura 6 (29). A elevação dos níveis séricos de catecolaminas, bem como o aumento do tônus simpático no coração, resulta em ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR), o que promove a taquicardia

e o aumento da força contrátil do miocárdio (38, 39). Todavia, a ativação contínua dos  $\beta$ -AR tem como consequência uma hipertrofia cardíaca patológica, com disfunção ventricular, apoptose e insuficiência cardiovascular (40, 41). Sendo assim, o aumento da atividade simpático-catecolaminérgica sobre o tecido cardíaco contribui para a progressão de patologias e maior morbidade e mortalidade.

A maior ativação da PKA, como resultado da estimulação dos  $\beta$ -AR, estimula uma maior expressão dos receptores RyR no RS. Com o tempo, e o aumento progressivo da expressão desses receptores, gradualmente ocorre a depleção dos estoques internos de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a diástole (relaxamento) ventricular, uma vez que esse cátion começa a “vazar” pelos inúmeros receptores expressos, reduzindo a contratilidade celular. Consequentemente, o RS entra em “estresse”, induzindo às alterações típicas da hipertrofia patológica: isquemia, dilatação das câmaras ventriculares e insuficiência cardíaca (40-43).

Durante o processo de hipertrofia, genes que são característicos do período embrionário para o desenvolvimento do coração são ativados novamente, como por exemplo, o gene da  $\alpha$ -actina esquelética e da cadeia pesada da miosina do tipo  $\beta$ . Essa ativação ocorre justamente para aumentar a massa muscular cardíaca para compensar a insuficiência do tecido contrátil (44). A expressão e síntese de proteínas envolvidas no metabolismo energético também são aumentadas no processo de hipertrofia, tais como lactato desidrogenase, subunidade  $\beta$  da creatina quinase, além dos hormônios, peptídeo natriurético cerebral (BNP, do inglês “brain natriuretic peptide”) e atrial (ANP, do inglês “atrial natriuretic peptide”) (45, 46).

O aumento da função cardíaca, gerado por uma pressão hemodinâmica, é capaz de ativar canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, os trocadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , e as enzimas adenilato ciclase e fosfolipase C, além de inativar canais de  $\text{K}^+$ . Todos estes elementos estão associados à função contrátil do coração, no processo de acoplamento excitação-contração, descrito anteriormente, culminando no aumento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmático, evento essencial para a contração muscular (47).

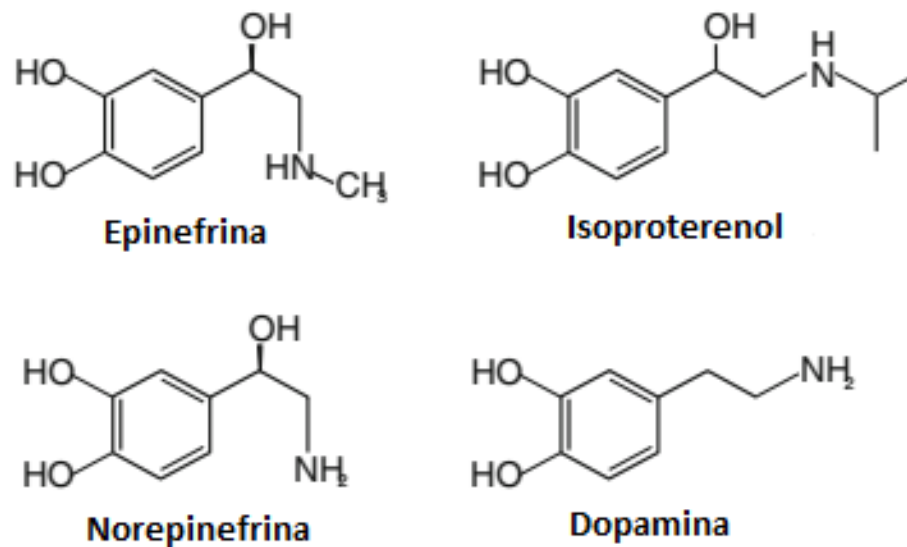
As alterações no funcionamento das proteínas formadoras de canais e trocadores levam a variações da concentração iônica no interior da célula, o que pode representar um estímulo inicial para ativação de proteínas da via MAPK, muito relacionada com a proliferação celular. A ERK, a quinase c-jun NH2-terminal (JUNK) e a quinase p38 são os principais agentes da via de sinalização hipertrófica dos cardiomiócitos, pois são capazes de ativar a transcrição de genes miogênicos (48).

A pressão mecânica também pode ativar os receptores ligados às integrinas, que estão localizados na membrana celular, entre a matriz extracelular (MEC) e o complexo de proteínas que formam a linha Z do sarcômero, onde estão localizadas tirosina-quinases coativadoras de receptores para esteroides (Src) e quinases de adesão focal (FAKs), além de outras responsáveis pelo início do processo de sinalização ativado pelas integrinas (49). A ativação de vias de proliferação e biossíntese alteram a abundância de proteínas envolvidas no processo hipertrófico. Desta forma, visando uma melhor compreensão deste processo e a identificação de potenciais alvos terapêuticos, é importante identificar as proteínas-chave nos processos de indução, manutenção e finalização de um estímulo hipertrófico fisiopatológico.

### **1.1.7 O uso de agonistas dos receptores $\beta$ -adrenérgicos e a indução da hipertrofia cardíaca**

O uso de modelos animais de cardiomiopatias é muito importante para melhor compreendermos os mecanismos moleculares envolvidos nos processos cardiopatológicos. O modelo de hipertrofia cardíaca induzida pela administração subcutânea de isoproterenol (agonista dos  $\beta$ -AR, Figura 6) é um modelo muito utilizado por vários grupos de pesquisa (50-53), pois muito se assemelha à hipertrofia patológica humana. Pelo nosso conhecimento, existem poucos trabalhos na literatura avaliando a modulação do proteoma cardíaco usando este modelo, como o publicado por Chowdhury *et al.* (53). Contudo, neste trabalho os autores identificaram apenas 37 proteínas (7 reguladas), que acreditávamos ser apenas uma pequena fração do remodelamento do proteoma induzido pelo isoproterenol. Desta forma, decidimos utilizar este

modelo no presente trabalho, visando uma melhor caracterização da hipertrofia cardíaca patológica.



**Figura 6: Estrutura química da epinefrina, norepinefrina, dopamina e isoproterenol.** Modificado de Dietrichs e colaboradores (54)

## 1.2. *Proteoma*

O termo “proteoma” define o conjunto de proteínas presentes em uma determinada célula ou tecido e em um dado momento, tendo sido utilizado pela primeira vez pelo então estudante de doutorado australiano Marc Wilkins em 1994 (55). O ramo da ciência que estuda proteomas é denominado proteômica e engloba tecnologias analíticas, como eletroforese bidimensional, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), e ferramentas de bioinformática, que são utilizadas em conjunto para analisar, identificar e quantificar proteínas presentes em sistemas biológicos (56). Como o proteoma é dinâmico, ele reflete o estado funcional de células e tecidos, em resposta a estímulos externos e processos fisiopatológicos (57).

### **1.2.1. Métodos de separação de proteínas e peptídeos**

Antes das proteínas serem analisadas pela espectrometria de massa, técnicas de fracionamento são utilizadas para permitir a separação e/ou enriquecimento/depleção de proteínas e peptídeos. A eletroforese bidimensional permite a separação de proteínas intactas em duas etapas: (1) na focalização isoeletrica, as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH e param de migrar quando atingem o seu ponto isoeletrico, ou seja, quando a carga elétrica líquida se iguala a zero; (2) na segunda etapa, um campo elétrico perpendicular ao da focalização isoeletrica é aplicado em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), que carrega negativamente as proteínas, permitindo que as mesmas migrem em direção ao polo positivo, sendo a velocidade de migração inversamente proporcional as massas moleculares (58-61).

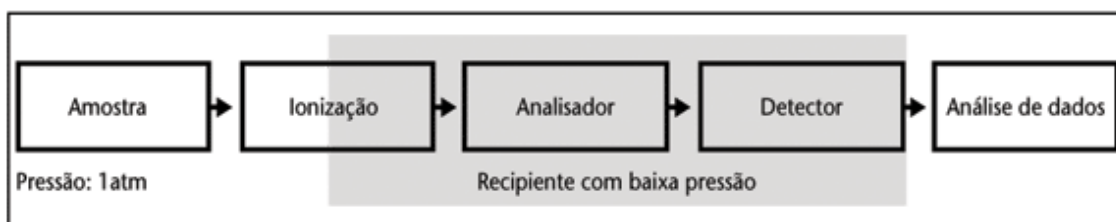
A cromatografia líquida de fase reversa é outra técnica de fracionamento amplamente utilizada antes da análise por espectrometria de massa. Nesse sistema, uma fase móvel polar e outra fase estacionária apolar permitem a separação das moléculas com base na sua hidrofobicidade. O fracionamento resulta na diferença do tempo de retenção desses compostos, sendo maior para moléculas apolares, que interagem mais fortemente com a fase estacionária durante o processo de eluição, utilizando concentrações crescentes de um solvente apolar. A cromatografia líquida de fase reversa é muito utilizada acoplada a espectrometria de massa, pois é reprodutível, eficiente, apresenta uma alta resolução de separação de frações, e as fases móveis são compatíveis com a espectrometria de massa (61-63).

### **1.2.2. Espectrometria de Massa (MS)**

A espectrometria de massa (MS) é um método de alta acurácia que permite a separação e detecção de compostos orgânicos ou inorgânicos com base nas razões de massa por carga ( $m/z$ ) e, com isso, pode-se obter uma análise qualitativa ou quantitativa dessas moléculas (64). Existem vários tipos de

espectrômetros de massa, que variam quanto a fonte ionizadora das moléculas (MALDI ou ESI), os analisadores de massa (orbitrap, iontrap, quadrupolo (Q) e tubo de vôo (TOF)), e os tipos de detectores (multiplicadores de elétrons, MCP, etc).

O espectrômetro de massa é formado basicamente por quatro partes (Figura 7): fonte de ionização, analisador de massa, detector e sistema de aquisição de dados. O sistema de ionização é responsável pela vaporização e carregamento elétrico dos analitos, ou seja, as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. O analisador separa os analitos que são acelerados no campo eletromagnético de acordo com suas relações  $m/z$  para serem apresentados ao detector (65-67). Os íons de cada razão  $m/z$  separados pelo analisador são registrados pelo detector que converte os sinais captados em sinais elétricos. Estes sinais são convertidos em analógico/digital e enviados para um computador que compõe o sistema de aquisição de dados (68).



**Figura 7: Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massa.** Os analitos da amostra são vaporizados e carregados eletricamente pela fonte de ionização. O analisador promove a separação por meio da relação  $m/z$  dos íons que são registrados pelo detector. Os sinais captados são convertidos para serem analisados pelo sistema de aquisição de dados. Fonte: Carvalho e colaboradores (69)

O desenvolvimento de técnicas de ionização branda por ESI (“electrospray ionization”) e MALDI (“matrix-assisted laser desorption/ionization”), no fim dos anos 80, permitiu a utilização da espectrometria de massa para análise de moléculas maiores como peptídeos e proteínas (66, 70). O MALDI é uma técnica em que a amostra é cristalizada na presença de uma matriz formada por um ácido fraco de baixa massa molecular (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico, por exemplo) que é capaz de absorver radiação UV. Durante a radiação, a matriz se volatiliza e doa prótons para as moléculas co-



cristalizadas, ionizando-as (71, 72). Já no ESI, o analito em solução (pH ácido) e protonado é pulverizado em micro-gotículas por uma agulha metálica ou metalizada submetida a um forte campo elétrico (cone de Taylor), formando um aerossol de gotas carregadas positivamente e o solvente presente nas gotas é evaporado por gás inerte aquecido. A repulsão eletrostática (forças de Coulomb), devido à grande densidade de cargas positivas, excede a tensão superficial da água, forçando os íons a entrarem em estado gasoso (73, 74).

Atualmente existe uma infinidade de tipos de analisadores, sendo os mais comuns o quadrupolo, a armadilha de íons (“iontrap” ou “orbitrap”) e o analisador por tempo de voo ou TOF (do inglês, “Time Of Flight”). O quadrupolo possui dois pares de hastes hiperbólicas e redondas em paralelo que recebem voltagens diferentes (DC e RF), resultando em polaridades invertidas. Assim sendo, apenas íons estáveis, ou que apresentam uma determinada razão  $m/z$  e ressonância com o campo aplicado nas barras, serão selecionados e sujeitos a fragmentação (75). O analisador do tipo armadilha de íons é resultado da influência de um campo eletrostático de um eletrodo que aprisiona os íons em frequências de oscilação relativas à razão  $m/z$ , que é calculada a partir do sinal da corrente detectada de cada íon (61, 65, 76). Já o analisador TOF permite a determinação  $m/z$  a partir das diferentes velocidades que os íons percorrem um longo tubo de tamanho específico, ou seja, se baseia na proporcionalidade entre o tempo entre o início (entrada no TOF) e a chegada ao detector, sendo este tempo proporcional a relação  $m/z$  (65).

A combinação de analisadores em sequência permitiu aos instrumentos isolar, fragmentar e analisar os íons fragmentados a partir de  $m/z$  específicos, em uma técnica chamada “MS em tandem” ou “MS/MS”. Existem vários tipos de técnicas para a fragmentação de biomoléculas, sendo a mais comum a dissociação induzida por colisão (em inglês, “Collision-Induced Dissociation” ou CID). No primeiro momento, a excitação do íon deriva da conversão de energia resultante do choque com o gás inerte. Em seguida, esse íon excitado se decompõe em íons de menor massa, que podem fragmentar em imônios(61, 64).

### **1.2.3. Estratégias proteômicas**

A abordagem proteômica mais utilizada é o “*bottom-up*”, onde as proteínas extraídas são digeridas (proteólise) em peptídeos, que são mais facilmente separados, ionizados e analisados pela espectrometria de massa. Essa digestão é realizada por enzimas que apresentam especificidade de clivagem entre diferentes resíduos de aminoácidos como, por exemplo, a tripsina, que cliva após resíduos de arginina e lisina na região C-terminal.. Essa clivagem facilita a ionização dos peptídeos tripticos por proporcionar mais um sítio de protonação (61, 77).

Após a digestão, a mistura complexa de peptídeos passa por processos de separação simples ou combinados que permitem a análise pelo espectrômetro de massa de poucos peptídeos por vez. A identificação desses peptídeos é feita pela comparação entre os espectros teóricos, gerados por fragmentação *in sílica* de sequências de proteínas de banco de dados, com os espectros experimentais, obtidos pela espectrometria de massa. Isso é possível a partir de busca em banco de dados (database search) chamado PSM (“peptide spectrum match”), onde uma lista de prováveis candidatos é apresentada, respeitando alguns parâmetros, como taxa de falsos positivos FDR (“false discovery rate”) ou fatores empíricos como critério de Washburn (61, 78, 79).

### **1.2.4. A proteômica e o sistema cardiovascular**

A proteômica tem sido utilizada para estudar, por exemplo, a modulação do proteoma em resposta ao envelhecimento, atividade física, tumores e doenças cardiovasculares, permitindo mapear vias metabólicas e identificar potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos (80-82).

A partir da década de 2000, abordagens proteômicas foram utilizadas para avaliar como o proteoma cardíaco era modulado em respostas ao infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatias e insuficiências do coração. Tais estudos indicaram uma expressão alterada de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, proteínas de choque térmico, do citoesqueleto, do sistema redox e homeostase do cálcio (83-86).

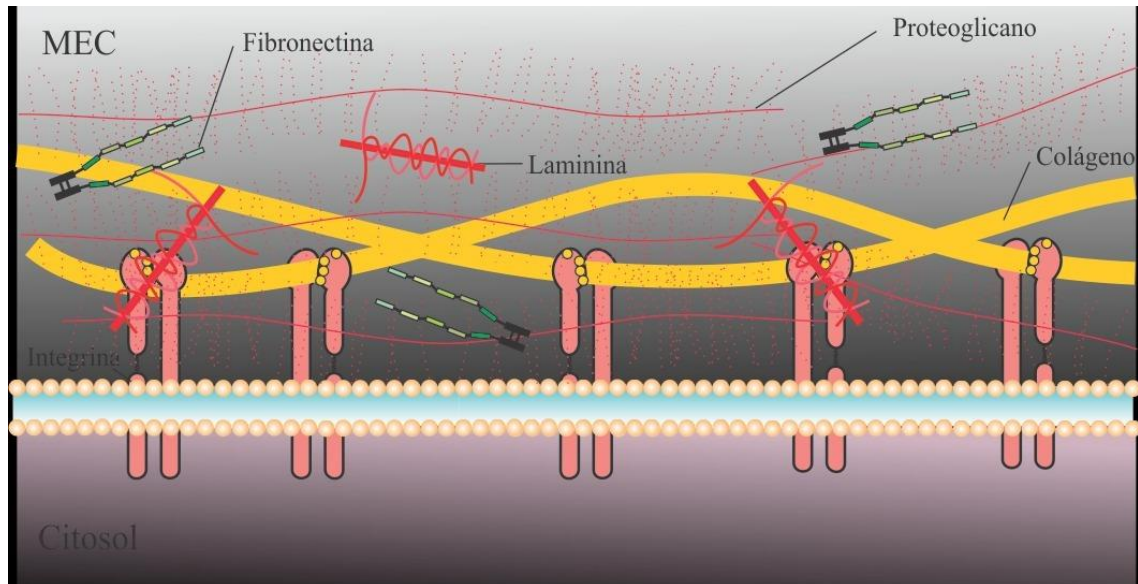
O remodelamento cardíaco é um fenômeno caracterizado por alterações moleculares e celulares, as quais levam a mudanças morfofisiológicas no coração (87). Um exemplo de remodelamento cardíaco é a hipertrofia ventricular esquerda (HVE), associada ao aumento sustentado do tônus simpático do sistema nervoso autônomo (SNA) (88).

Um fato interessante do remodelamento cardíaco é que, mesmo após a regressão desse fenômeno, como a ocorre nos casos de HVE após o tratamento por longo prazo com anti-hipertensivos, o proteoma do miocárdio continua contendo um número significativo de proteínas características do coração hipertrofiado (89). Conforme mencionado, tais alterações podem afetar proteínas envolvidas no metabolismo energético, prejudicando o funcionamento adequado do órgão (83, 90, 91).

De todos os modelos de estudo da hipertrofia cardíaca, o mais difundido se baseia no uso do medicamento simpatomimético isoproterenol, o qual induz hipertrofia graças à estimulação contínua do SNA simpático (92). A exposição ao isoproterenol, e, conseqüentemente, a ativação contínua de receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos, desencadeia no tecido o aumento da síntese proteica e da expressão de proto-oncogenes que levam à manifestação da hipertrofia (93). Variações na expressão proteica miocárdica podem servir como alvos terapêuticos ou mesmo como critério diagnóstico (possíveis biomarcadores, um exemplo é a proteína mitocondrial proibitina cuja expressão reduzida pode ser associada com a hipertrofia cardíaca) (53). Apesar do tratamento com isoproterenol ser um modelo de hipertrofia patológica muito utilizada, poucos trabalhos estudou este modelo com técnicas proteômicas (32, 53, 83, 94).

### **1.3. Matriz Extracelular**

A matriz extracelular (MEC) corresponde ao conjunto de moléculas que dão suporte bioquímico e estrutural às células. A MEC é composta por fatores solúveis, como 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 glicoproteínas (por exemplo, proteoglicanos) (95) (Figura 8).



**Figura 8: Componentes da Matriz Extracelular.** Representação das proteínas de adesão (integrinas), especializadas (laminina e fibronectina), estruturais (colágeno) e glicoproteínas (proteoglicanos) que influenciam na rigidez, permeabilidade e elasticidade da matriz, além de participarem dos processos de diferenciação e migração celular. Modificado de Santos e colaboradores (96)

A rede de colágeno é formada por fibras que se aglomeram em forma de hélice tripla e interagem com as integrinas, que são proteínas de adesão presentes na membrana plasmática e que permitem a comunicação entre as células e a matriz extracelular (97).

Os proteoglicanos são proteínas densamente glicosiladas que promovem uma maior rigidez à matriz, além de influenciar na permeabilidade do tecido conjuntivo (98). A fibronectina é uma glicoproteína que pode se ligar às integrinas ou estabelecer ligações com outras moléculas da matriz, como o colágeno. A proteína laminina está associada à membrana basal e interage com as integrinas e outros componentes da superfície da célula, permitindo a ligação das células ao colágeno (99).

Por muito tempo, a MEC foi considerada apenas um arcabouço para as células, servindo também como apoio estrutural aos tecidos. Entretanto, hoje se sabe que a MEC interage com as células tanto física quanto quimicamente, modulando processos celulares, como por exemplo, proliferação, adesão, migração, sobrevivência e secreção proteica (95, 100).

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 (101-103).

### **1.3.1 Matriz descelularizada**

Inúmeros estudos proteômicos, envolvendo diversas situações clínicas, utilizaram tecidos intactos, fornecendo informações significativas a respeito do perfil proteico celular (104-106). Porém, essa abordagem apresenta limitações para detectar proteínas extracelulares envolvidas no remodelamento da MEC, pois durante a análise das amostras por LC-MS, os íons provenientes de proteínas celulares, geralmente muito mais intensos, suprimem o sinal de íons provenientes das proteínas da MEC, dificultando a identificação destas moléculas. Isso é ainda mais evidente em tecidos com elevada taxa metabólica, como o coração, que apresenta alto conteúdo de mitocôndrias (107, 108). Além disso, as proteínas da MEC apresentam propriedades bioquímicas (agregação, ligações cruzadas e glicosilação) que dificultam sua solubilização e/ou digestão utilizando os processos de preparação de amostras usualmente utilizados em proteômica (109).

Desta forma, existe pouca informação acerca do proteoma da MEC (110). Uma solução para minimizar esta limitação pode ser através do desenvolvimento de uma metodologia alternativa que não afete a integridade da MEC e, ao mesmo tempo, possibilite o enriquecimento das proteínas da MEC, diminuindo a possível interferência de proteínas celulares. Com isso, seria possível a detecção das proteínas pelos métodos proteômicos usuais.

Além de facilitar estudos proteômicos, as MECs destituídas de células podem trazer grandes benefícios para a engenharia tecidual e medicina regenerativa (103). A produção dessas matrizes se baseia em protocolos que combinam fatores ambientais e físico-químicos que eliminam o conteúdo celular e preservam o arcabouço estrutural dos tecidos. Esse procedimento é denominado descelularização e utiliza temperatura controlada, agitação mecânica, agentes quelantes (promovem a separação célula-MEC) e

detergentes (desnaturam proteínas celulares e desestabilizam a bicamada fosfolipídica que compõe a membrana plasmática (101, 111).

Um processo eficiente resulta em materiais biológicos destituídos de células, porém a matriz extracelular deve apresentar conservada a sua composição, atividade biológica e integridade mecânica. Essa composição da matriz não produz resposta imunológica, pois suas proteínas são conservadas evolutivamente (101, 112).

Como o processo de descelularização remove o conteúdo celular e conserva a estrutura e as proteínas que compõe a MEC, estudos de proteoma em situações clínicas que alteram o perfil de proteínas podem ser estudados com maior precisão, visto que há um enriquecimento dos componentes de interesse (108, 110).

O método de enriquecimento das proteínas da MEC por meio da utilização do processo de descelularização por imersão permite avaliar os marcadores presentes na MEC, como por exemplo, no caso da indução de hipertrofia no tecido cardíaco de camundongos (108).

Na dissertação de mestrado intitulada “Análise de biomarcadores da matriz extracelular do coração de camundongos tratados com isoproterenol” foi feita a caracterização da matriz extracelular de coração murino tratado com isoproterenol (108). Nossos resultados indicavam que o processo de descelularização permitiu a remoção das células da matriz extracelular do tecido cardíaco, como demonstrado pela avaliação macroscópica, análise do conteúdo de DNA, histologia e coloração por HE e Tricômico de Masson, além da microscopia eletrônica. Tais resultados estão anexados a esta tese (Anexo 1).

#### **1.4. Justificativa**

A hipertensão está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade na população, sendo considerada um problema de saúde pública. A pressão arterial elevada é um importante fator na progressão para uma hipertrofia patológica, já que os altos níveis de pressão sanguínea nas artérias exigem

que o coração realize um maior esforço para bombear o sangue através dos vasos sanguíneos. A sobrecarga de pressão gera um 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 (113).

Um dos modelos de hipertrofia do coração mais utilizados por pesquisadores consiste na administração de isoproterenol por via subcutânea. Essa metodologia permite a produção, de forma não invasiva, de grande quantidade de amostra em um curto período de tempo (114), promovendo hipertrofia e necrose no coração (115), além de ser um modelo altamente reprodutível e de baixo custo (116).

Neste trabalho foram analisados qualitativamente os proteomas das matrizes descelularizadas proveniente de corações sadios e hipertrofiados, através da administração de isoproterenol em camundongos. Visando avaliar o impacto deste modelo de hipertrofia no remodelamento do proteoma de cardiomiócitos, foi realizado também um estudo proteômico quantitativo para identificar as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com isoproterenol.

## **1.5. Hipótese**

O processo de hipertrofia cardíaca modula o proteoma da matriz descelularizada e dos cardiomiócitos, desregulando importantes processos celulares (sistema redox, metabolismo e sinalização).

## **2. OBJETIVOS**



## **2.1. Objetivo geral**

Estudar o remodelamento do proteoma cardíaco induzido por isoproterenol em camundongos, identificando proteínas possivelmente envolvidas na hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Induzir hipertrofia no coração de camundongos machos C57BL/6WT pelo tratamento com isoproterenol;
- Realizar a descelularização da matriz do coração e identificar as proteínas por proteômica;
- Isolar os cardiomiócitos, identificar e quantificar as proteínas moduladas no processo de hipertrofia cardíaca;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo de número 288/2014.

### **3.2. Camundongos**

Os camundongos machos da linhagem C57BL/6WT foram adquiridos do Biotério Central (UFMG) e mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/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 (117, 118). O isoproterenol (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em 100µL de PBS (do inglês, “Phosphate-Buffer Saline”) e administrado por meio de injeção subcutânea. Os animais do grupo controle receberam aplicação diária de PBS proporcional a sua massa corporal.

### **3.4. 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.

### **3.5. 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 ser imprecisa, caso ocorra uma alteração do peso do animal durante o período do 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 a tíbia não sofre alterações devido a flutuações de peso em curto período de tempo.

### **3.6. Descelularização**

Os tecidos do coração (n = 5) 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., Ltda.) para limpeza do sangue presente no tecido. Em seguida essa solução foi substituída por uma solução de 0,05% EDTA, 1% IP por 10 min, a 900rpm e 37°C, visando remover o conteúdo celular. Após essa etapa, essa solução foi removida e adicionada uma solução de 1% SDS e 1% IP, sob agitação (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, retirou-se a solução de SDS e colocou-se água deionizada, a fim de remover o detergente. Essa etapa foi realizada 3 (três) vezes, por cerca de 30 min cada uma. Por fim, colocou-se uma solução de PBS, 1% IP e a matriz descelularizada foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

### **3.7. Isolamento de cardiomiócito ventricular de camundongos adultos**

Cardiomiócitos de camundongos adultos (n = 3) foram isolados de acordo com a metodologia previamente descrita por Guatimosim et al., 2001 (119). Resumidamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via

método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de  $\text{Ca}^{2+}$  (NaCl 140mM; KCl 5mM; HEPES 5mM;  $\text{MgCl}_2$  1mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,33mM; glicose 10mM e insulina 100U/mL a pH 7,40). Posteriormente, o coração foi perfundido com solução de Tyrode contendo 50 $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  e colagenase tipo 2 a 1 mg/mL. Após a etapa de digestão enzimática, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 $\mu\text{M}$  ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em solução de Tyrode.

### **3.8. *Imunofluorescência***

Os cardiomiócitos foram fixados com solução de paraformaldeído a 4% e permeabilizados com 0,5% Triton-X100. Depois do bloqueio, os cardiomiócitos fixos em lamínulas de vidro foram incubados por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo anti-faloidina conjugado com Alexa Fluor 488 (1: 100, A12379, Invitrogen), para marcação da actina-F e, com isso, visualizar o citoplasma dos cardiomiócitos. A coloração nuclear foi obtida pela incubação com 4,6-diamidino2-fenilindole (DAPI, 1:50). A área de superfície dos cardiomiócitos foi medida em células coradas com o anticorpo anti-faloidina. As imagens foram adquiridas com um sistema confocal Zeiss LSM 510 localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI – ICB, UFMG). As imagens confocais foram analisadas usando o software ImageJ.

### **3.9. *Proteoma***

#### **3.9.1 *Tecido Descelularizado***

O tecido cardíaco foi fragmentado em nitrogênio líquido utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Ao material resultante, foi adicionado tampão de lise na proporção de 1:10 (m/v), o qual continha 8M de ureia e DTT na concentração final de 10mM, além de coquetel de inibidores de protease. A mistura obtida foi incubada sob agitação de 1400rpm por 2 horas à 37°C para melhor extração das proteínas (120). Para remoção do material insolúvel, o homogenato obtido foi

centrifugado à 10000xg por 10min à temperatura ambiente. O conteúdo proteico do sobrenadante (extrato solúvel) foi quantificado utilizando-se o kit de dosagem de proteína Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific®), conforme as indicações do fabricante. As amostras foram submetidas a eletroforese em Gel de SDS-PAGE de 8%, a 150V no tempo de 1h20min. Após a separação das bandas, essas foram cortadas e submetidas ao protocolo de digestão em gel. As bandas foram incubadas com solução descorante (metanol 50% + ácido acético 2,5%) por 1h e desidratadas com acetonitrila. Em seguida foi realizado a redução e alquilação. Esse processo foi realizado pela incubação sequenciada com DTT (10 mM), e posteriormente iodoacetamida (50 mM). A seguir, foi adicionado a tripsina (20ng/uL) (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade Promega) em 1000uL de bicarbonato de amônio (50mM) overnight (37°C) para digestão das proteínas.

Utilizou-se ácido fórmico 5% para extração das proteínas e as amostras foram agrupadas e concentradas a vácuo. As amostras foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) e analisadas por LC-MS.

### **3.9.2 *Cardiomiócitos***

Para extrair as proteínas dos cardiomiócitos, foi adicionado 50 µL do tampão de lise contendo ureia 6M, tiourea 2M; TCEP (cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina) 10mM, cloroacetamida 40mM, TEAB (bicarbonato de trietilamônio) 20 mM, IP (Complete Mini, EDTA-free). Em seguida, a amostra foi sonicada durante 15 segundos (2 ciclos) em banho de gelo, usando um micro-sonicador introduzida dentro da amostra, e incubada por 2h a temperatura ambiente. Após essa etapa, foi realizada a quantificação das proteínas por método fluorescente (Qubit, Thermo). A seguir, diluiu-se a amostra 10 vezes em TEAB e foi adicionada a enzima tripsina (Promega) na proporção 1:50 (enzima / proteínas). A reação enzimática foi realizada por 16h em temperatura ambiente. Após essa etapa de digestão, as amostras foram dessalinizadas com microcolunas de C-18 empacotadas em ponteiros P10 (ZipTip Pipette Tips resina C18; P10 - Merck-Millipore) e armazenadas em freezer a -20°C até serem analisadas por LC-MS<sup>E</sup>.

### **3.10. *Espectrometria de Massa***

A análise qualitativa do proteoma da matriz descelularizada foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Adriana Franco Paes Leme, pesquisadora no Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS), que pertence ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energias e Materiais (CNPEM). Utilizamos para a análise o espectrômetro de massa Q-TOF Premier (Waters), com fonte de nanoelectrospray acoplado a cromatografia líquida de ultra desempenho e nano fluxo (sigla em inglês, nanoUPLC, Waters). O gradiente foi de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico durante 45 min para as proteínas digeridas, e 60 min para peptídeos endógenos. A tensão de nanoelectrospray foi ajustada para 3,5 kV, uma tensão de cone de 30 V e temperatura da fonte de 100°C. O instrumento foi operado no modo "Top-3", no qual um espectro MS é adquirido seguido por MS / MS dos três íons mais intensos que foram detectados. Após a fragmentação MS / MS, os íons foram colocados em lista de exclusão por 60 segundos.

Para a análise proteômica quantitativa de cardiomiócitos isolados de corações sadios e hipertrofiados, utilizamos a técnica livre de marcação (do inglês, "label-free"). Essa análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo, no AQUACEN, Laboratório Oficial Central da Rede Nacional de Laboratórios Oficiais do Ministério da Pecuária e Agricultura (RENAQUA), instalado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para análise foi utilizado o espectrômetro de massa do tipo nanoESI-QTOF (Synapt G2-Si, Waters). Para a cromatografia líquida de ultra desempenho e nano fluxo (sigla em inglês, nanoUPLC), utilizou-se um gradiente de fase reversa (RP) de 1h de acetonitrila 7-40% (v/v) (ácido fórmico a 0,1% v/v) e um sistema de tecnologia nanoACQUITY UPLC 2D de 500 nL.min<sup>-1</sup> (Waters). Uma coluna de sílica de alta resistência nanoACQUITY UPLC de 1,8µm, 75µm × 150mm (pH 3) foi usada em conjunto com uma coluna de nanofluxo de pH UP (Nano Ease XBridge BEH130 C18 de 5 µm, 300 µm × 50 mm). Para aquisição dos espectros de massa, o espectrômetro foi operado no modo positivo, utilizando uma resolução de 25.000 FWHM, e a câmara de mobilidade iônica foi preenchida com gás hélio. O instrumento foi utilizado no modo DIA (do inglês, Data Independent Acquisition, aquisição independente de dados).

### **3.11. Tratamento e Análise dos Dados**

Os espectros gerados das amostras provenientes das matrizes descelularizadas foram processados usando o software MassLynx v.4.1 e o arquivo FASTA contendo as proteínas de camundongos (*Mus musculus*) obtido do banco de dados Uniprot Swiss-Prot (versão 2016\_01). Os arquivos foram processados no programa Mascote v.2.3.02 (Matrix Science Ltd.), com os seguintes parâmetros para identificação dos peptídeos: reagente de digestão = tripsina; máxima perda de clivagem = 1; modificações: carbamidometil cisteína (fixa) e oxidação de metionina (variável).

Para a identificação e a quantificação dos peptídeos dos cardiomiócitos, os espectros de massa foram processados usando o programa Progenesis Q1 para Proteomics (QIP) v.2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) e o arquivo FASTA contendo as proteínas de camundongos (*Mus musculus*) obtido do banco de dados Uniprot Swiss-Prot (versão 2017\_10). Os arquivos contendo os espectros de massa foram importados no programa e submetidos ao processamento automático de dados para identificações de proteína e informações quantitativas usando os seguintes parâmetros: limites de pico de separação = 5; limites máximos de tempo de retenção de carga = 8.

Os seguintes parâmetros foram utilizados para identificação de peptídeos: reagente de digestão = tripsina; máxima perda de clivagem = 2; massa proteica máxima = 600 kDa; modificações: carbamidometil cisteína (fixa) e oxidação de metionina (variável); parâmetros de tolerância de pesquisa: tolerância a peptídeos = 10 ppm, tolerância dos fragmentos = 20 ppm, taxa máxima de descoberta falsa (FDR) = 1%.

As intensidades das proteínas identificadas e quantificadas provenientes do estudo diferencial do proteoma de cardiomiócitos foram transformadas para escala logarítmica de base 2 e normalizadas utilizando o valor da mediana de cada grupo experimental. Posteriormente foi realizado um pós teste estatístico de hipóteses e análise de variância (One-Way ANOVA) para identificar as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com isoproterenol, usando o grupo controle como referência e valores de  $p \leq 0,05$ . Os procedimentos descritos acima foram realizados utilizando o programa DanteR (121), que é



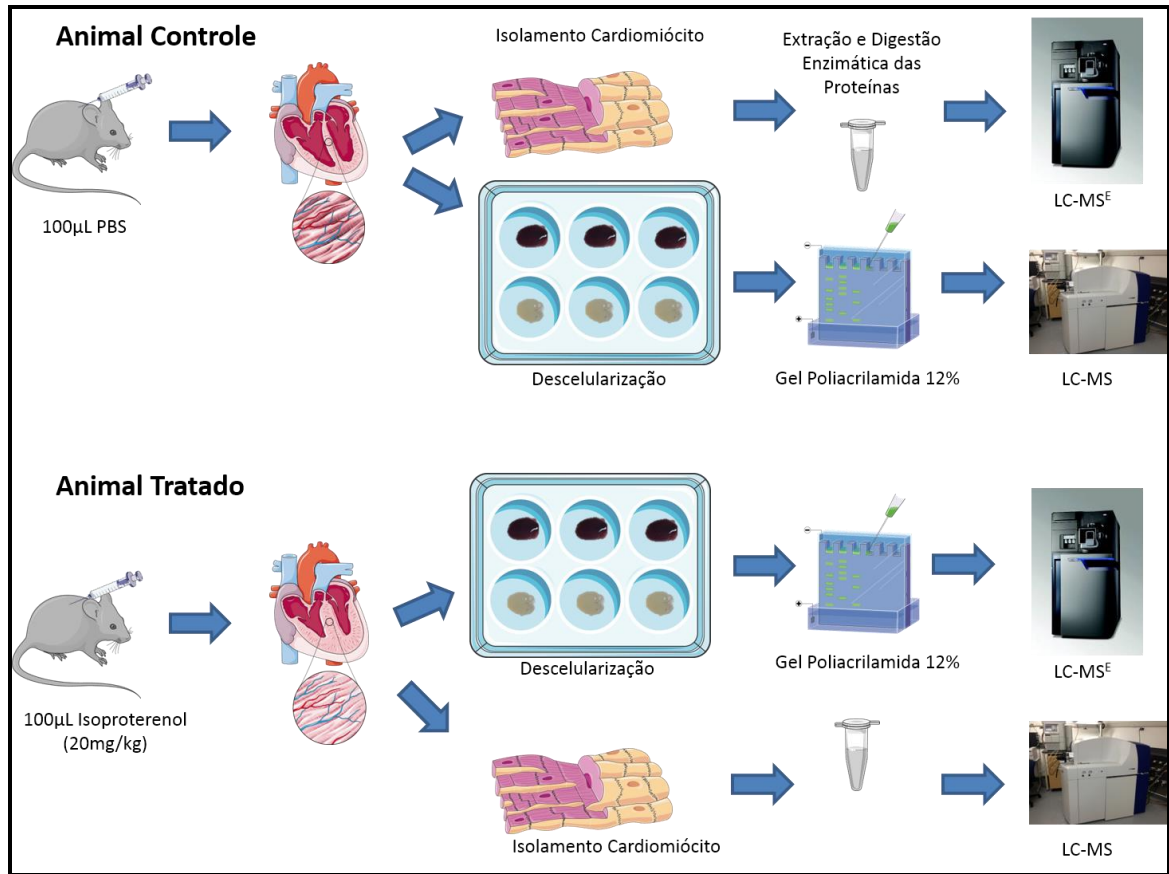
uma interface gráfica que utiliza o pacote R (r-project.org) para realizar as análises estatísticas.

A categorização funcional das proteínas de cardiomiócitos foi realizada utilizando o programa “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA, Qiagen), incluindo o seu banco de dados curado manualmente “Ingenuity Knowledge Base”, e abordagens de análises causais (122). Já para o dataset da matriz descelularizada, foi utilizado o programa “Protein Center” (Thermo Fisher Scientific). Em ambos os casos, foram utilizados dados de *Mus musculus* como referência.

O mapa de interações foi criado carregando as proteínas diferencialmente reguladas (Tabela 5) no programa STRING (<http://string-db.org/>). Foram utilizados os parâmetros padrões do software, com score de interação mínimo de 0.900 de confiança. Foi realizado um enriquecimento para processos biológicos, utilizando a Ontologia Gênica (GO, sigla em inglês), para avaliar se as proteínas presentes em “clusters” no mapa de interação estavam envolvidas em algum processo relacionado com a hipertrofia cardíaca.

### **3.12. *Resumo da estratégia experimental***

A figura 9 foi utilizada para facilitar a compreensão da estratégia experimental utilizada neste trabalho para estudar o remodelamento cardíaco após a indução de hipertrofia por isoproterenol. Nesta figura, observam-se os procedimentos utilizados para identificar qualitativamente as proteínas da matriz extracelular descelularizada de corações sadios e hipertrofiados assim como comparar quantitativamente o proteoma dos cardiomiócitos nas mesmas condições experimentais.



**Figura 9: Estratégia experimental para o estudo do remodelamento cardíaco no processo de hipertrofia induzido por isoproterenol.** Os animais receberam PBS ou Isoproterenol por via subcutânea durante 7 dias de tratamento. Para identificação das proteínas da matriz, o tecido cardíaco (n=5) foi submetido ao processo de descelularização para remoção das células, extração e separação das proteínas em gel de poliácridamida, e posterior identificação. Para análise das proteínas dos cardiomiócitos, outros tecidos cardíacos (n=3) foram utilizados, dos quais as células foram isoladas, submetidas a extração das proteínas que foram digeridas, identificadas e quantificadas pelo espectrômetro de massa

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.1. Hipertrofia Cardíaca**

Com a intenção de avaliar se o processo de indução da hipertrofia tinha sido eficiente, foram analisados alguns parâmetros que relacionam estruturas influenciadas pelo tratamento com isoproterenol e outras que não sofrem alterações. Por exemplo, a massa do coração é influenciada pelo tratamento devido ao remodelamento cardíaco, já a massa corporal e o comprimento da tíbia são parâmetros que não alteram devido ao tratamento.

Para indução da hipertrofia cardíaca foram utilizados 5 camundongos machos C57BL/6WT. Entretanto, dois indivíduos apresentaram valores atípicos que poderiam prejudicar a análise estatística. Um dos animais apresentou o valor de comprimento da tíbia inconsistente com os demais, e outro animal desenvolveu uma hipertrofia cardíaca muito elevada, que se diferenciava dos outros animais do grupo tratado. Assim sendo, para análise dos parâmetros utilizamos um tamanho amostral de 3 animais.

Na Tabela 2, observa-se que o peso corporal dos grupos controle (n=3) e tratado (n=3) 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 corporal, o que pode gerar dúvidas quanto a esse tipo de medida não ser variável. Por isso, optou-se pela medida do comprimento da tíbia também, já que no animal adulto não há modificações significativas em suas medidas, podendo, assim, funcionar como parâmetro um padrão para calcular a relação desejada, ou seja, a razão entre a massa cardíaca e o comprimento desse osso.

Quando o peso do coração (mg) é relacionado com o peso corporal (g), percebe-se que o grupo controle ( $5,82 \pm 0,39$ ) apresenta um valor inferior e estatisticamente significativo ( $p = 0.0229$ ) em relação ao grupo tratado ( $6,76 \pm 0,62$ ), demonstrando um aumento do peso do coração dos animais tratados. Esse aumento do peso cardíaco deve-se ao remodelamento provocado pela indução de hipertrofia pelo isoproterenol, sendo possível também notar um aumento do tamanho do coração por observação macroscópica (dados não mostrados).

Ao avaliar a relação do peso do coração (mg) pelo comprimento da tíbia (cm), também mostrado na Tabela 2, observa-se que o grupo controle ( $75,29 \pm 3,11$ ) apresenta um valor menor e estatisticamente significativo em relação ao grupo tratado ( $82,48 \pm 1,41$ ) ( $p = 0.019$ ). Esses dados reforçam os resultados obtidos na relação do peso corporal/peso do coração, demonstrando um aumento efetivo do peso do coração no grupo tratado.

Em termos percentuais de hipertrofia do coração (Tabela 2), ou seja, dividindo o valor da relação do grupo tratado pelo do grupo controle, percebe-se que há uma hipertrofia de  $16,03 \pm 3,41\%$ , utilizando dados da relação peso coração/peso corporal. Já com os dados da relação peso coração/comprimento tíbia, a hipertrofia foi de  $9,61 \pm 2,67\%$ .

A Tabela 2 também apresenta os dados referentes ao peso do coração (mg). O grupo controle apresentou valores de  $128 \pm 5,29$ , enquanto que o grupo tratado, de  $145 \pm 2,3$ . Esses dados demonstram a diferença que existe entre o peso do coração nos dois grupos, valores esses utilizados para o cálculo das relações. É necessário normalizar o valor absoluto do peso do coração com medidas padrões para evitar interpretações incorretas dos dados devido a potencial variação do peso corporal do animal durante o tratamento.

**Tabela 2: Parâmetros utilizados para caracterizar a hipertrofia do coração induzida pelo tratamento com isoproterenol**

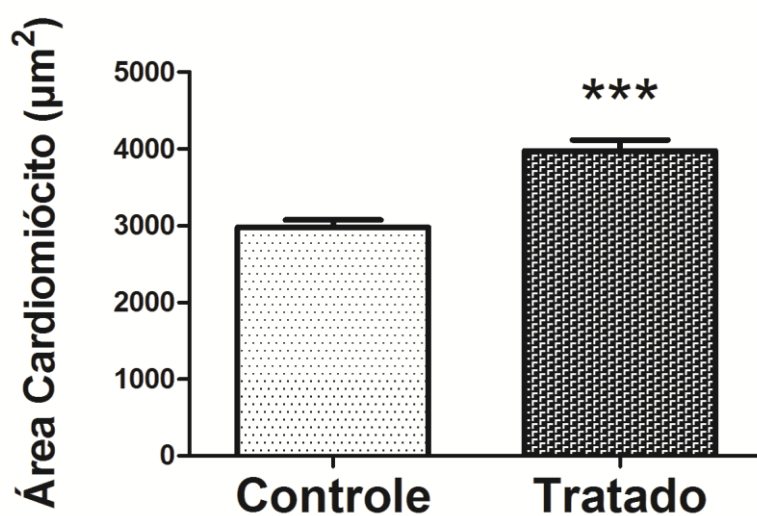
Grupos	Peso Corporal (g)	Peso Coração (mg)	Comprimento da Tíbia (cm)	
Controle (n = 3)	22,04 ± 1,75	128 ± 5,29	1,70 ± 0,000	
Tratado (n = 3)	21,64 ± 2,06	145 ± 2,30	1,76 ± 0,057	

Grupos	Relação $P_{\text{coração}}(\text{mg})/ P_{\text{corporal}}(\text{g})^*$	Relação $P_{\text{coração}}(\text{mg})/\text{Comp. Tíbia}(\text{cm})^{**}$	% Hipertrofia $P_{\text{coração}}(\text{mg})/ P_{\text{corporal}}(\text{g})$	% Hipertrofia $P_{\text{coração}}(\text{mg})/\text{Comp}_{\text{tíbia}}(\text{cm})$
Controle (n = 3)	5,82 ± 0,39	75,29 ± 3,11	16,03	9,61
Tratado (n = 3)	6,76 ± 0,62	82,48 ± 1,41	± 3,41	± 2,67

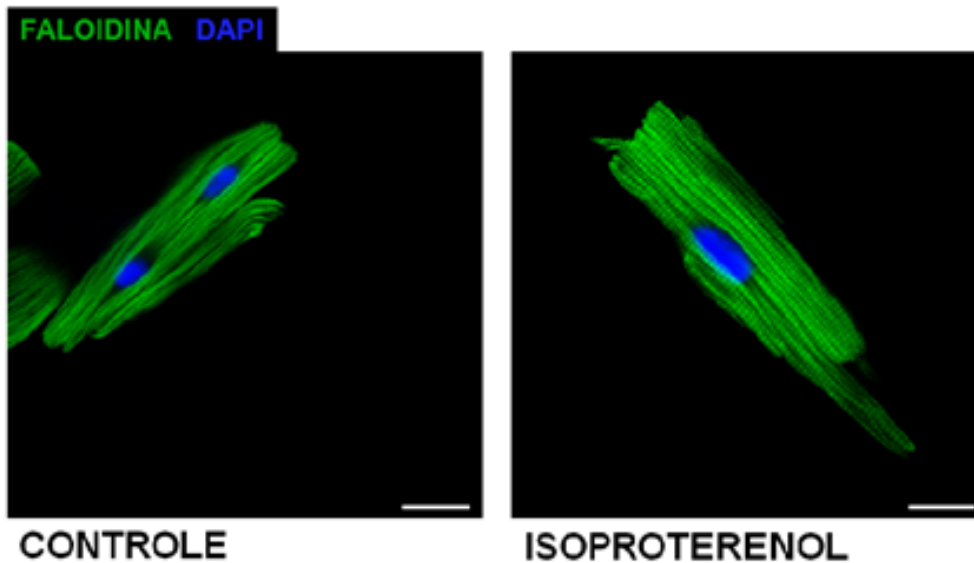
Os valores de peso corporal, peso coração e comprimento tíbia são úteis para determinação das relações que são utilizadas como parâmetros de hipertrofia. Esses parâmetros são o  $P_{\text{coração}}/P_{\text{corporal}}$  e o  $P_{\text{coração}}/\text{Comp}_{\text{tíbia}}$ , que apresentaram diferenças 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. \* $p = 0.0229$ ; \*\* $p = 0.019$ ;  $n = 3$ ; (Teste t de Student)

Visando uma melhor caracterização da hipertrofia induzida pelo tratamento com o isoproterenol, analisamos também a área celular dos cardiomiócitos, para verificar se houve alteração do tamanho das células em relação ao grupo controle. Foram selecionados 20 cardiomiócitos de 3 animais de cada grupo experimental e analisamos as imagens usando o programa ImageJ. No gráfico da Figura 10, observamos que houve um aumento do tamanho dos cardiomiócitos das células tratadas com o isoproterenol em relação ao grupo controle (33% de aumento), corroborando os dados da Tabela 1, confirmando, assim, a indução de hipertrofia pelo tratamento.



**Figura 10: Área dos cardiomiócitos dos grupos Controle e Tratado.** As áreas dos cardiomiócitos provenientes de corações tratados com o isoproterenol ou não (controle) foram calculadas utilizando o programa ImageJ. O tratamento induziu um aumento de 33% da área de miócitos em relação ao grupo controle. \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ; 20 imagens por animal; (Teste t de Student)

Realizamos, também, um ensaio de microscopia confocal com imunofluorescência (Figura 11) nos cardiomiócitos dos grupos controle e tratado, utilizando o anticorpo anti-faloidina conjugado com Alexa Fluor® 488, que se liga seletivamente a F-actina, presente no citoesqueleto do cardiomiócito. Assim sendo, as células que sofreram a hipertrofia apresentam uma maior quantidade de actina filamentosa, que pode ser visualizada pela microscopia confocal de fluorescência.



Barra = 20  $\mu$ M

**Figura 11: Microscopia confocal e imunofluorescência dos cardiomiócitos isolados de corações provenientes dos grupos controle e tratado.** As células foram marcadas com o anticorpo anti-faloidina conjugado com Alexa Fluor 488. A coloração nuclear foi obtida pela incubação com 4,6-diamidino2-fenilindole (DAPI)

## **4.2. Proteoma**

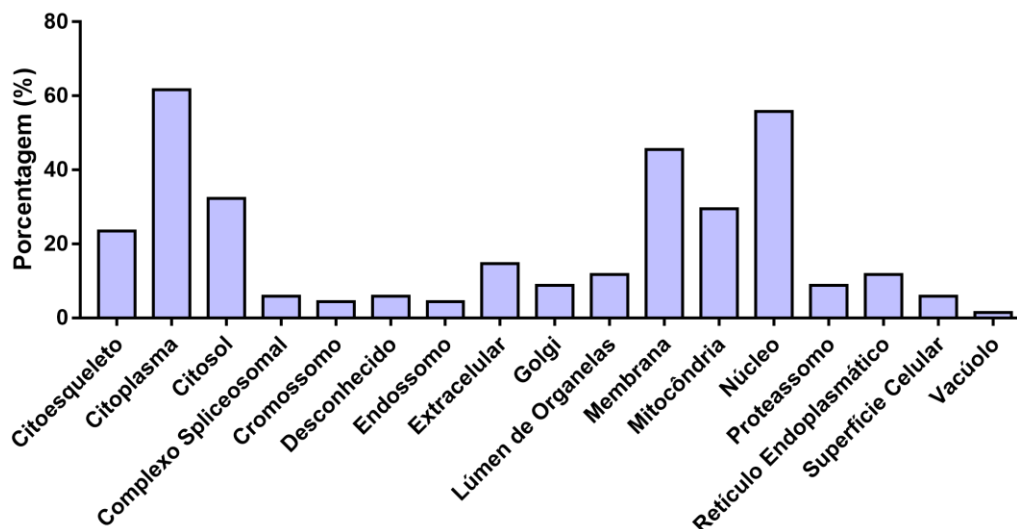
### **4.2.1 Matriz Descelularizada**

Visando uma melhor compreensão das bases moleculares envolvidas no remodelamento patológico do tecido cardíaco, inicialmente nós focamos os estudos nas proteínas relacionadas à MEC. Para tal, realizamos o processo de descelularização do tecido cardíaco, visando identificar qualitativamente as proteínas presentes na matriz descelularizada provenientes de corações do grupo controle e tratados com o isoproterenol. Além de possibilitar a identificação de proteínas encontradas exclusivamente em cada grupo, essa análise também forneceu informações a respeito da eficiência do processo de



descelularização. Realizando uma análise de Ontologia Gênica (GO) (Figura 12), percebe-se que uma parcela considerável de proteínas associadas a MEC. Por exemplo, 46%, 15% e 6% das proteínas encontradas são relacionadas com os termos “membrana”, “extracelular” e “superfície celular”, respectivamente. Contudo, observa-se também uma grande quantidade de proteínas do citoplasma, citoesqueleto, núcleo e mitocôndrias (Figura 12). Importante destacar que a mesma proteína pode estar associada a compartimentos diferentes, ou seja, as proteínas participam de vários processos biológicos e apresentam localização celular pertencentes a diferentes compartimentos. Acreditamos que o processo de descelularização, que já demonstramos ser eficiente na remoção das células (Anexo 1 e referência: (108)), não é capaz de remover a interação entre proteínas do citoesqueleto celular com as proteínas da ECM. Como pode ser observado nas Tabelas 3, 4 e 5, existe um predomínio de proteínas que compõe a matriz extracelular e o citoesqueleto das células musculares cardíacas, como colágeno, actina, miosina, tubulina, troponina e tropomiosina. Essas proteínas são importantes para a avaliação da condição patológica de hipertrofia, pois estão envolvidas no remodelamento cardíaco para a adaptação à condição de insuficiência cardíaca, além de estarem relacionadas ao processo de contração do músculo cardíaco. Com isso, o procedimento de descelularização do tecido cardíaco permitiu um enriquecimento de proteínas que são importantes para a caracterização da situação de hipertrofia e, além disso, abre a possibilidade para encontrar proteínas que estão relacionadas a condição patológica estudada.

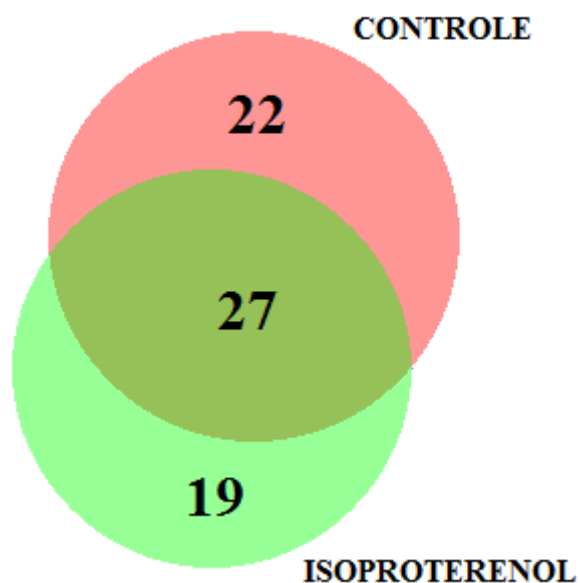
### Ontologia Gênica (GO) - Compartimentos Celulares



**Figura 12: Análise por Ontologia Gênica (GO) de todas as proteínas identificadas na matriz descelularizada.** Os valores estão expressos em porcentagem (%). A análise foi focada em termos GO relacionados a compartimentos celulares

Observa-se na figura 13 que foram encontradas 22 proteínas exclusivas no grupo controle e 19 proteínas exclusivas no grupo tratado, sendo que 27 proteínas identificadas foram comuns aos dois grupos. É importante ressaltar que não podemos afirmar que as proteínas identificadas apenas em um grupo experimental não estão presentes no outro grupo. Isso se deve a limitações da técnica empregada. Por exemplo, para a aquisição dos dados por espectrometria de massa utilizamos o método “Aquisição Dependente de Dados” (DDA, sigla em inglês). Neste método, a seleção dos íons que serão fragmentados é baseada na intensidade dos mesmos. Desta forma, pode ocorrer o fenômeno denominado subamostragem (“undersampling”, em inglês), no qual apenas uma parcela dos peptídeos será fragmentada e, assim, identificada (123).

## PROTEÍNAS MATRIZ



**Figura 13: Diagrama de Venn das proteínas identificadas no estudo proteômico qualitativo da matriz descelularizada.** Foram encontradas 22 proteínas no grupo controle, 19 no grupo tratado e 27 estavam presentes em ambos os grupos

As proteínas identificadas estão listadas nas tabelas a seguir, e separadas da seguinte maneira: Tabela 3, todas as proteínas identificadas (grupo controle e grupo tratado); Tabela 4, proteínas identificadas apenas no grupo controle; Tabela 5, proteínas exclusivas do grupo tratado.

A proteína titina foi encontrada apenas no grupo tratado (Tabela 5). Esta proteína está envolvida na tensão miocárdica passiva e no retrocesso elástico dos miócitos cardíacos, contribuindo assim para o enchimento do ventrículo esquerdo durante a fase de diástole (124). Devido ao “splicing” alternativo e modificações pós-traducionais, diversas proteoformas da titina são produzidas (125). A modificação na razão entre essas proteoformas tem sido relacionada com doenças cardíacas, como a cardiomiopatia dilatada, a insuficiência cardíaca diastólica e a insuficiência cardíaca congestiva isquêmica crônica (126-130).

Outra proteína encontrada apenas no grupo tratado (Tabela 5) é a desmina, um filamento intermediário específico de músculo que forma uma rede citoesquelética com elementos estruturais que mantêm a integridade da célula, participam da sinalização mecânico-química e transmissão de força (131). Durante a hipertrofia por sobrecarga de pressão, a desmina permite que a força seja normalmente propagada pela miofibrila devido a ligação física existente com os sarcômeros recém-formados (132). Isso demonstra o papel dessa proteína durante o remodelamento cardíaco para suprir a insuficiência do coração. Apesar de essas proteínas estarem presentes em condições fisiológicas, sua presença apenas no grupo tratado pode indicar um aumento da sua expressão para compensar a situação clínica. Contudo, por se tratar de uma análise qualitativa, não podemos afirmar que o tratamento com isoproterenol induziu uma alteração na abundância dessa proteína.

Dentre as proteínas do grupo tratado, também foi identificada a proteína HSP70, que apresenta função protetora contra estresses exógenos, como calor, processo oxidativo ou isquemia, além de controlar processos apoptóticos. Com isso, na fase adaptativa do tecido cardíaco em reação a algum tipo de estresse, ocorre uma proteção do tecido pelo aumento da expressão da proteína HSP70, que diminui a ativação das vias apoptóticas e aumenta as cascatas antiapoptóticas, como AKT (133-135). Essa proteína está relacionada com o complexo PRP19 (Figura 14), que permite a união e o funcionamento do spliceossoma durante sua ativação, além de promover a ubiquitinação de proteínas para serem degradadas via o proteassoma (136).

**Tabela 3: Proteínas identificadas nos grupos controle e tratado**

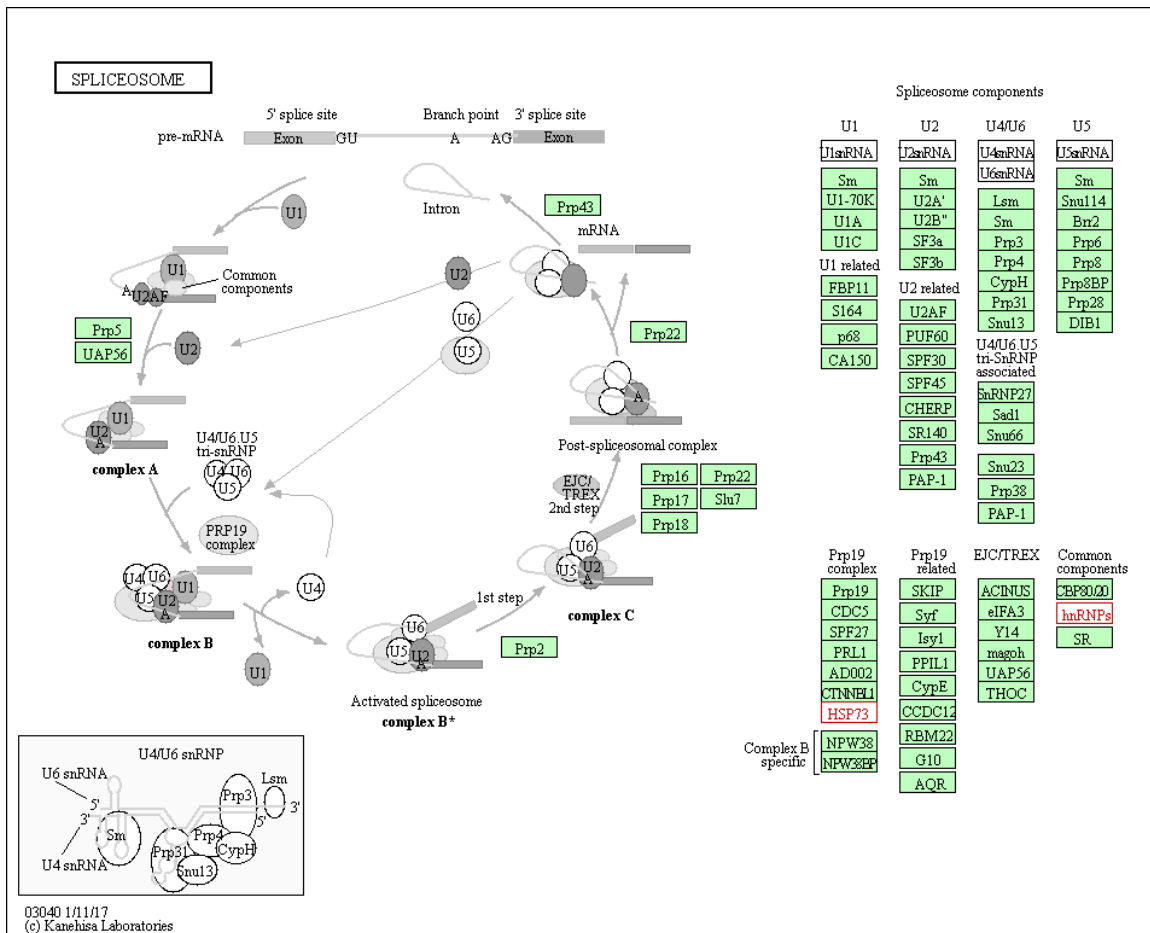
<b>ID</b>	<b>GENE</b>	<b>Proteína</b>
<b>Q02566</b>	Myh6	Myosin-6
<b>P11087</b>	Col1a1	Collagen alpha-1(I) chain
<b>P07724</b>	Alb	Serum albumin
<b>O55143</b>	Atp2a2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
<b>Q7SIG6</b>	Asap2	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2
<b>P17897</b>	Lyz1	Lysozyme C-1
<b>Q8C3P7</b>	Mettl3	N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL3
<b>P02088</b>	Hbb-b1	Hemoglobin subunit beta-1
<b>Q91WR8</b>	Gpx6	Glutathione peroxidase 6
<b>P68033</b>	Actc1	Actin, alpha cardiac muscle 1
<b>Q01149</b>	Col1a2	Collagen alpha-2(I) chain
<b>Q03265</b>	Atp5f1a	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
<b>P56480</b>	Atp5f1b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
<b>P08122</b>	Col4a2	Collagen alpha-2(IV) chain
<b>P60710</b>	Actb	Actin, cytoplasmic 1
<b>Q8BMS1</b>	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
<b>P0CG49</b>	Ubb	Polyubiquitin-B
<b>P68369</b>	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain
<b>O70468</b>	Mybpc3	Myosin-binding protein C, cardiac-type
<b>P16858</b>	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>P14602</b>	Hspb1	Heat shock protein beta-1
<b>P68372</b>	Tubb4b	Tubulin beta-4B chain
<b>P10126</b>	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1
<b>Q8VEM8</b>	Slc25a3	Phosphate carrier protein, mitochondrial
<b>P63101</b>	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta
<b>P54071</b>	Idh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
<b>Q8BFZ3</b>	Actb12	Beta-actin-like protein 2

**Tabela 4: Proteínas identificadas apenas no grupo controle**

<b>ID</b>	<b>GENE</b>	<b>Nome Proteína</b>
<b>P48774</b>	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5
<b>P10853</b>	Hist1h2bf	Histone H2B type 1-F/J/L
<b>P0C0S6</b>	H2afz	Histone H2A.Z
<b>Q99JY0</b>	Hadhb	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial
<b>P08249</b>	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial
<b>Q9QZH3</b>	Ppie	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E
<b>P09542</b>	Myl3	Myosin light chain 3
<b>Q60662</b>	Akap4	A-kinase anchor protein 4
<b>Q9CZU6</b>	Cs	Citrate synthase, mitochondrial
<b>P50289</b>	Acrv1	Acrosomal protein SP-10
<b>P48787</b>	Tnni3	Troponin I, cardiac muscle
<b>P38647</b>	Hspa9	Stress-70 protein, mitochondrial
<b>P58771</b>	Tpm1	Tropomyosin alpha-1 chain
<b>Q8BWT1</b>	Acaa2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial
<b>P17742</b>	Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
<b>P48962</b>	Slc25a4	ADP/ATP translocase 1
<b>P32037</b>	Slc2a3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3
<b>Q9QUM9</b>	Psma6	Proteasome subunit alpha type-6
<b>Q6P8J7</b>	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial
<b>A3KGV1</b>	Odf2	Outer dense fiber protein 2
<b>P63038</b>	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
<b>Q9DB77</b>	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial

**Tabela 5: Proteínas identificadas apenas no grupo tratado (coração hipertrofiado)**

<b>ID</b>	<b>GENE</b>	<b>Proteína</b>
<b>A2ASS6</b>	Ttn	Titin
<b>P31001</b>	Des	Desmin
<b>Q62234</b>	Myom1	Myomesin-1
<b>P70296</b>	Pebp1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
<b>P50247</b>	Ahcy	Adenosylhomocysteinase
<b>Q8VCR7</b>	Abhd14b	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B
<b>Q9CS42</b>	Prps2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
<b>P63017</b>	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein
<b>P49722</b>	Psma2	Proteasome subunit alpha type-2
<b>Q9Z204</b>	Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
<b>P61205</b>	Arf3	ADP-ribosylation factor 3
<b>P68037</b>	Ube2l3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
<b>P24369</b>	Ppib	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
<b>O09061</b>	Psmb1	Proteasome subunit beta type-1
<b>P62334</b>	Psmc6	26S protease regulatory subunit 10B
<b>P18760</b>	Cfl1	Cofilin-1
<b>P27106</b>	Amh	Muellerian-inhibiting factor
<b>P61979</b>	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
<b>Q9Z2U1</b>	Psma5	Proteasome subunit alpha type-5



**Figura 14: O complexo PRP19.** A proteína HSP73 (destacada em vermelho na figura) faz parte do complexo PRP19, responsável pela união e funcionamento do spliceossoma durante a sua ativação

A partir desses dados, concluímos que somente a análise qualitativa das proteínas após o processo de descclularização não seriam suficientes para uma melhor compreensão do processo patológico de hipertrofia cardíaca. Assim, direcionamos o estudo para uma análise quantitativa e comparativa do proteoma de cardiomiócitos isolados de corações saudáveis e hipertrofiados, para complementar os resultados obtidos.



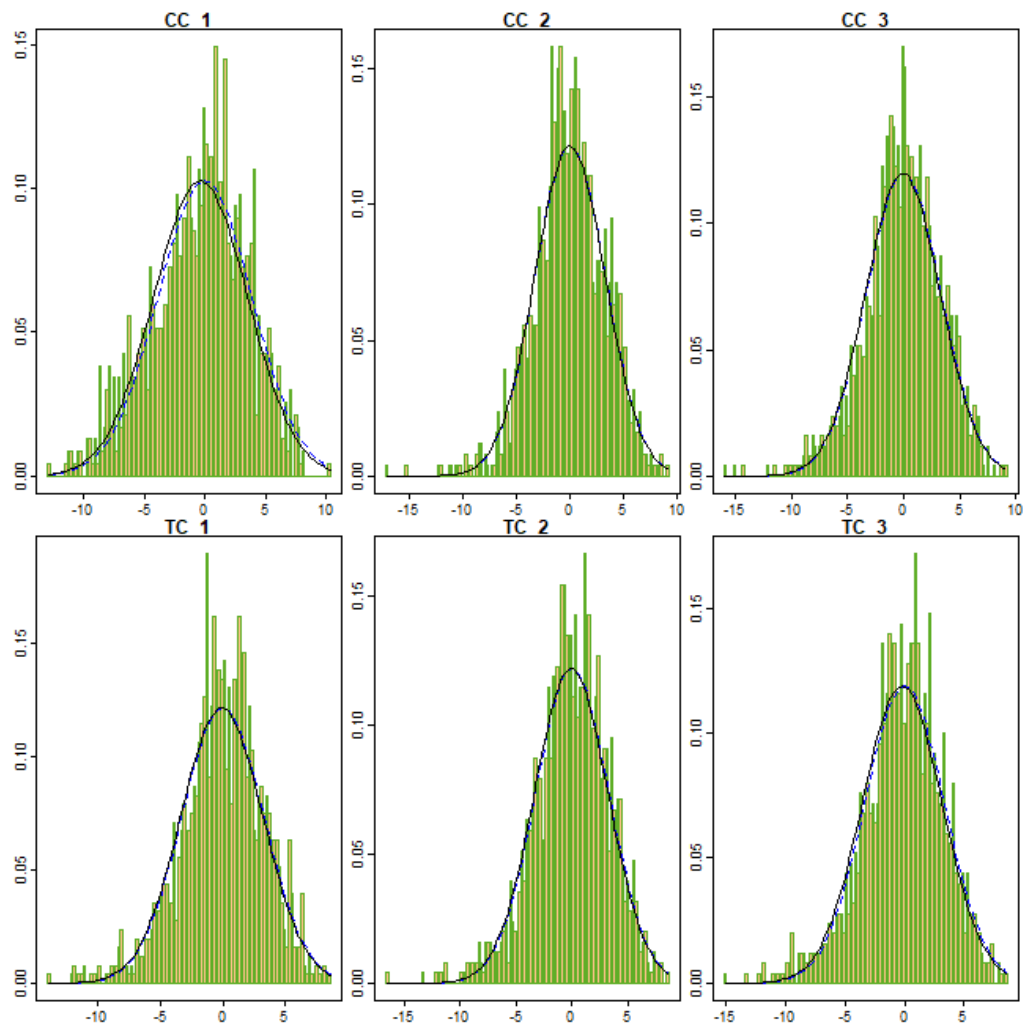
### **4.2.2 *Cardiomiócitos***

Para realizar o estudo quantitativo do proteoma de cardiomiócitos (controle e tratado), nós utilizamos a técnica de “Aquisição Independente de Dados” (DIA, sigla em inglês), utilizando a estratégia MS<sup>E</sup>, e o método de quantificação livre de marcação (“label-free”, nome em inglês).

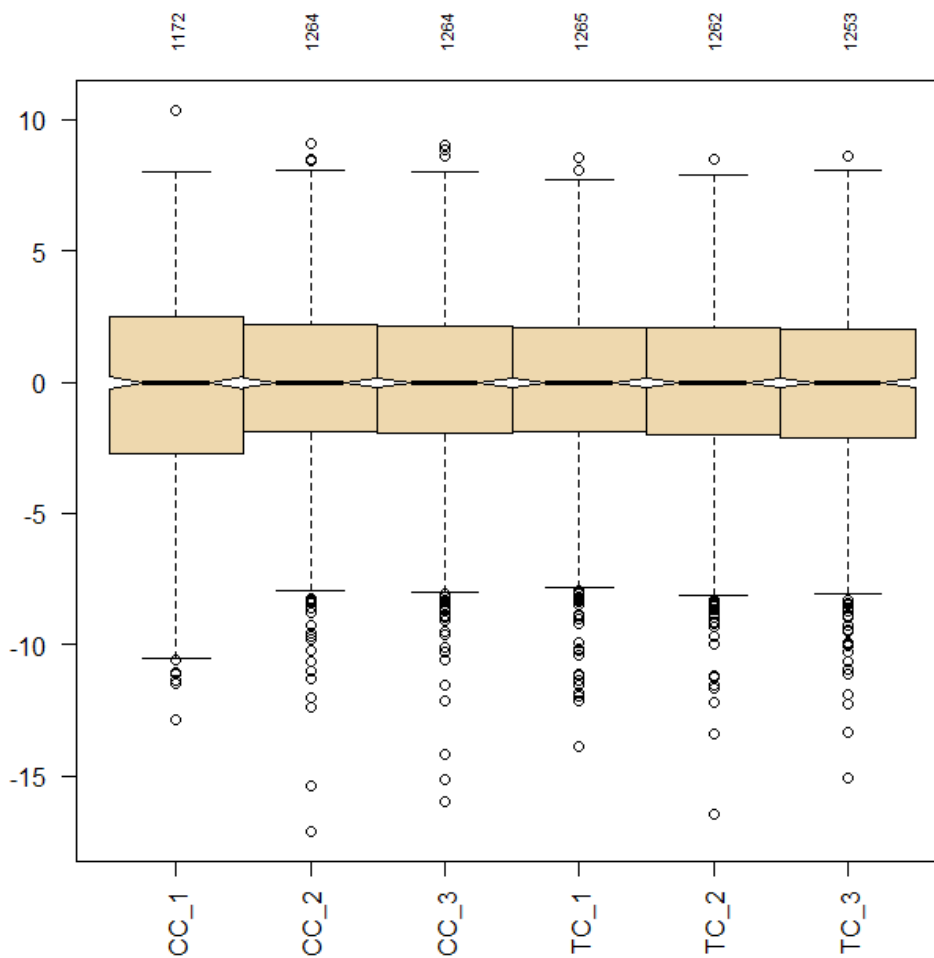
Ao todo, nós identificamos e quantificamos 1297 proteínas nas três replicatas biológicas (independentes) após aplicar os filtros descritos na seção Material e Métodos. Como pode ser observado na Figura 15, as intensidades das proteínas apresentaram uma distribuição normal.

Além disso, pode-se observar pela Figura 16 que as intensidades foram normalizadas de forma satisfatória (ver a seção Material e Métodos para maiores informações quanto ao processamento dos dados).

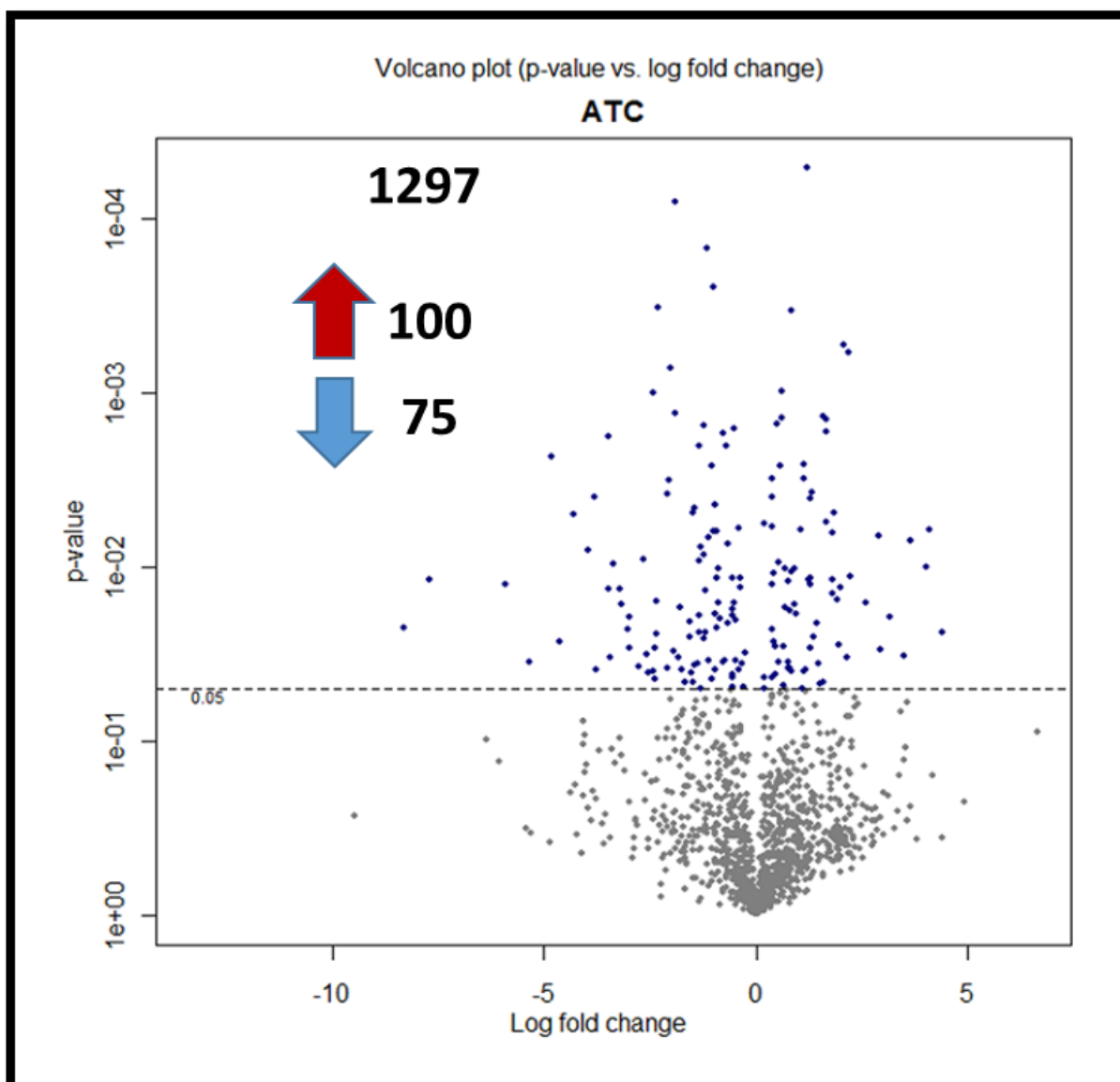
Como os dados apresentavam uma distribuição normal, nós utilizamos a análise de variância One-Way ANOVA, utilizando o grupo controle como referência e  $p \leq 0,05$  para identificar as proteínas reguladas pelo tratamento (Figura 17).



**Figura 15: Histograma das intensidades das proteínas identificadas e quantificadas dos cardiomiócitos.** As intensidades foram transformadas para escala logarítmica em base 2 ( $\log_2$ ). Como pode ser observado, todos os grupos apresentam uma distribuição normal das intensidades. Abreviações: CC1, grupo controle replicata 1; CC2, grupo controle replicata 2; CC3: grupo controle replicata 3; TC1, grupo tratado replicata 1; TC2, grupo tratado replicata 2; TC3: grupo tratado replicata 3



**Figura 16: Boxplot. Distribuição das intensidades das proteínas identificadas e quantificadas em cada grupo experimental.** As intensidades estão representadas em escala logarítmica de base 2 ( $\log_2$ ) e após normalização dos dados. Abreviações: CC1, grupo controle replicata 1; CC2, grupo controle replicata 2; CC3: grupo controle replicata 3; TC1, grupo tratado replicata 1; TC2, grupo tratado replicata 2; TC3: grupo tratado replicata 3



**Figura 17: Volcano plot.** Distribuição dos valores-p (Eixo Y) em relação às intensidades das proteínas em escala logarítmica de base 2 ( $\log_2$ ) (Eixo X). A linha tracejada representa  $p = 0,05$ , que é o limite para uma proteína ser considerada regulada neste trabalho

A Tabela 6 apresenta as proteínas que apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle e tratado. Nesta tabela, os valores de abundância das proteínas estão em escala logarítmica de base 2 ( $\log_2$ ). Ou seja, valores negativos significam que as proteínas foram reguladas

negativamente (abundância diminuída) com o tratamento e valores positivos indicam proteínas reguladas positivamente, ou seja, representam moléculas que aumentaram sua abundância com o tratamento. Como pode ser observado na tabela, o isoproterenol aumentou aproximadamente 3 vezes a abundância de um fragmento da titina ( $\log_2 = 1,66$  ou antilog = 3,16), corroborando os dados obtidos no estudo qualitativo da matriz descelularizada, onde essa proteína foi identificada apenas no grupo tratado.

De uma maneira geral, observam-se proteínas envolvidas na síntese de proteínas (e.x., fatores de iniciação eucariótica) serem reguladas negativamente pelo tratamento (Tabela 6). Já em relação às proteínas reguladas positivamente, percebe-se um aumento de proteínas associadas ao metabolismo celular (e.x., glicose 6-P isomerase), componentes do sistema redox (e.x., superóxido dismutase) e proteínas estruturais do citoesqueleto (e.x., miosina, troponina, etc.), indicando que o tratamento causa, respectivamente, uma possível alteração metabólica, um aumento do estresse oxidativo e, como demonstrado anteriormente pelos estudos morfológicos, uma hipertrofia dos cardiomiócitos.

**Tabela 6: Proteínas reguladas após o tratamento com o isoproterenol**

<b>ID</b>	<b>GENE</b>	<b>Razão*</b>	<b>valor-p</b>	<b>Proteína</b>
<b>Q80WC9</b>	Aasdh	0,83	0,0106	Beta-alanine-activating enzyme
<b>Q9JI39</b>	Abcb10	1,15	0,0031	ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial
<b>Q9CXJ4</b>	Abcb8	1,96	0,0281	ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial
<b>Q9DBL1</b>	Acadsb	-1,46	0,0046	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
<b>Q8QZT1</b>	Acat1	-0,27	0,0488	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
<b>Q9QYR7</b>	Acot3	-1,52	0,0409	Acyl-coenzyme A thioesterase 3
<b>Q3U965</b>	Acot8	-3,20	0,0134	Acyl-CoA thioesterase 8, isoform CRA_c
<b>B7ZMV1</b>	Adamts18	-1,94	0,0308	Adamts18 protein
<b>Q5FWB7</b>	Aldoa	0,19	0,0429	Fructose-bisphosphate aldolase
<b>P14824</b>	Anxa6	0,55	0,0351	Annexin A6
<b>A0A0R4J2C1</b>	Apbb1	2,91	0,0067	Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family B member 1
<b>Q99PT1</b>	Arhgdia	0,92	0,0103	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
<b>Q6PIE5</b>	Atp1a2	0,46	0,0152	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2
<b>P14094</b>	Atp1b1	0,55	0,0458	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1
<b>O54994</b>	Atp2a2	0,20	0,0037	Sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase (Fragment)
<b>Q9DB20</b>	Atp5po	-0,38	0,0132	ATP synthase subunit O, mitochondrial
<b>Q9JLV1</b>	Bag3	0,71	0,0172	BAG family molecular chaperone regulator 3
<b>G3UYQ2</b>	Bag6	-0,85	0,0200	Large proline-rich protein BAG6
<b>A2AUY4</b>	Baz2b	1,53	0,0469	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B
<b>Q8CGN4</b>	Bcor	-0,97	0,0044	BCL-6 corepressor
<b>Q8CHW5</b>	Bicd12	1,18	0,0394	BICD family-like cargo adapter 2
<b>Q9CWG9</b>	Bloc1s2	-4,83	0,0023	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2

<b>P55105</b>	Bmp8b	1,11	0,0498	Bone morphogenetic protein 8B
<b>Q8C801</b>	C230071H18Rik	2,23	0,0113	C230071H18Rik protein
<b>D3YWT5</b>	Cabp5	-2,33	0,0158	Calcium binding protein 5, isoform CRA_b
<b>P0DP28</b>	Calm3	-0,91	0,0063	Calmodulin-3
<b>Q3TUF3</b>	Calu	-0,74	0,0343	Calumenin, isoform CRA_a
<b>A2AHC3</b>	Camsap1	-1,74	0,0393	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1
<b>Q921U7</b>	Cast	1,83	0,0142	Calpastatin
<b>P51637</b>	Cav3	1,69	0,0055	Caveolin-3
<b>E9Q8Q6</b>	Ccdc141	-2,41	0,0401	Coiled-coil domain-containing 141
<b>Q9JJD8</b>	Cct2	-3,76	0,0391	Brain cDNA, clone MNCb-1272, similar to Mus musculus chaperonin subunit 2 (beta) (Cct2), mRNA
<b>Q08857</b>	Cd36	-0,52	0,0162	Platelet glycoprotein 4
<b>D3YYT0</b>	Cdh2	1,58	0,0014	Cadherin-2
<b>K4DI74</b>	Cdh23	-2,38	0,0440	Cadherin-23
<b>Q61400</b>	Ceacam10	-2,07	0,0032	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 10
<b>Q9EQR4</b>	Clca3a2	3,50	0,0324	Chloride channel accessory 3A2
<b>Q70KF4</b>	Cmya5	0,61	0,0010	Cardiomyopathy-associated protein 5
<b>A2AL36</b>	Cntrl	-1,22	0,0016	Centriolin
<b>Q54AC6</b>	Cox17	1,06	0,0061	Cox17p
<b>P19783</b>	Cox4i1	-0,78	0,0017	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial
<b>Q9CPQ1</b>	Cox6c	0,52	0,0094	Cytochrome c oxidase subunit 6C
<b>P17665</b>	Cox7c	1,47	0,0362	Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial
<b>O35927</b>	Ctnnd2	-0,89	0,0160	Catenin delta-2
<b>Q8BUI5</b>	Cul7	-3,97	0,0080	Uncharacterized protein

<b>P53395</b>	Dbt	-0,47	0,0346	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial
<b>Q922S6</b>	Ddx47	-1,88	0,0001	Ddx47 protein
<b>Q9CQ62</b>	Decr1	-0,96	0,0390	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial
<b>Q9DBB8</b>	Dhdh	-0,51	0,0016	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase
<b>Q80TX4</b>	mKIAA0577	-2,58	0,0316	MKIAA0577 protein
<b>Q8BMF4</b>	Dlat	-0,91	0,0117	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial
<b>Q9D832</b>	Dnajb4	0,63	0,0014	DnaJ homolog subfamily B member 4
<b>E9Q557</b>	Dsp	-1,05	0,0027	Desmoplakin
<b>Q01279</b>	Egfr	-1,91	0,0013	Epidermal growth factor receptor
<b>P60843</b>	Eif4a1	-1,11	0,0068	Eukaryotic initiation factor 4A-I
<b>E9Q561</b>	Eif4a2	-0,88	0,0102	Eukaryotic initiation factor 4A-II
<b>A9L8T0</b>	Elk1	-0,76	0,0354	Elk-1
<b>Q9CRD2</b>	Emc2	1,13	0,0401	ER membrane protein complex subunit 2
<b>Q921G7</b>	Etfdh	-0,72	0,0345	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial
<b>P22315</b>	Fech	-1,22	0,0260	Ferrochelatase, mitochondrial
<b>P0DM40</b>	Fer1l5	-1,56	0,0205	Fer-1-like protein 5
<b>E9Q043</b>	Fndc1	-3,02	0,0230	Fibronectin type III domain-containing 1
<b>Q9Z239</b>	Fxyd1	0,95	0,0186	Phospholemman
<b>D2KHZ9</b>	Gapdh	0,48	0,0289	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>Q61602</b>	Gli3	-2,63	0,0090	Transcriptional activator GLI3
<b>P26443</b>	Glud1	-0,66	0,0074	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
<b>A0A0A6YW67</b>	Gm8797	-2,07	0,0381	mCG23377, isoform CRA_b



<b>D3Z1M1</b>	Gnb2	1,30	0,0117	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
<b>Q91VW5</b>	Golga4	2,01	0,0131	Golgin subfamily A member 4
<b>A0A1W2P7V0</b>	Gopc	-2,07	0,0039	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein
<b>E9PW03</b>	Gpaa1	2,17	0,0329	Glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 protein
<b>B2RXT5</b>	Gpi1	1,23	0,0001	Glucose-6-phosphate isomerase
<b>P46425</b>	Gstp2	-0,92	0,0226	Glutathione S-transferase P 2
<b>Q99L13</b>	Hibadh	-0,38	0,0388	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial
<b>Q6GSS7</b>	Hist2h2aa2	-0,70	0,0020	Histone H2A type 2-A
<b>Q5EBP8</b>	Hnrnpa1	-1,19	0,0138	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
<b>O88569</b>	Hnrnpa2b1	0,38	0,0031	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
<b>Q8BIL5</b>	Hook1	4,10	0,0061	Protein Hook homolog 1
<b>P07901</b>	Hsp90aa1	0,78	0,0383	Heat shock protein HSP 90-alpha
<b>P38647</b>	Hspa9	-0,55	0,0419	Stress-70 protein, mitochondrial
<b>P14602</b>	Hspb1	0,42	0,0109	Heat shock protein beta-1
<b>Q7TMY8</b>	Huwe1	-4,31	0,0050	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
<b>E9PZI6</b>	Katna1	3,67	0,0071	Katanin p60 ATPase-containing subunit A1
<b>Q6ZPU9</b>	Kif1bp	3,15	0,0196	KIF1-binding protein
<b>E0CYI5</b>	Kng2	1,33	0,0037	kininogen 2
<b>Q0VDV7</b>	Kras	-1,50	0,0461	Kras protein
<b>P02468</b>	Lamc1	1,93	0,0157	Laminin subunit gamma-1
<b>Q9Z2I0</b>	Letm1	-0,33	0,0361	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein
<b>Q8CGK3</b>	Lonp1	-0,64	0,0212	Lon protease homolog, mitochondrial
<b>Q3TS70</b>	Lsm14b	2,06	0,0005	Uncharacterized protein

<b>P0CW03</b>	Ly6c2	-1,29	0,0077	Lymphocyte antigen 6C2
<b>P97412</b>	Lyst	-5,34	0,0354	Lysosomal-trafficking regulator
<b>F6Q750</b>	Macf1	0,66	0,0483	Microtubule-actin cross-linking factor 1
<b>O54782</b>	Man2b2	2,60	0,0163	Epididymis-specific alpha-mannosidase
<b>Q8BW75</b>	Maob	0,81	0,0383	Amine oxidase [flavin-containing] B
<b>Q3TF99</b>	Marco	-2,97	0,0294	Uncharacterized protein
<b>P04249</b>	MB	1,16	0,0026	Myoglobin
<b>Q99MR8</b>	Mccc1	-1,48	0,0049	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial
<b>Q8R407</b>	Mlh3	-1,39	0,0359	MutL-like protein 3
<b>Q9D023</b>	Mpc2	0,38	0,0127	Mitochondrial pyruvate carrier 2
<b>G3UYJ5</b>	Mtx1	1,27	0,0118	Metaxin-1
<b>P09922</b>	Mx1	0,41	0,0230	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
<b>O70468</b>	Mybpc3	0,49	0,0015	Myosin-binding protein C, cardiac-type
<b>Q91Z83</b>	Myh7	0,64	0,0290	Myosin-7
<b>A2AQP0</b>	Myh7b	0,40	0,0437	Myosin-7B
<b>Q8VDD5</b>	Myh9	0,40	0,0059	Myosin-9
<b>P09542</b>	Myl3	0,45	0,0268	Myosin light chain 3
<b>Q60605</b>	Myl6	-2,31	0,0003	Myosin light polypeptide 6
<b>Q9QVP4</b>	Myl7	-0,95	0,0188	Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform
<b>F8VQB6</b>	Myo10	1,45	0,0210	Unconventional myosin-X
<b>E9Q1F5</b>	Myo5c	-3,80	0,0040	Myosin VC
<b>E0CZE0</b>	Nae1	1,80	0,0063	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit
<b>A3R485</b>	ND3	-7,73	0,0119	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3

<b>G5E814</b>	Ndufa11	-0,54	0,0189	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11
<b>Q9CQ91</b>	Ndufa3	-1,24	0,0086	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3
<b>Q9CR21</b>	Ndufab1	-1,32	0,0238	Acyl carrier protein, mitochondrial
<b>D3YUK4</b>	Ndufb10	-0,36	0,0117	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10
<b>Q9CQJ8</b>	Ndufb9	0,22	0,0497	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9
<b>Q99LY9</b>	Ndufs5	-0,53	0,0175	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5
<b>A0A0A6YY59</b>	Nmd3	-5,93	0,0127	60S ribosomal export protein NMD3
<b>P08556</b>	Nras	-3,46	0,0135	GTPase NRas
<b>A0A1W2P6H1</b>	Obscn	1,37	0,0254	Obscurin
<b>P58281</b>	Opa1	-0,55	0,0436	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial
<b>Q9D051</b>	Pdhb	0,39	0,0040	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
<b>Q8R2U8</b>	Pdk1	-1,13	0,0001	Pdk1 protein
<b>Q8CI51</b>	Pdlim5	-1,32	0,0192	PDZ and LIM domain protein 5
<b>Q3U7Z6</b>	Pgam1	-0,99	0,0002	Phosphoglycerate mutase
<b>P09041</b>	Pgk2	0,75	0,0045	Phosphoglycerate kinase 2
<b>Q80TJ7</b>	Phf8	0,77	0,0355	Histone lysine demethylase PHF8
<b>Q6T3A5</b>	Pkhd1	0,92	0,0165	PKHD1
<b>P52480</b>	Pkm	0,55	0,0008	Pyruvate kinase
<b>Q9DCE3</b>	Pmm2	1,29	0,0295	Phosphomannomutase
<b>A0A0U1RPT0</b>	Ppp6r1	-1,01	0,0063	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1
<b>A0A1Y7VNU2</b>	Ptpn21	-2,53	0,0404	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 21
<b>Q8C6E9</b>	Pura	2,93	0,0302	Uncharacterized protein
<b>Q69Z76</b>	Pus7	-1,33	0,0093	Pseudouridylate synthase 7 homolog

<b>Q3TJQ7</b>	Pygl	-1,02	0,0445	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
<b>Q6ZPF0</b>	Rab1a	1,81	0,0119	Ras-related protein Rab-1A
<b>Q0PD24</b>	Rab30	-1,80	0,0172	RAB30, member RAS oncogene family, isoform CRA_a
<b>Q4V9W8</b>	Rab4b	-2,33	0,0244	RAB4B, member RAS oncogene family
<b>Q0PD49</b>	Rab8b	-1,35	0,0020	RAB8B, member RAS oncogene family
<b>Q3UZ51</b>	Rbm39	-3,16	0,0164	Uncharacterized protein
<b>Q91ZQ5</b>	Rpe65	-1,83	0,0330	Retinoid isomerohydrolase
<b>I7HLV2</b>	Rpl10	-0,23	0,0313	60S ribosomal protein L10
<b>P14115</b>	Rpl27a	4,04	0,0101	60S ribosomal protein L27a
<b>P17563</b>	Selenbp1	1,58	0,0460	Methanethiol oxidase
<b>P82348</b>	Sgcg	-1,17	0,0240	Gamma-sarcoglycan
<b>Q3UWP4</b>	Slc16a1	2,19	0,0006	Uncharacterized protein
<b>Q8BH59</b>	Slc25a12	-0,53	0,0115	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1
<b>Q921R7</b>	Slc35a5	0,69	0,0102	Probable UDP-sugar transporter protein SLC35A5
<b>Q68FL0</b>	Slc8a1	0,85	0,0396	Sodium/calcium exchanger 1
<b>Q3U8W4</b>	Sod2	0,74	0,0001	Superoxide dismutase
<b>Q62417</b>	Sorbs1	-1,46	0,0370	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1
<b>G3UXX3</b>	Spr	0,56	0,0026	Sepiapterin reductase
<b>Q8BUA9</b>	Strip1	-3,37	0,0097	Uncharacterized protein
<b>C6EQH3</b>	Suclg2	0,81	0,0177	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial
<b>B5KM66</b>	Syce3	-3,44	0,0329	Synaptonemal complex central element protein 3
<b>P21981</b>	Tgm2	0,78	0,0122	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
<b>Q3UUT9</b>	Thoc2	-3,47	0,0018	Uncharacterized protein

<b>A0A1B0GT60</b>	Thsd1	-2,43	0,0010	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 1
<b>Q9DAV9</b>	Tmem38b	-1,68	0,0460	Trimeric intracellular cation channel type B
<b>P19123</b>	Tnnc1	0,72	0,0017	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles
<b>E9QLK7</b>	Trrap	-2,38	0,0291	Transformation/transcription domain-associated protein
<b>A4Q9F1</b>	Tll8	-8,31	0,0225	Protein monoglycylase TTLL8
<b>A2AT65</b>	Ttn	1,66	0,0014	Titin
<b>A2AQ07</b>	Tubb1	-2,02	0,0007	Tubulin beta-1 chain
<b>Q6PAM1</b>	Txlna	-2,78	0,0379	Alpha-taxilin
<b>P10639</b>	Txn	-0,49	0,0204	Thioredoxin
<b>Q7TN22</b>	Txndc16	1,66	0,0017	Thioredoxin domain-containing protein 16
<b>Q9CZY3</b>	Ube2v1	0,45	0,0417	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
<b>Q9JKB1</b>	Uchl3	0,85	0,0003	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
<b>Q8BR39</b>	Vapb	-4,62	0,0269	Uncharacterized protein
<b>Q64727</b>	Vcl	0,48	0,0266	Vinculin
<b>Q8VHI5</b>	Vit	1,86	0,0049	Vitrin
<b>A0A089VPF9</b>	Xirp2	-1,56	0,0253	Xin actin-binding repeat containing 2 short splice form
<b>B1AVD1</b>	Xpnpep2	0,21	0,0057	Xaa-Pro aminopeptidase 2
<b>P63101</b>	Ywhaz	-1,30	0,0499	14-3-3 protein zeta/delta
<b>A0A087WRA5</b>	Zcchc2	-1,12	0,0346	Zinc finger CCHC domain-containing protein 2
<b>B2KFW1</b>	Zscan20	-0,53	0,0486	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 20

\*Razão: Grupo tratado vs. grupo controle. Os valores estão expressos em escala logarítmica em base 2 (log2). Valores positivos e negativos indicam regulação positiva e negativa pelo tratamento, respectivamente

Visando aprofundar nossa análise em um contexto biológico, submetemos a lista contendo as proteínas reguladas ao programa “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA, Qiagen). A partir do processamento dos dados, conseguimos verificar uma relação entre as proteínas encontradas em nossos experimentos com algumas vias de sinalização que podem estar envolvidas na patogênese da hipertrofia cardíaca. A Figura 18 representa as vias que apresentam a maior probabilidade de estarem relacionadas com os nossos dados (menores valores-*p*). Além disso, foi realizada uma análise causal que utiliza os dados experimentais (proteínas reguladas pelo tratamento) para calcular o “z-score” e, assim, prever possíveis modulações (ativação ou inibição) de vias celulares (122). Um z-score positivo (barra laranja, Figura 18) indica uma grande probabilidade de o tratamento com isoproterenol ativar a via correspondente. Em contrapartida, um z-score negativo (barra azul, Figura 18) indica uma possível inibição da via.

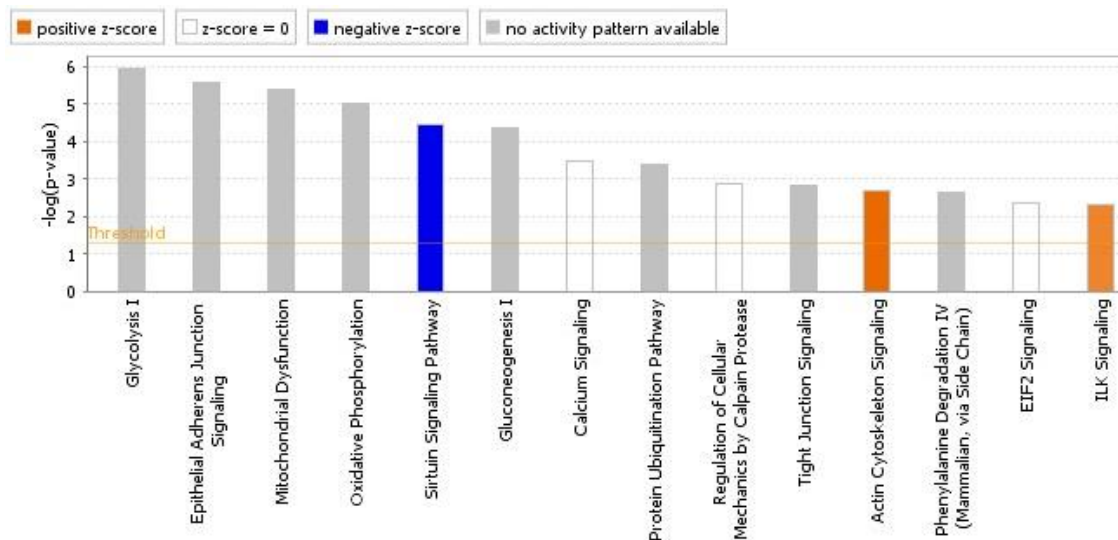
O tratamento com o isoproterenol induziu uma possível ativação da sinalização da quinase ligada a integrina (“integrin-linked kinase” ou ILK, em inglês) e do citoesqueleto de actina (“actin cytoskeleton signaling”, em inglês) (Figura 18). Os nossos dados corroboram com a literatura, pois um estudo seminal, com pacientes diagnosticados com hipertrofia patológica dos ventrículos induzida por sobrecarga de pressão, demonstrou que estes indivíduos apresentavam um aumento da expressão da ILK. Os autores demonstraram também a importância dessa quinase no remodelamento cardíaco. Utilizando animais que expressavam a ILK constitutivamente ativada (ILK<sup>S343D</sup>), foi observada uma hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento com a angiotensina II, enquanto não foi detectado esse fenótipo em animais que apresentavam essa quinase inativada (ILK<sup>R211A</sup>) (137). A reorganização do citoesqueleto, formado pelas diferentes proteoformas de actina, miosina, titina, vinculina, dentre outras, também ocorre durante o remodelamento cardíaco. O isoproterenol induziu o aumento da abundância dessas proteínas, como as cadeias pesadas (MYH7, MYH9 e MYH7B) e leves (MYL3) da miosina, a titina (TTN) e a vinculina (VCL) (Tabela 6). Além disso, demonstramos anteriormente

o aumento do depósito de actina nos cardiomiócitos (Figura 11) e nossas análises indicaram a ativação do citoesqueleto de actina (Figura 18), indicando uma consistência nos dados.

Como pode ser observado na Figura 18, nossas análises indicaram uma possível inibição das vias de sinalização das sirtuínas pelo tratamento com isoproterenol, indicando uma possível regulação negativa da expressão dessas moléculas, apesar de não termos encontrado nenhuma proteoforma das sirtuínas neste trabalho (Tabela 6). Estudos recentes vêm demonstrando o papel protetor das sirtuínas no coração (138). Por exemplo, a Sirt3 melhora a função mitocondrial e reduz o estresse oxidativo. Sua expressão é aumentada em casos leves de hipertrofia, contudo, em casos graves, a expressão de Sirt3 é regulada negativamente (139). Em um estudo utilizando animais geneticamente modificados, foi demonstrado que a Sirt6 também é cardioprotetora, pois animais knockout para essa proteoforma apresentaram hipertrofia e insuficiência cardíaca, sendo essas patologias atenuadas em animais que superexpressavam a Sirt6 (140). Desta forma, os nossos dados estão alinhados com as recentes descobertas que demonstram um importante papel das sirtuínas na prevenção de hipertrofia, sendo a expressão dessas proteínas alterada negativamente em casos graves de remodelamento cardíaco, como parece ser o nosso modelo.

As proteínas reguladas pelo tratamento também estão associadas à glicólise (Figura 18), uma via metabólica importante na produção de energia (ATP). Apesar de não ter sido possível inferir a modulação desta via metabólica (ativação ou inibição), com exceção da fosfoglicerato mutase 1 (PGAM1), que foi regulado negativamente nos cardiomiócitos hipertrofiados (Tabela 6), todas as outras enzimas identificadas no nosso estudo e relacionadas com a glicólise foram reguladas positivamente pelo tratamento, como a glicose 6-P isomerase (GPI), frutose bifosfato aldolase (ALDOA), fosfoglicerato quinase 2 (PGK2) e piruvato quinase M1/2 (PKM) (Tabela 6). Desta forma, podemos concluir que a atividade da glicólise está aumentada, provavelmente devido a maior necessidade dos cardiomiócitos para realizar suas funções em detrimento do

aumento da demanda de oxigênio e nutrientes. À medida que o tecido cardíaco sofre morte celular, as células que sobrevivem necessitam suprir suas atividades promovendo a ativação de genes relacionados a proteínas que participam do processo de obtenção de energia, aumento de estruturas responsáveis pela força e contração, além de outras vias importantes.



**Figura 18: Vias de sinalização celular possivelmente moduladas pelo tratamento com o isoproterenol.** Predição das vias possivelmente envolvidas no processo de hipertrofia. As mesmas estão ordenadas em função dos valores-p. Apenas as 14 vias com maior probabilidade de estarem relacionadas com o nosso “dataset” (menores valores-p) estão representadas. Barra laranja (z-score > 0) indica uma potencial ativação da via pelo tratamento e em azul (z-score < 0) inibição. Cinza ou branco indica que não foi possível imputar uma possível modulação da via, seja porque o z-score foi muito próximo de zero ou devido a insuficiência de informações disponíveis no banco de dados (“Ingenuity Knowledge Base”)

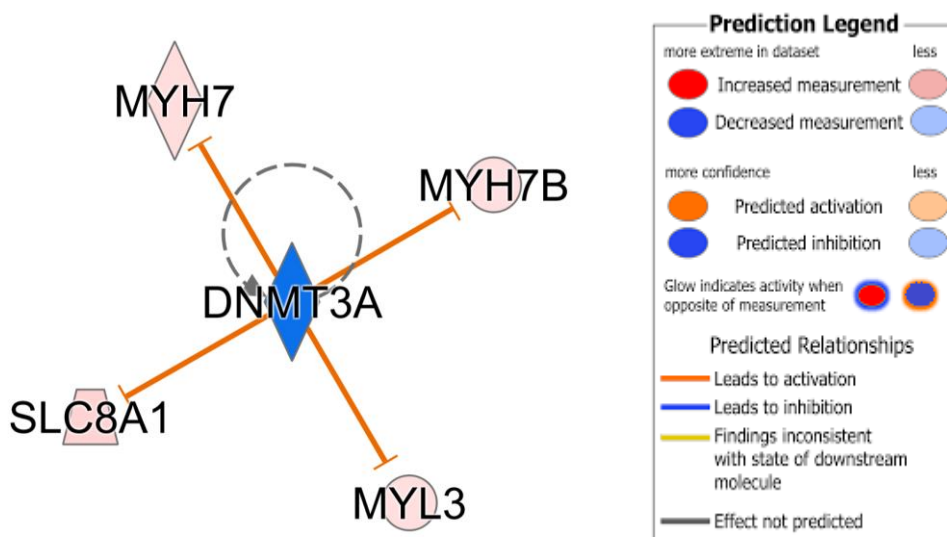
Visando uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no remodelamento do proteoma dos cardiomiócitos no modelo de hipertrofia estudado neste trabalho, nós utilizamos novamente o modelo causal do IPA para prever possíveis reguladores “upstream” do proteoma regulado. Essa análise utiliza os dados experimentais para imputar possíveis moléculas (fatores de transcrição, enzimas, micro-RNAs, etc) responsáveis pela modulação de proteínas reguladas utilizando a base de dados “Ingenuity



Knowledge Base” e calculando o z-score. Neste sentido, foi observado o papel central de duas proteoformas da DNA-metiltransferase (DNMT), a DNMT3A (Figura 19) e DNMT3B (Figura 20), sendo que nossos dados indicam uma possível inibição dessas enzimas pelo tratamento.

A metilação do DNA é uma marca epigenética hereditária que envolve a transferência de um grupo metil para uma citosina, sendo catalisada e regulada por DNMTs (141). Essas enzimas são bastante ativas durante a fase S do ciclo celular e copiam o padrão de metilação para a fita-filha de DNA recém-sintetizada. O padrão de metilação do DNA pode regular coordenadamente o grau de condensação da heterocromatina através da interação de DNMTs com outras modificações, principalmente a metilação de histonas (142), relacionado normalmente ao silenciamento transcricional (143).

Regiões do genoma ricas em motivos CpGs não metilados, as ilhas CpGs, são frequentemente encontradas em promotores, havendo uma resposta ao ambiente ou estímulos. Essas DNMTs podem ser recrutadas para tais regiões e reprimir a transcrição de alguns genes (143).



**Figura 19: Rede de interações entre a DNMT3A e seus alvos moleculares.** Como a DNMT3A inibe a transcrição dos genes MYH7, MYH7B, MYL3 e SLC8A1, e os

produtos desses genes (proteínas) foram regulados positivamente (dados experimentais, Tabela 6), o algoritmo previu que a DNMT3A foi inibida (z-score = -2,00) pelo tratamento

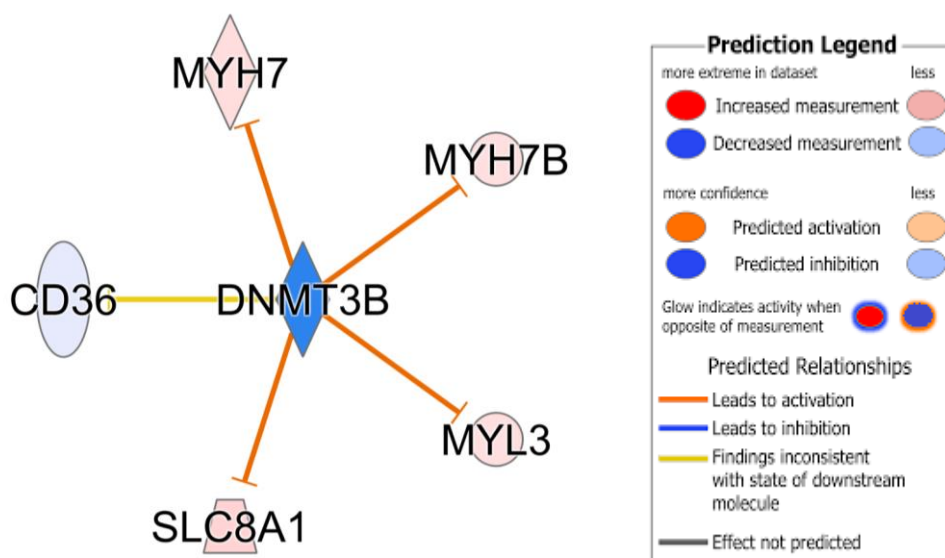
Como demonstrado na Figura 19, nossas análises indicaram uma possível inibição da atividade da DNMT3A na hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol (z-score = -2,00), pois essa enzima inibe a expressão gênica de MYH7, MYH7B, MYL3 e SLC8A1 (dados do “Ingenuity Knowledge Base”), e as proteínas associadas a esses genes foram reguladas positivamente pelo tratamento, como pode ser observado na figura e na Tabela 6. Esse cluster é formado por proteínas que compõem a cadeia de miosina, que é essencial para a função contrátil cardíaca, MYH7 (cadeia pesada 7 de miosina), MYH7B (cadeia pesada 7B de miosina), MYL3 (cadeia leve 3 de miosina), além do SLC8A1 ou NCX1 (trocaador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), responsável pela manutenção dos níveis desses íons, principalmente durante o processo de acoplamento excitação/contração.

O trabalho de Fang e colaboradores (144) corrobora com os nossos dados. O knockout da DNMT3A em cardiomiócitos embrionários levou a uma considerável diminuição dos níveis de metilação encontrados nos promotores de Myh7, Myh7b, Tnni3 (troponina I3) e Tnnt2 (troponina T2). O efeito direto disso é a superexpressão de proteínas envolvidas com a contração cardíaca e isso pode potencializar o desenvolvimento da hipertrofia patológica, comprometendo a contratilidade das células adultas (145).

Em um modelo de hipertrofia patológica induzida por DBcAMP (Dibutilil-cAMP), também foi visualizado que a DNMT3A regula genes diretamente relacionados a cardiomiopatia hipertrófica (Myh7, Gata4, Mef2c, Nfatc1, Myh7b, Tnni3, Bnp) (146).

A DNMT3B também foi possivelmente inibida pelo tratamento (Figura 20). Além das proteínas citadas acima que compõem a cadeia pesada da miosina, essa enzima também inibe a expressão do CD36. A inibição da DNMT3B também deveria induzir um aumento da abundância do CD36. Contudo, como

pode ser observado na Figura 20 e na Tabela 6, o tratamento induziu uma regulação negativa do CD36, indicando a participação de um outro regulador de expressão gênica para essa proteína ou, ainda, que a mesma é alvo de degradação (via ubiquitina-proteassoma, por exemplo) após o tratamento.



**Figura 20: Rede de interações entre a DNMT3B e seus alvos moleculares.** Como a DNMT3A inibe a transcrição dos genes MYH7, MYH7B, MYL3 e SLC8A1, e os produtos desses genes (proteínas) foram regulados positivamente (dados experimentais, Tabela 6), o algoritmo previu que a DNMT3B foi inibida (z-score = -1,34) pelo tratamento)

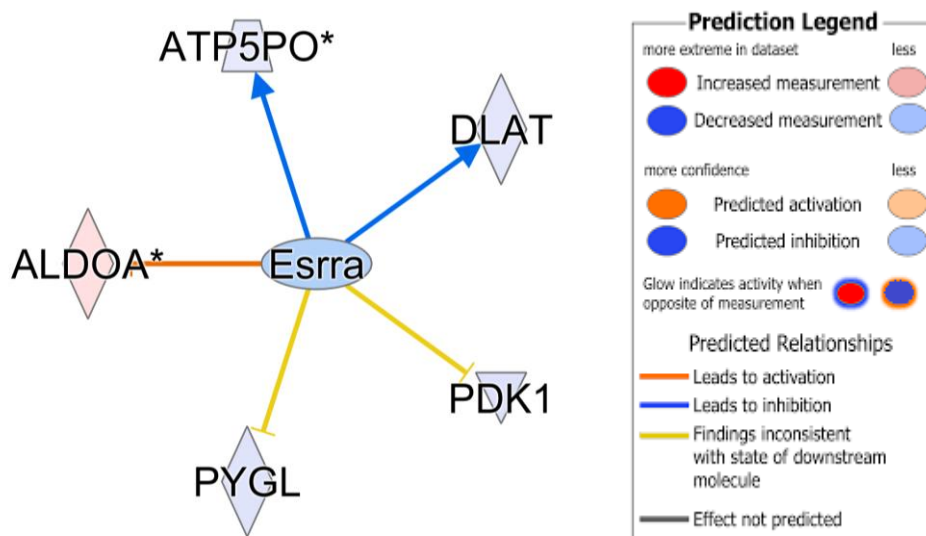
O CD36 é um translocador de alta afinidade para ácidos graxos advindos de lipoproteínas e albumina, fornecendo um suporte metabólico importante para os cardiomiócitos. A diminuição da sua expressão acelera a progressão da hipertrofia cardíaca compensada para insuficiência (147), o que pode ser ampliada na presença de alta oferta de lipídeos, devido ao acúmulo dessas moléculas e inflamação (148).

Alguns trabalhos relatam a metilação do promotor da CD36, além de alguns SNPs que agem independentes, para a regulação do transcrito (149). No entanto, no que tange a metilação, ainda não é claro qual DNMT é o responsável por este evento. Com base nos achados deste trabalho, sugere-se

verificar o papel da DNMT3B no controle da expressão de CD36, que poderia afetar a taxa metabólica da célula, condicionando a uma hipertrofia patológica ou não.

O ESRRA (receptor alfa nuclear relacionado a estrogênio) também foi destacado como uma proteína chave na regulação do proteoma de cardiomiócitos hipertrofiados, sendo predita a inibição da atividade desse receptor (Figura 21). O ESRRA induz a expressão de genes relacionados diretamente com a produção de energia, como a ATP5O (complexo F1 da ATP sintase) e o DLAT (dióxido de piruvato desidrogenase-PDH). Por outro lado, o ESRRA tem papel inibitório para a ALDOA (aldolase A), PDK1 (piruvato desidrogenase quinase) e PYGL (glicogênio fosforilase hepática). Essas proteínas possuem clara relação metabólica, sendo o DLAT envolvido na produção de acetil-CoA a partir de piruvato e CoASH, que é posteriormente direcionado para o ciclo do ácido cítrico, para a produção de coenzimas reduzidas que geram o gradiente de prótons  $H^+$  no espaço intermembrana mitocondrial, sendo utilizado como força motriz pela ATP sintase (o qual ATP5O faz parte) para a produção do ATP. Como essas proteínas foram reguladas negativamente pelo tratamento (Figura 21 e Tabela 6), e observamos a via de disfunção mitocondrial super-representada no nosso estudo (Figura 18), juntamente com o aumento de enzimas da glicólise (Figura 18 e Tabela 6), podemos sugerir que o metabolismo dos cardiomiócitos é deslocado para um processo anaeróbico ou uma diminuição do metabolismo mitocondrial e apoptose. .

O ESRRA participa como cofator da via PPAR $\alpha$  (que é induzido e coativado por PGC1 $\alpha$ ), tendo um papel importante durante a cardiomiopatia dilatada (150). Além disso, camundongos knockout para o ESRRA são viáveis e férteis, mas exibem estoques de fosfocreatina cardíaca reduzidos, capacidade de síntese de ATP e força contrátil reduzida seguida de sobrecarga pressórica pela diminuição da  $\beta$ -oxidação mitocondrial (151).



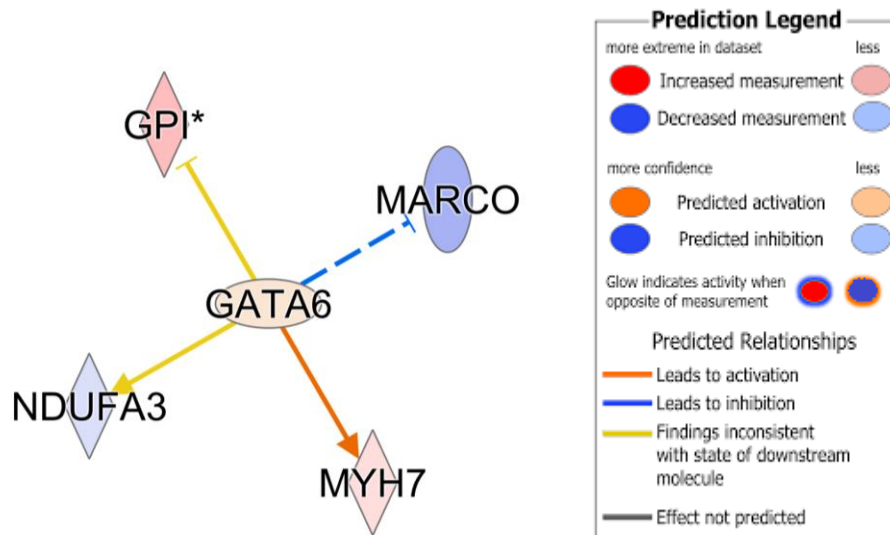
**Figura 21: Rede de interações entre o ESRRA e seus alvos moleculares.** O ESRRA (receptor alfa nuclear relacionado a estrogênio) induz a expressão dos genes ATP5PO e DLAT, assim como a inibição dos genes PDK1, PYGL e ALDOA. O algoritmo previu a inibição do ESRRA (z-score = -0,39) pelo tratamento

Como pode ser observado na Figura 22, o tratamento com isoproterenol parece ativar o GATA6, um fator de transcrição que pode regular a hipertrofia cardíaca patológica, juntamente com o GATA4 (152). Em animais adultos, são reguladores essenciais para ANF (fator natriurético atrial), BNP (peptídeo natriurético tipo b), MYH6, MYH7, dentre outros (153, 154).

A regulação positiva de MYH7 foi relatada como alvo direto da ativação de GATA6 (Figura 22), corroborando com a literatura. Diferentemente do CD36, que pode mediar a formação de células espumosas e aterosclerose, não há estudos que relatem a ligação do MARCO (receptor de macrófago com estrutura colagenosa), um receptor “scavenger”, com o GATA6 em doenças do cardiovasculares (155).

Não existem evidências experimentais do papel do GPI1 (glicose fosfato isomerase 1) na hipertrofia cardíaca, apesar de ser uma enzima da via glicolítica. Como pode ser observado na Figura 22, a ativação da GATA6 deveria regular negativamente essa proteína, mas nossos dados mostram um

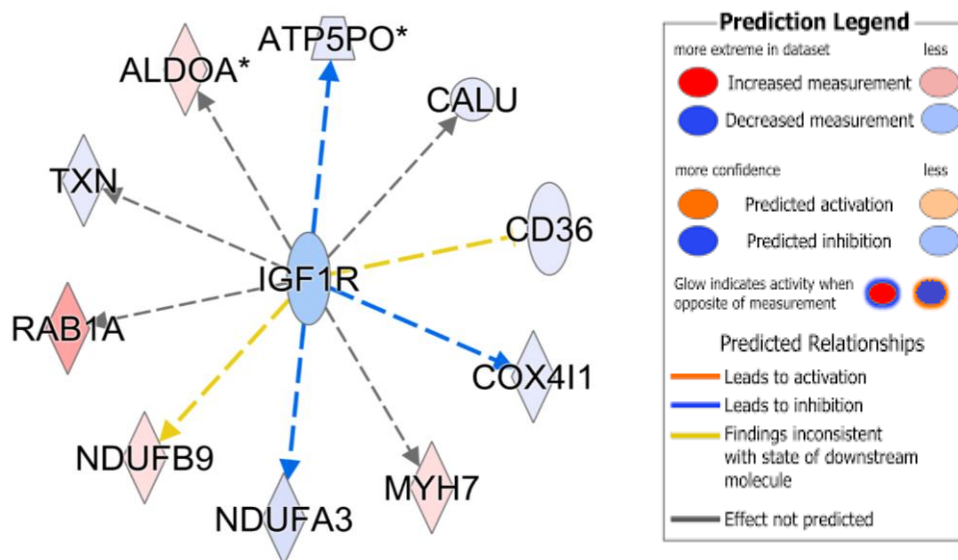
aumento de produção do GPI1 pelo tratamento, indicando que um outro mediador deve regular a expressão e síntese dessa enzima. A mesma inconsistência foi observada para o NDUFA3 (NADH:ubiquinona oxidoreductase subunidade A3), que faz parte dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, responsável pela geração do gradiente de prótons no espaço intermembrana mitocondrial para a geração de ATP.



**Figura 22: Rede de interações entre o GATA6 e seus alvos moleculares.** O GATA6 induz a expressão dos genes MYH7 e NDUFA3, assim como a inibição de GPI e MARCO. O algoritmo previu a ativação do GATA6 (z-score = 0,22) pelo tratamento

O receptor de IGF1R está envolvido em processos metabólicos vitais e, como pode ser observado na Figura 23, ele parece ser regulado negativamente durante a hipertrófica cardíaca. Já foi verificado em murinos, knockout para IGF1R e IGF1, que uma cardiomiopatia dilatada precoce é gerada, levando a insuficiência cardíaca letal antes do primeiro mês de vida (156). Ele é capaz de ativar a expressão de ATP5PO, ALDOA, NDUFA3, NDUFB9 (NADH:Ubiquinona Oxidoreductase subunidade B9), COX4I1 (citocromo c oxidase subunidade 4I1), todas relacionadas a processos catabólicos para geração de ATP. O CD36, que já discutimos anteriormente, além da CALU (calumenina) e o RAB1A (proteína relacionada a ras Rab-1A), são proteínas

envolvidas com o tráfego celular entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi.



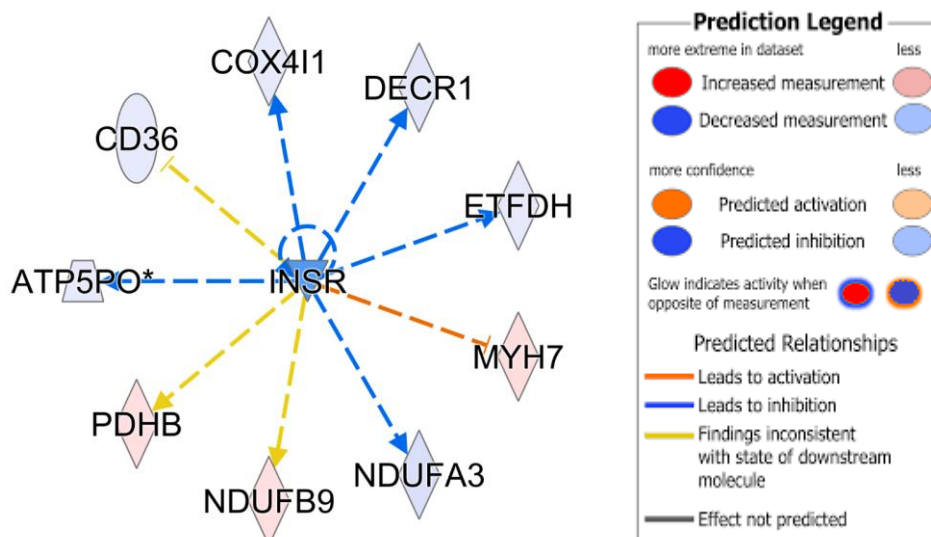
**Figura 23: Rede de interações entre o IGF1R e seus alvos moleculares.** O IGF1R induz a expressão dos genes MYH7, NDUFA3, NDUFB9, RAB1A, TXN, ALDOA, ATP5PO, CALU, CD36 e COX411. O algoritmo previu a inibição do IGF1R (z-score = -0,45) pelo tratamento

Outro cluster intimamente relacionado ao metabolismo de glicose e geração de ATP está relacionado ao INSR (receptor de insulina), que é possivelmente inibido durante a hipertrofia induzida por isoproterenol (Figura 24). A insulina, agonista desse receptor, sinaliza a captação de glicose pelas células, afim de destiná-la a via glicolítica, especialmente em células cardíacas que possuem uma intensa atividade metabólica.

No músculo esquelético a PDFB, ATP5PO e COX411, dentre outros genes envolvidos na biogênese e metabolismo mitocondrial, são corregulados por PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  (coativador do PPAR gama 1-alfa e beta, respectivamente) (157). Estes fatores de transcrição integram todo o processo de sinalização celular promovido pela insulina e INSR (158-160), confirmando o papel central deste receptor, em que uma demanda energética alta desencadeia toda a via

em que são produzidas e ativadas enzimas relacionadas à respiração celular. Por ser um mecanismo essencial à célula, acredita-se que os mesmos eventos são visualizados no cardiomiócito.

Durante restrição calórica, quando a atividade do INSR é menor, também é visualizado uma mudança da atividade de ATP5PO, PDHB, COX4I1 e MYH7. A restrição calórica aumenta a atividade da mitocôndria e resistência ao estresse oxidativo, provocando um remodelamento mitocondrial, que se mostra resistente a angiotensina II, que também é responsável por também causar dano ao tecido cardíaco (161). Ela age aumentando a produção de ROS (espécies reativas de O<sub>2</sub>) mitocondrial, ativando vias de sinalização sensíveis ao estresse oxidativo relacionadas a hipertrofia cardíaca e apoptose, como a via p38-MAPK (p38 - proteína quinase ativada por mitógeno), NF-κB (factor nuclear kappa B) e calcineurina-NFAT (fator nuclear de células T ativadas) (162, 163). O efeito hipertrófico cardíaco gerado pela angiotensina II, além de estar associado ao estresse oxidativo, a diminuição da expressão de genes mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons está sendo associada a alteração do metabolismo de lipídios, o qual o CD36 está envolvido por participar como translocados de ácidos graxos destinados a β-oxidação (164).

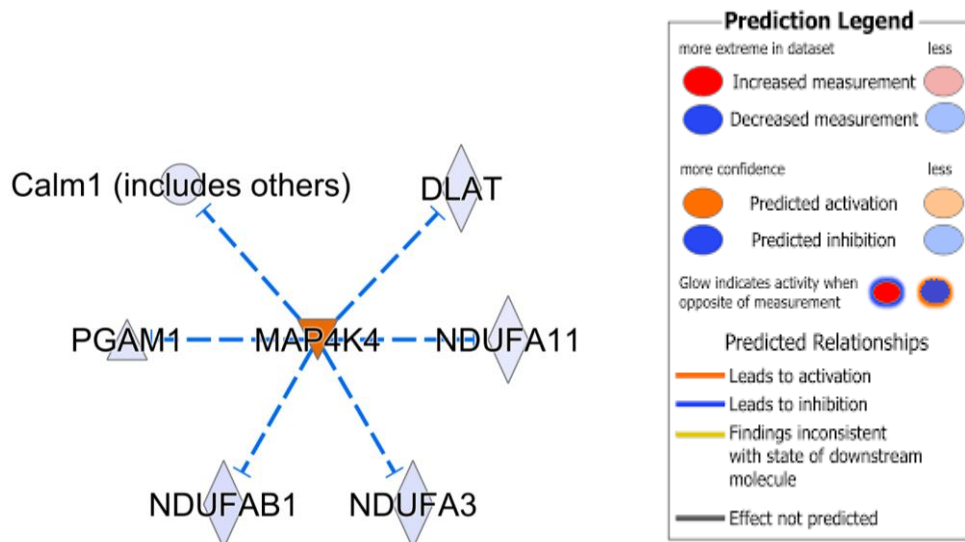


**Figura 24: Rede de interações entre o INSR e seus alvos moleculares.** O algoritmo previu a inibição do INSR (z-score = -1,00) pelo tratamento



O estresse oxidativo é intimamente ligado ao processo de hipertrofia cardíaca e a geração de radicais livres. Em animais irradiados no útero, foram encontradas consistentes alterações do proteoma cardíaco associadas a MAP4K4 (165). Na condição de hipertrofia induzida por isoproterenol, a MAP4K4 também parece ter um papel de destaque, possivelmente sendo ativada pelo tratamento (Figura 25). A sua ativação é condizente com a regulação negativa de PGAM1 (fosfoglicerato mutase 1), NDUFA3 e NDUFA11, indicando que o metabolismo energético é alterado no nosso modelo, além da regulação negativa de DLAT e NDUFAB1 (NADH:ubiquinona oxidoredutase subunidade AB1), que estão envolvidas nas mesmas vias mitocondriais.

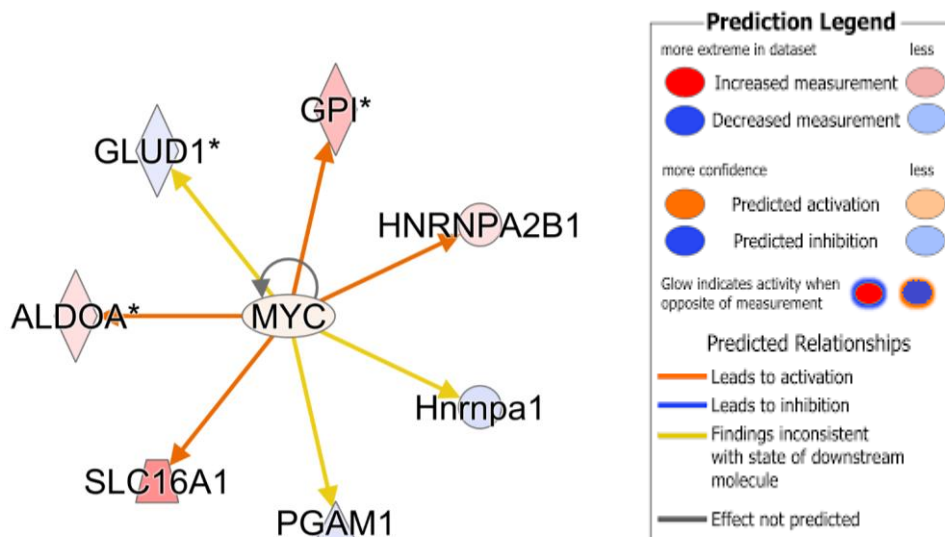
A CALM3 (calmodulina 3 na Tabela 6) foi encontrada regulada negativamente neste trabalho e está associada a vários processos de regulação celular dependentes do aumento do transiente de íons  $Ca^{2+}$  e proteínas quinases/fosfatases, incluindo cardiopatias como a síndrome do longo QT (166)



**Figura 25: Rede de interações entre a MAP4K4 e seus alvos moleculares.** O algoritmo previu a ativação da MAP4K4 (z-score = 2,45) pelo tratamento

O protooncogene c-Myc é reconhecido como um fator de transcrição que regula a hipertrofia cardíaca compensatória, aumentando a expressão de enzimas envolvidas na glicólise, ciclo do ácido cítrico e  $\beta$ -oxidação (167). A Figura 26 indica a ativação do MYC nos cardiomiócitos hipertrofiados, correlacionando com a regulação positiva observada para ALDOA e GP1, pertencentes à glicólise, e SLC16A1 (transportador de monocarboxilato 1), que catalisa a transferência de piruvato, lactato, corpos cetônicos, aminoácidos de cadeia ramificada derivados da leucina, fornecendo substratos para geração de energia (168). A adequação metabólica a condição hipertrófica mediada por MYC é importante em um primeiro momento, no entanto, a sua desregulação pode ser relacionada ao quadro patológico (169).

Além das enzimas metabólicas, o MYC pode atuar sobre a HNRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogênea), a HNRNPA1 e a HNRNPA2B1 (regulada positivamente neste estudo). Essa classe de proteínas está envolvida com o processamento e modificação pre-miRNAs, e a alteração da sua expressão está envolvida com alteração da pressão sanguínea e falhas cardíacas.

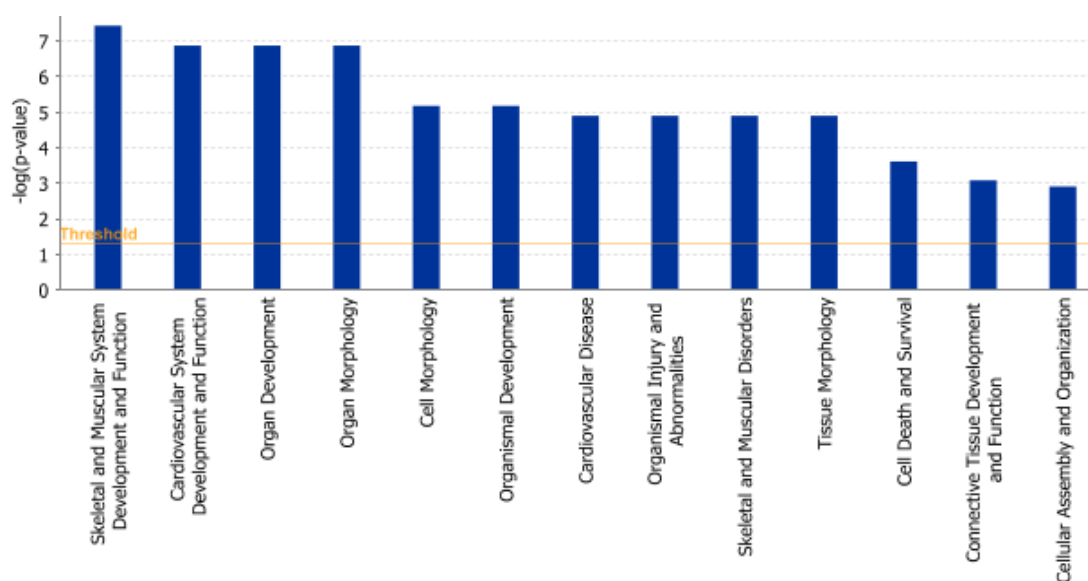


**Figura 26: Rede de interações entre o MYC e seus alvos moleculares.** O algoritmo previu a ativação do MYC (z-score = 0,11) pelo tratamento

Um estudo proteômico recente também destacou a regulação das proteínas HNRNPA1, HNRNPA2 e ALDOA no remodelamento metabólico gerado por agentes hipertróficos cardíacos (170).

Resumidamente, as análises descritas acima indicaram várias moléculas (DNMT3A, DNMT3B, ESRRA, GATA6, IGF1R, INSR, MAP4K4 e MYC) que possivelmente são reguladoras do proteoma cardíaco após a indução de hipertrofia pelo isoproterenol, podendo apresentar importantes alvos moleculares para o tratamento dessa patologia.

Seguindo nossas análises, focamos nos potenciais efeitos deletérios (doenças e anomalias) que o proteoma diferencialmente regulado dos cardiomiócitos poderia estar associado. A Figura 27 representa as doenças e funções biológicas associadas ao nosso “dataset” (proteínas reguladas pelo tratamento). Pode-se observar um predomínio de patologias e processos relacionados ao desenvolvimento, morfologia e função do sistema cardiovascular.



**Figura 27: Doenças e funções biológicas.** Na figura estão representadas as 13 patologias e funções biológicas mais representadas (menores valores-p) associadas ao nosso “dataset” (proteínas reguladas pelo tratamento). É possível notar uma grande presença de processos relacionados ao desenvolvimento, morfologia e função do sistema cardiovascular

Nós focamos as análises nos dois processos mais representativos: “desenvolvimento e função do sistema muscular” e “desenvolvimento e função do sistema cardiovascular” (Figura 27). Dentro desses processos, percebemos a modulação (ativados ou inibidos) de algumas funções, usando a análise causal do IPA (z-score), que estão representadas na Figura 28 como redes causais (proteínas → função). Como pode ser observado, as proteínas destacadas participam de processos de contração do coração, influenciam na quantidade de células musculares (miócitos) e na contratilidade do miocárdio do ventrículo (Figura 28). Pesquisando sobre quais genes ou proteínas seriam importantes no processo de cardiomiopatia e hipertrofia cardíaca, observamos uma proteína interessante associada a via de sinalização de cálcio (Figura 18) e importante na indução de hipertrofia. O gene SLC8A1 codifica um trocador de íons  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX1), regulado positivamente pelo tratamento (Tabela 6), que é essencial para regular a homeostase em cardiomiócitos durante o acoplamento excitação-contração. Em seu modo direto, esse trocador transporta um íon  $\text{Ca}^{2+}$  para o exterior da célula em troca da entrada de três íons  $\text{Na}^+$ , sendo a principal via de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  em células cardíacas (171). Além disso, dependendo do potencial de membrana e da concentração intracelular, pode haver um transporte bidirecional através da membrana do sarcolema (172, 173). Em modelos experimentais de hipertrofia e insuficiência cardíaca, ocorre um mecanismo compensatório a partir do aumento do NCX1, que melhora a função devido a maior carga de  $\text{Ca}^{2+}$  celular, principalmente no modo reverso (173, 174). Além disso, durante a estimulação farmacológica seletiva para NCX1, observa-se uma melhora da função sistólica/vascular. Por exemplo, a curcumina (pigmento amarelo da rizoma de Curcuma) é capaz de modular a expressão de NCX1 e promover uma inibição da hipertrofia cardíaca, melhora da sístole/diástole e preservação do endotélio vascular em ratos (173). Sendo assim, a NCX1 apresenta um grande potencial como alvo terapêutico no tratamento de pacientes que sofrem de hipertrofia ou insuficiência cardíaca.

Na Figura 28 podemos observar a influência do NCX1 (gene SLC8A1) na contração do coração, na quantidade de células musculares e na contratilidade

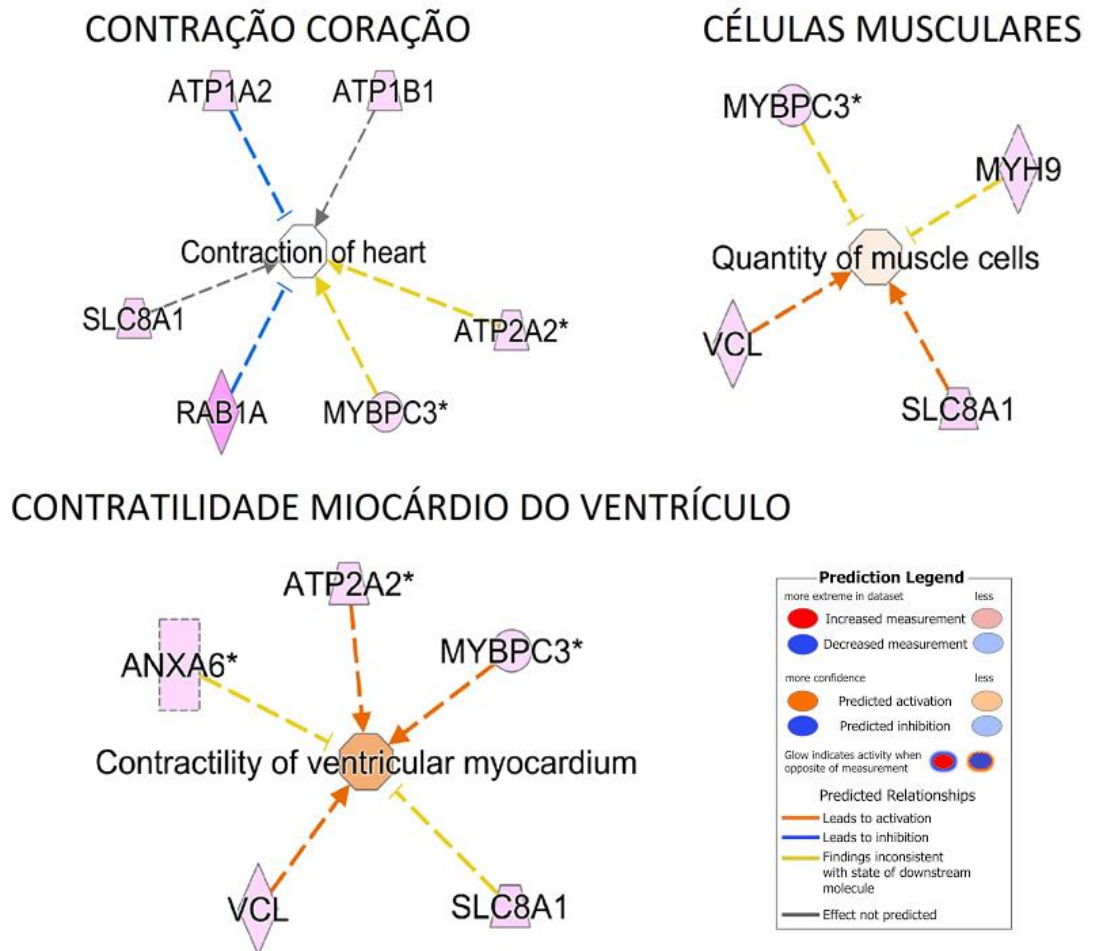
do miocárdio do ventrículo. Como visto anteriormente, o NCX1 está relacionado a uma melhora da sístole, ou seja, atua na contração do coração e na contratilidade do miocárdio (175). Isso se deve ao seu papel essencial na regulação do cálcio, principalmente do retículo sarcoplasmático.

Além do NCX1, outras proteínas foram associadas aos processos descritos na Figura 28, sendo encontrados genes que codificam proteínas essenciais a função contrátil cardíaca, como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, subunidades  $\alpha$  (ATP1A2) e  $\beta$  (ATP1B1); a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, SERCA (ATP2A2); e a proteína ligadora de miosina C, subunidade cardíaca (MYBPC3). Em especial a subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (ATP1A2), que é um sítio para ouabaína, foi encontrada com expressão alterada em modelos de hipertensão crônica murina induzida por cloreto de sódio (176). A atividade conjunta de bombas de íons necessita da expressão coordenada, em que se inclui o próprio NCX1, para que o processo de excitação e contração dos cardiomiócitos seja eficiente, com as correntes de influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  provoquem a despolarização da célula, sendo o aumento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  importante para ligar às proteínas contráteis do citoesqueleto, provocando a contração (acoplamento excitação-contração).

A modulação da vinculina (VCL) também foi uma presença frequente no nosso estudo, que é uma proteína associada à cardiomiopatia e está intimamente vinculada a ligação ao citoesqueleto em adesões focais (177), além de participar da polarização, migração e adaptação da matriz extracelular (ECM) (178). Os dados sugerem uma relação entre o NCX1 e a vinculina, possivelmente devido ao modelo de indução de hipertrofia patológica utilizado, em que há a alteração da expressão, como o padrão de “splicing” alternativo (177), no entanto, ainda não há relatos na literatura que expliquem a relação entre essas duas proteínas.

Apesar da nossa análise não predizer o efeito do NCX1 (SLC8A1) sobre a contração do coração (Figura 28), sabe-se que há um papel fundamental dessa proteína durante o processo de excitação-contração do músculo cardíaco. Da

mesma forma, é possível perceber que uma diminuição da expressão da molécula NCX1 levaria a redução da contratilidade do miocárdio do ventrículo devido ao desequilíbrio de cálcio. Analisando as células musculares, o aumento da expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  induz a ativação das células musculares por promover o relaxamento do cardiomiócito e atuar no processo de acoplamento excitação-contração.



**Figura 28: Proteínas reguladas pelo tratamento com o isoproterenol e seus potenciais efeitos na função e proliferação do tecido cardíaco.** Baseado nos dados experimentais, o algoritmo calculou o z-score para os processos: contração do coração (z-score = -0,01), quantidade de miócitos (z-score = 0,15) e contratilidade do miocárdio ventricular (z-score = 0,75)

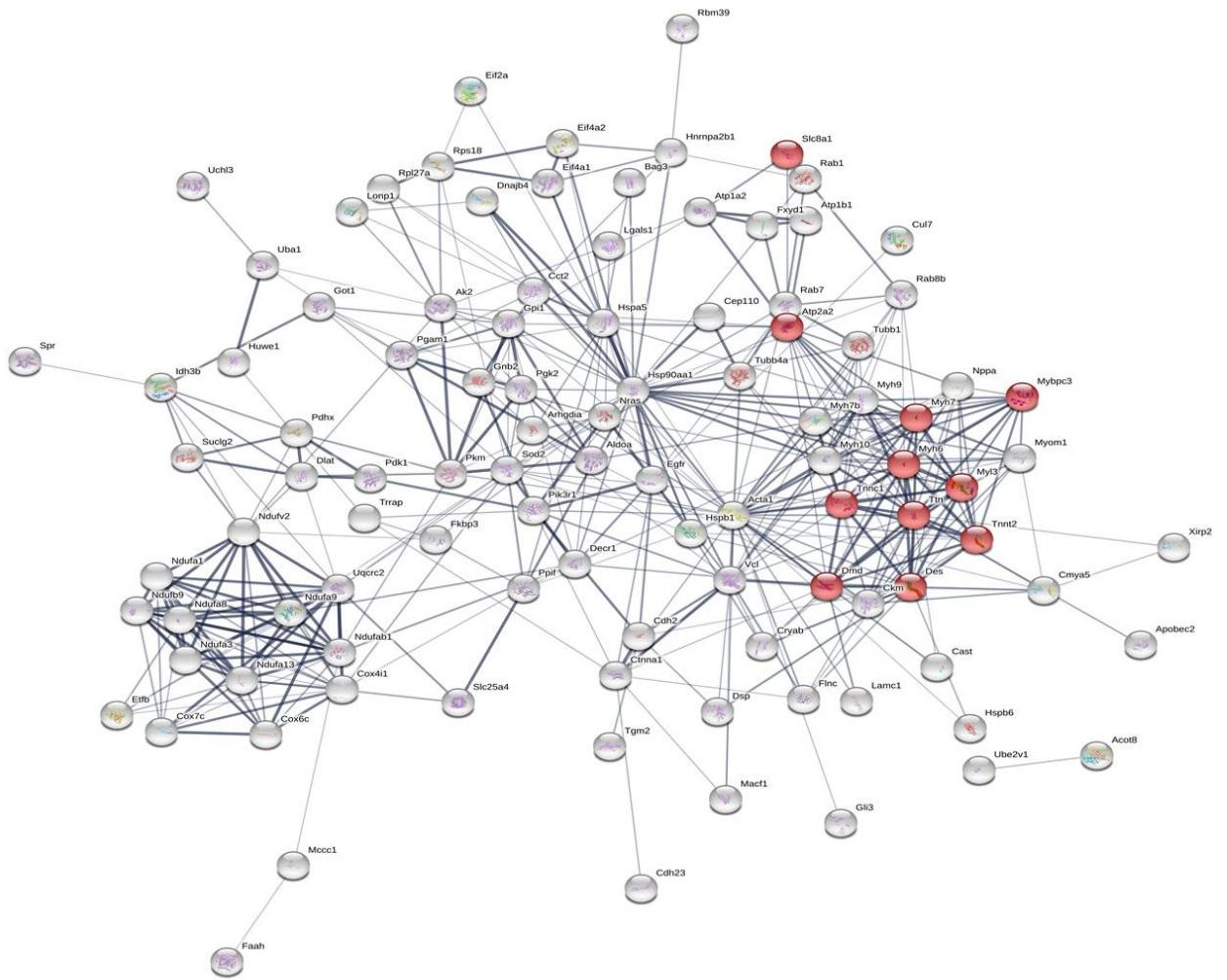
O nosso estudo proteômico forneceu dados robustos para indicar possíveis moléculas que participam do processo de hipertrofia patológica. Este trabalho

possibilitou: (i) identificar as vias de sinalização afetadas pelo tratamento (Figura 18); (ii) associar as possíveis moléculas reguladoras do processo de remodelamento do proteoma dos cardiomiócitos (Figuras 19 a 26); e (iii) relacionar as proteínas reguladas pelo isoproterenol com possíveis consequência fisiopatológica (Figuras 27 e 28).

Finalmente, decidimos criar uma rede de interações proteína-proteína (Figura 29), utilizando apenas as moléculas reguladas pelo tratamento, com o software STRING, que utiliza dados experimentais, co-ocorrência e expressão, vizinhança, mineração de dados, e ação molecular para inferir associações entre os genes/proteínas e, a partir desses dados, determinar diferentes graus de interação e expressão, que podem ser organizados em clusters de função biológica já conhecida ou predita (179).

Como o nosso interesse era verificar as proteínas relacionadas à hipertrofia, realizamos uma análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) usando o termo “cardiomiopatia”. As proteínas associadas a essa patologia estão destacadas em vermelho na figura. É possível visualizar um grande cluster de interações de proteínas relacionadas com a cardiomiopatia, incluindo as cadeias leve e pesada da miosina (MYH7, MYBPC3, MYH6 e MYL3), duas proteoformas de troponina, a C1 e T2 (TNNC1 e TNNT2, respectivamente), a titina (TTN), assim como outras proteínas citoesqueléticas, como a distrofina (DMD) e a desmina (DES).

Também foi verificada a presença da SERCA (ATP2B2) e da NCX1 (SLC8A1) formando um cluster com proteínas que não foram associadas ao processo de cardiomiopatia, podendo representar moléculas importantes nesta patologia, mas que ainda não foram estudadas.



**Figura 29: Rede de interações proteína-proteína.** A espessura das conexões entre os nodos (proteínas) indica o grau de confiança da interação. Foi realizado um enriquecimento utilizando a ontologia gênica (GO) para verificar as proteínas reconhecidamente envolvidas no processo de hipertrofia e cardiomiopatia (vermelho)



## **5. CONCLUSÃO**

O processo do remodelamento cardíaco induzido pelo tratamento com isoproterenol produziu alterações nas proteínas dos cardiomiócitos e da matriz descelularizada. Constatamos a presença de proteínas relacionadas a tensão miocárdica, transmissão de força e manutenção da integridade das células na análise da matriz após o processo de descelularização, que promove a remoção das células e mantém a matriz extracelular (ECM).

Os dados do proteoma dos cardiomiócitos demonstraram o envolvimento de algumas vias importantes nesta patologia, como por exemplo a  $\beta$ -oxidação, respiração celular, sinalização de cálcio e vias glicolíticas. As proteínas moduladas pelo isoproterenol se relacionam com os processos metabólicos da célula e o processo de excitação-contração do músculo cardíaco. Assim sendo, durante o remodelamento cardíaco, observa-se alterações de proteínas que interagem com moléculas para promover uma compensação da insuficiência cardíaca por meio da hipertrofia do tecido cardíaco.

O estudo permite uma melhor compreensão das redes de interações existentes entre as proteínas celulares e da matriz descelularizada que estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento da patologia estudada.

## **Perspectivas Futuras**

A partir dos dados gerados neste trabalho, em que foram identificadas proteínas-chave no modelo de hipertrofia cardíaca patológica, novas vertentes de estudo podem se abrir. A primeira delas é a verificação experimental dos componentes essenciais de cada rede de interações formada. Outro potencial de estudo é a análise da participação de reguladores transcricionais, como microRNA, durante a hipertrofia sobre o proteoma cardíaco.

É interessante que no futuro também seja analisada a correlação entre os dados obtidos com dados gerados em quadros de hipertrofia cardíaca da espécie humana e, assim, elencar fatores que possam ser utilizados como marcadores precoce desta patologia que tanto afeta a população.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Cardiovascular diseases (CVDs) May 2017. World Health Organization. Available from: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European heart journal*. 2008;29(2):270-6.
3. Cramariuc D, Gerds E. Epidemiology of left ventricular hypertrophy in hypertension: implications for the clinic. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2016;14(8):915-26.
4. Izzo R, Losi MA, Stabile E, Lonnebakken MT, Canciello G, Esposito G, et al. Development of Left Ventricular Hypertrophy in Treated Hypertensive Outpatients: The Campania Salute Network. *Hypertension*. 2017;69(1):136-42.
5. Gavaghan M. Cardiac Anatomy and Physiology: A Review. *AORN Journal*. 1998;67(4):800-22.
6. Esler M, Kaye D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35(7 Suppl 4):S1-7.
7. Romhilt DW, Estes EH, Jr. A point-score system for the ECG diagnosis of left ventricular hypertrophy. *American heart journal*. 1968;75(6):752-8.
8. Peng Y, Gregorich ZR, Valeja SG, Zhang H, Cai W, Chen YC, et al. Top-down proteomics reveals concerted reductions in myofilament and Z-disc protein phosphorylation after acute myocardial infarction. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014;13(10):2752-64.

9. Stenger RJ, Spiro D. The Ultrastructure of Mammalian Cardiac Muscle. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961;9(2):325-51.
10. Huxley AF. Muscular contraction. *The Journal of physiology*. 1974;243(1):1-43.
11. Fozzard HA. Cardiac muscle: excitability and passive electrical properties. *Progress in cardiovascular diseases*. 1977;19(5):343-59.
12. Hund TJ, Rudy Y. Determinants of excitability in cardiac myocytes: mechanistic investigation of memory effect. *Biophysical journal*. 2000;79(6):3095-104.
13. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews*. 2005;85(4):1205-53.
14. Beaumont J, Michaels DC, Delmar M, Davidenko J, Jalife J. A model study of changes in excitability of ventricular muscle cells: inhibition, facilitation, and hysteresis. *Am J Physiol*. 1995;268(3 Pt 2):H1181-94.
15. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
16. Dulhunty AF. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006;33(9):763-72.
17. Iino M. Molecular aspects of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *The Japanese journal of physiology*. 1999;49(4):325-33.
18. Marie V, Silva JE. Calcium pool size modulates the sensitivity of the ryanodine receptor channel and calcium-dependent ATPase of heavy sarcoplasmic reticulum to extravesicular free calcium concentration. *Journal of cellular physiology*. 1998;175(3):283-94.

19. Wang SQ, Lakatta EG, Cheng H, Zhou ZQ. Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *The Journal of experimental biology*. 2002;205(Pt 19):2957-62.
20. Stokes DL, Wagenknecht T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the ryanodine receptor. *European journal of biochemistry*. 2000;267(17):5274-9.
21. Wolosker H, de Meis L. Ligand-gated channel of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport ATPase. *Bioscience reports*. 1995;15(5):365-76.
22. Haghghi K, Gregory KN, Kranias EG. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(4):1214-22.
23. Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RH. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular research*. 2003;57(1):20-7.
24. Wachter SB, Gilbert EM. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*. 2012;122(2):104-12.
25. Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(2):322-30.
26. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356-63.
27. Yatani A, Tajima Y, Green SA. Coupling of beta-adrenergic receptors to cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels: preferential coupling of the beta1 versus beta2 receptor subtype and evidence for PKA-independent activation of the channel. *Cellular signalling*. 1999;11(5):337-42.

28. Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, Zeriouh M, Schmack B, Farag M, et al. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Medical science monitor basic research*. 2016;22:75-9.
29. Choi SY, Cho KI, Han YJ, You GI, Kim JH, Heo JH, et al. Impact of Pheochromocytoma on Left Ventricular Hypertrophy and QTc Prolongation: Comparison with Takotsubo Cardiomyopathy. *Korean circulation journal*. 2014;44(2):89-96.
30. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology*. 2003;65:45-79.
31. Ligeti I. [Physiological cardiac enlargement]. *Orvosi hetilap*. 1960;101:598-601.
32. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;128(1):191-227.
33. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation*. 1975;56(1):56-64.
34. Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Shroff SG. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;10 Suppl 6:S37-50.
35. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004;109(13):1580-9.
36. Katholi RE, Couri DM. Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clinical applications. *International journal of hypertension*. 2011;2011:495349.

37. Abbas AK, Fausto N, Kumar V, Cotran RS, Aster JC, L RS. Robbins e Cotran: - Bases patológicas das doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
38. Madamanchi A. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students.* 2007;10(2):99-104.
39. Brodde OE, Hillemann S, Kunde K, Vogelsang M, Zerkowski HR. Receptor systems affecting force of contraction in the human heart and their alterations in chronic heart failure. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 1992;11(4 Pt 2):S164-74.
40. Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *Journal of the American College of Cardiology.* 1995;26(5):1257-63.
41. Katsuomi G, Shimizu I, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, et al. Catecholamine-Induced Senescence of Endothelial Cells and Bone Marrow Cells Promotes Cardiac Dysfunction in Mice. *International heart journal.* 2018;59(4):837-44.
42. Colucci WS, Sawyer DB, Singh K, Communal C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. *Journal of cardiac failure.* 2000;6(2 Suppl 1):1-7.
43. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2003;4(7):552-65.
44. Sütsch G, Brunner UT, von Schulthess C, Hirzel HO, Hess OM, Turina M, et al. Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circulation research.* 1992;70(5):1035-43.



45. Bing OHL, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart failure reviews*. 2002;7(1):71-88.
46. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, et al. Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2003;26(10):829-37.
47. von Harsdorf R, Lang RE, Fullerton M, Woodcock EA. Myocardial stretch stimulates phosphatidylinositol turnover. *Circulation research*. 1989;65(2):494-501.
48. Sussman MA, McCulloch A, Borg TK. Dance Band on the Titanic: Biomechanical Signaling in Cardiac Hypertrophy. *Circulation research*. 2002;91(10):888.
49. Franchini KG, Clemente CF, Marin TM. Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2009;42(1):44-52.
50. Leenen FH, White R, Yuan B. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;281(6):H2410-6.
51. Taylor PB, Tang Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1984;62(4):384-9.
52. Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comparative medicine*. 2009;59(4):339-43.

53. Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN, Saxena P, Banerjee SK, Bhadra MP. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats. *Journal of translational medicine*. 2013;11:130.
54. Dietrichs ES, Sager G, Tveita T. Altered pharmacological effects of adrenergic agonists during hypothermia. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2016;24(1):143.
55. Wilkins M. Proteomics data mining. *Expert review of proteomics*. 2009;6(6):599-603.
56. Van Eyk JE. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. *Circulation research*. 2011;108(4):490-8.
57. Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, et al. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009;75(10):816-32.
58. Choe LH, Werner BG, Lee KH. Two-dimensional protein electrophoresis: from molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2006;3(3):327-35.
59. Chapter 1 Theory and fundamental aspects of isoelectric focusing. In: Righetti PG, editor. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. 11: Elsevier; 1983. p. 1-86.
60. Magdeldin S, Zhang Y, Xu B, Yoshida Y, Yamamoto T. *Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis - A Practical Perspective* 2012.
61. Melani RD. Estratégias proteômicas “bottom-up” e “top-down” aplicadas à venômica: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2016.

62. Shen Y, Zhang R, Moore RJ, Kim J, Metz TO, Hixson KK, et al. Automated 20 kpsi RPLC-MS and MS/MS with chromatographic peak capacities of 1000-1500 and capabilities in proteomics and metabolomics. *Analytical chemistry*. 2005;77(10):3090-100.
63. Fournier ML, Gilmore JM, Martin-Brown SA, Washburn MP. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chem Rev*. 2007;107(8):3654-86.
64. Gross JH. *Mass Spectrometry*  
A Textbook: Springer; 2011.
65. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2:140.
66. Korte R, Brockmeyer J. Novel mass spectrometry approaches in food proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017;96:99-106.
67. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABTd, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2012;58:366-75.
68. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications* 2007.
69. Carvalho PC, Fischer JdSdG, Degraive WM, Carvalho MdGdC. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2006;42:431-6.
70. Hirano H, Islam N, Kawasaki H. Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry*. 2004;65(11):1487-98.
71. Suh SO, Grosso KM, Carrion ME. Multilocus phylogeny of the Trichophyton mentagrophytes species complex and the application of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass

- spectrometry for the rapid identification of dermatophytes. *Mycologia*. 2018;110(1):118-30.
72. Zaluzec EJ, Gage DA, Watson JT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein expression and purification*. 1995;6(2):109-23.
73. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry*. 2012;2012:282574.
74. Nguyen S, Fenn JB. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(4):1111-7.
75. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
76. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*. 2000;72(6):1156-62.
77. Hustoft H, Malerod H, Wilson S, Reubsaet L, Lundanes E, Greibrokk T. A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics 2012.
78. Sadygov RG, Cociorva D, Yates JR, 3rd. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. *Nature methods*. 2004;1(3):195-202.
79. Nogueira FC, Domont GB. Survey of shotgun proteomics. *Methods in molecular biology*. 2014;1156:3-23.
80. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular Proteomics. Evolution and Potential. 2001;88(8):763-73.

81. Rocha LA, Oliveira KS, Migliolo L, Franco OL. Effect of Moderate Exercise on Mitochondrial Proteome in Heart Tissue of Spontaneous Hypertensive Rats. *American journal of hypertension*. 2016;29(6):696-704.
82. Wang JJ, Rau C, Avetisyan R, Ren S, Romay MC, Stolin G, et al. Genetic Dissection of Cardiac Remodeling in an Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model. *PLoS genetics*. 2016;12(7):e1006038.
83. Mitra A, Basak T, Ahmad S, Datta K, Datta R, Sengupta S, et al. Comparative Proteome Profiling during Cardiac Hypertrophy and Myocardial Infarction Reveals Altered Glucose Oxidation by Differential Activation of Pyruvate Dehydrogenase E1 Component Subunit beta. *Journal of molecular biology*. 2015;427(11):2104-20.
84. Liu T, Chen L, Kim E, Tran D, Phinney BS, Knowlton AA. Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure. *Life sciences*. 2014;101(1-2):27-36.
85. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular research*. 2010;85(2):376-84.
86. Urbonavicius S, Wiggers H, Botker HE, Nielsen TT, Kimose HH, Ostergaard M, et al. Proteomic analysis identifies mitochondrial metabolic enzymes as major discriminators between different stages of the failing human myocardium. *Acta cardiologica*. 2009;64(4):511-22.
87. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2016;106(1):62-9.
88. Greenwood JP, Scott EM, Stoker JB, Mary DA. Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to peripheral sympathetic drive. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;38(6):1711-7.

89. Gallego-Delgado J, Lazaro A, Osende JI, Barderas MG, Duran MC, Vivanco F, et al. Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *Journal of proteome research*. 2006;5(2):404-13.
90. Jin X, Xia L, Wang LS, Shi JZ, Zheng Y, Chen WL, et al. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Proteomics*. 2006;6(6):1948-56.
91. White MY, Cordwell SJ, McCarron HC, Prasan AM, Craft G, Hambly BD, et al. Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems. *Proteomics*. 2005;5(5):1395-410.
92. Molojavyi A, Lindecke A, Raupach A, Moellendorf S, Kohrer K, Godecke A. Myoglobin-deficient mice activate a distinct cardiac gene expression program in response to isoproterenol-induced hypertrophy. *Physiological genomics*. 2010;41(2):137-45.
93. Zhang W, Elimban V, Nijjar MS, Gupta SK, Dhalla NS. Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. *Experimental and clinical cardiology*. 2003;8(4):173-83.
94. Lau E, Cao Q, Ng DC, Bleakley BJ, Dincer TU, Bot BM, et al. A large dataset of protein dynamics in the mammalian heart proteome. *Scientific data*. 2016;3:160015.
95. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology*. 2010;341(1):126-40.
96. Santos A, Tonelli FP, Silva DF, Gomes K, Ladeira L, Resende R. The Role of Cell Adhesion, Cell Junctions, and Extracellular Matrix in Development and Carcinogenesis. In: Resende RR, Ulrich H, editors. *Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research*: Springer Netherlands; 2013. p. 13-49.

97. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R. Integrins in invasive growth. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(8):999-1006.
98. Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Pathology International*. 1993;43(6):283-93.
99. Takawale A, Sakamuri SS, Kassiri Z. Extracellular matrix communication and turnover in cardiac physiology and pathology. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(2):687-719.
100. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(5):608-16.
101. Carvalho JL, Carvalho PHd, Gomes DA, Goes AMd. Innovative Strategies for Tissue Engineering2013 2013-03-27.
102. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324(5935):1673-7.
103. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
104. Liao M, Liu Z, Bao J, Zhao Z, Hu J, Feng X, et al. A proteomic study of the aortic media in human thoracic aortic dissection: implication for oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;136(1):65-72, .e1-3.
105. Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, et al. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *Journal of proteome research*. 2008;7(11):5004-16.
106. Mayr M, Yusuf S, Weir G, Chung Y-L, Mayr U, Yin X, et al. Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(5):585-94.

107. de Castro Bras LE, Ramirez TA, DeLeon-Pennell KY, Chiao YA, Ma Y, Dai Q, et al. Texas 3-step decellularization protocol: looking at the cardiac extracellular matrix. *Journal of proteomics*. 2013;86:43-52.
108. Parreira RC. Análise de Biomarcadores da Matriz Extracelular do coração de camundongos tratados com Isoproterenol [Dissertação]: UFMG; 2015.
109. Didangelos A, Yin X, Mandal K, Saje A, Smith A, Xu Q, et al. Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(8):M111 008128.
110. Barallobre-Barreiro J, Didangelos A, Schoendube FA, Drozdov I, Yin X, Fernandez-Caggiano M, et al. Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2012;125(6):789-802.
111. Jones M EEE, Walters S M, Ferrans V J, Clark R E., editor Effects of 2 types of pre-implantation processes on calcification of bioprosthetic valves'. *Proceedings of the Third international Symposium Yorke Medical Books*; 1986; New York.
112. Badylak S, Taylor D, Uygun K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2011:27-53.
113. Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation research*. 2003;92(11):1171-5.
114. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular research*. 1998;39(1):60-76.



115. RONA G, CHAPPEL CI, BALAZS T, GAUDRY R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol.* 1959;67(4):443-55.
116. Mladenka P, Hrdina R, Bobrovova Z, Semecky V, Vavrova J, Holeckova M, et al. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Human & experimental toxicology.* 2009;28(10):631-40.
117. Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, et al. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 1997;29(10):2735-46.
118. Wang LX, Yang X, Yue Y, Fan T, Hou J, Chen GX, et al. Imatinib attenuates cardiac fibrosis by inhibiting platelet-derived growth factor receptors activation in isoproterenol induced model. *PloS one.* 2017;12(6):e0178619.
119. Guatimosim S, Sobie EA, dos Santos Cruz J, Martin LA, Lederer WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. *American journal of physiology Cell physiology.* 2001;280(5):C1327-39.
120. Naba A, Clauser KR, Hynes RO. Enrichment of Extracellular Matrix Proteins from Tissues and Digestion into Peptides for Mass Spectrometry Analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2015(101):e53057.
121. Karpievitch Y, Stanley J, Taverner T, Huang J, Adkins JN, Ansong C, et al. A statistical framework for protein quantitation in bottom-up MS-based proteomics. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2028-34.
122. Kramer A, Green J, Pollard J, Jr., Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics.* 2014;30(4):523-30.
123. Wang H, Chang-Wong T, Tang HY, Speicher DW. Comparison of extensive protein fractionation and repetitive LC-MS/MS analyses on depth of analysis for complex proteomes. *Journal of proteome research.* 2010;9(2):1032-40.

124. LeWinter MM, Granzier HL. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63(3):207-12.
125. Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circulation research.* 2001;89(11):1065-72.
126. Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, et al. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation.* 2002;106(11):1384-9.
127. Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovascular research.* 2003;59(1):86-94.
128. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation.* 2006;113(16):1966-73.
129. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, et al. Titin Isoform Switch in Ischemic Human Heart Disease. *Circulation.* 2002;106(11):1333-41.
130. Yin Z, Ren J, Guo W. Sarcomeric protein isoform transitions in cardiac muscle: a journey to heart failure. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1852(1):47-52.
131. He Y, Zhang Z, Hong D, Dai Q, Jiang T. Myocardial fibrosis in desmin-related hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance.* 2010;12:68.

132. Watkins SC, Samuel JL, Marotte F, Bertier-Savalle B, Rappaport L. Microtubules and desmin filaments during onset of heart hypertrophy in rat: a double immunoelectron microscope study. *Circulation research*. 1987;60(3):327-36.
133. Kumar Y, Tatu U. Stress protein flux during recovery from simulated ischemia: induced heat shock protein 70 confers cytoprotection by suppressing JNK activation and inhibiting apoptotic cell death. *Proteomics*. 2003;3(4):513-26.
134. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(1):59-71.
135. Kee HJ, Eom GH, Joung H, Shin S, Kim JR, Cho YK, et al. Activation of histone deacetylase 2 by inducible heat shock protein 70 in cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2008;103(11):1259-69.
136. Chanarat S, Strasser K. Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(10):2126-34.
137. Lu H, Fedak PW, Dai X, Du C, Zhou YQ, Henkelman M, et al. Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*. 2006;114(21):2271-9.
138. Matsushima S, Sadoshima J. The role of sirtuins in cardiac disease. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2015;309(9):H1375-89.
139. Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(20):6384-401.

140. Sundaresan NR, Vasudevan P, Zhong L, Kim G, Samant S, Parekh V, et al. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nature medicine*. 2012;18(11):1643-50.
141. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & cancer*. 2011;2(6):607-17.
142. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2014;1839(12):1362-72.
143. Long HK, Sims D, Heger A, Blackledge NP, Kutter C, Wright ML, et al. Epigenetic conservation at gene regulatory elements revealed by non-methylated DNA profiling in seven vertebrates. *eLife*. 2013;2:e00348.
144. Fang X, Poulsen RR, Wang-Hu J, Shi O, Calvo NS, Simmons CS, et al. Knockdown of DNA methyltransferase 3a alters gene expression and inhibits function of embryonic cardiomyocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(9):3238-55.
145. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2003;92(10):1079-88.
146. Fang X, Robinson J, Wang-Hu J, Jiang L, Freeman DA, Rivkees SA, et al. cAMP induces hypertrophy and alters DNA methylation in HL-1 cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2015;309(6):C425-C36.
147. Sung MM, Byrne NJ, Kim TT, Levasseur J, Masson G, Boisvenue JJ, et al. Cardiomyocyte-specific ablation of CD36 accelerates the progression from compensated cardiac hypertrophy to heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2017;312(3):H552-H60.

148. Abumrad NA, Goldberg IJ. CD36 actions in the Heart: lipids, calcium, inflammation, repair and more? *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1860(10):1442-9.
149. Love-Gregory L, Kraja AT, Allum F, Aslibekyan S, Hedman ÅK, Duan Y, et al. Higher chylomicron remnants and LDL particle numbers associate with CD36 SNPs and DNA methylation sites that reduce CD36. *Journal of lipid research*. 2016;57(12):2176-84.
150. Burke MA, Chang S, Wakimoto H, Gorham JM, Conner DA, Christodoulou DC, et al. Molecular profiling of dilated cardiomyopathy that progresses to heart failure. *JCI Insight*. 2016;1(6).
151. Vega RB, Kelly DP. Cardiac nuclear receptors: architects of mitochondrial structure and function. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(4):1155-64.
152. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Yamamura E, Joo K, et al. GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(33):13933.
153. Molkenin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(50):38949-52.
154. van Berlo JH, Elrod JW, van den Hoogenhof MMG, York AJ, Aronow BJ, Duncan SA, et al. The transcription factor GATA-6 regulates pathological cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2010;107(8):10.1161/CIRCRESAHA.110.220764.
155. Stephen SL, Freestone K, Dunn S, Twigg MW, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, et al. Scavenger Receptors and Their Potential as Therapeutic Targets in the Treatment of Cardiovascular Disease. *International journal of hypertension*. 2010;2010:646929.

156. Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, Entingh-Pearsall A, Holzenberger M, Liao R, et al. Essential Role of Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Signaling in Cardiac Development and Function. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(5):1649-64.
157. Gali Ramamoorthy T, Laverny G, Schlagowski A-I, Zoll J, Messaddeq N, Bornert J-M, et al. The transcriptional coregulator PGC-1 $\beta$  controls mitochondrial function and anti-oxidant defence in skeletal muscles. *Nature communications*. 2015;6:10210.
158. Pagel-Langenickel I, Bao J, Joseph JJ, Schwartz DR, Mantell BS, Xu X, et al. PGC-1 $\alpha$  integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(33):22464-72.
159. Hammarstedt A, Jansson PA, Wesslau C, Yang X, Smith U. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;301(2):578-82.
160. Qi Z, Ding S. Transcriptional Regulation by Nuclear Corepressors and PGC-1 $\beta$ : Implications for Mitochondrial Quality Control and Insulin Sensitivity. *PPAR Research*. 2012;2012:12.
161. Finckenberg P, Eriksson O, Baumann M, Merasto S, Lalowski MM, Levijoki J, et al. Caloric restriction ameliorates angiotensin II-induced mitochondrial remodeling and cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2012;59(1):76-84.
162. Dai DF, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kuttyavin V, Santana LF, et al. Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(1):73-82.

163. Mervaala E, Biala A, Merasto S, Lempiainen J, Mattila I, Martonen E, et al. Metabolomics in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2010;55(2):508-15.
164. Wellner M, Dechend R, Park JK, Shagdarsuren E, Al-Saadi N, Kirsch T, et al. Cardiac gene expression profile in rats with terminal heart failure and cachexia. *Physiological genomics*. 2005;20(3):256-67.
165. Bakshi MV, Azimzadeh O, Merl-Pham J, Verreet T, Hauck SM, Benotmane MA, et al. In-Utero Low-Dose Irradiation Leads to Persistent Alterations in the Mouse Heart Proteome. *PloS one*. 2016;11(6):e0156952.
166. Boczek NJ, Gomez-Hurtado N, Ye D, Calvert ML, Tester DJ, Kryshtal D, et al. Spectrum and Prevalence of CALM1-, CALM2-, and CALM3-Encoded Calmodulin (CaM) Variants in Long QT Syndrome (LQTS) and Functional Characterization of a Novel LQTS-Associated CaM Missense Variant, E141G. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2016;9(2):136-46.
167. Olson AK, Ledee D, Iwamoto K, Kajimoto M, O'Kelly Priddy C, Isern N, et al. C-Myc induced compensated cardiac hypertrophy increases free fatty acid utilization for the citric acid cycle. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;55:156-64.
168. Otonkoski T, Jiao H, Kaminen-Ahola N, Tapia-Paez I, Ullah MS, Parton LE, et al. Physical exercise-induced hypoglycemia caused by failed silencing of monocarboxylate transporter 1 in pancreatic beta cells. *American journal of human genetics*. 2007;81(3):467-74.
169. Taketani S, Sawa Y, Ichikawa H, Ohtake S, Nishimura M, Kawaguchi N, et al. Change of c-Myc expression and cardiac hypertrophy in patients with aortic valve replacement. *The Annals of thoracic surgery*. 2001;71(4):1154-9.
170. Liu R, Kenney JW, Manousopoulou A, Johnston HE, Kamei M, Woelk CH, et al. Quantitative Non-canonical Amino Acid Tagging (QuaNCAT) Proteomics Identifies Distinct Patterns of Protein Synthesis Rapidly Induced by

Hypertrophic Agents in Cardiomyocytes, Revealing New Aspects of Metabolic Remodeling. 2016;15(10):3170-89.

171. Ujihara Y, Iwasaki K, Takatsu S, Hashimoto K, Naruse K, Mohri S, et al. Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodelling. *Cardiovascular research*. 2016;111(4):348-61.

172. Wu PC, Kao LS. Calcium regulation in mouse mesencephalic neurons- Differential roles of Na(+)/Ca(2+) exchanger, mitochondria and endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 2016;59(6):299-311.

173. Bai XJ, Hao JT, Wang J, Zhang WF, Yan CP, Zhao JH, et al. Curcumin inhibits cardiac hypertrophy and improves cardiovascular function via enhanced Na(+)/Ca(2+) exchanger expression after transverse abdominal aortic constriction in rats. *Pharmacological reports : PR*. 2018;70(1):60-8.

174. Sipido KR, Volders PGA, Vos MA, Verdonck F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovascular research*. 2002;53(4):782-805.

175. Wang J, Song J, Gao E, Zhang XQ, Gu T, Yu D, et al. Induced overexpression of phospholemman S68E mutant improves cardiac contractility and mortality after ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;306(7):H1066-77.

176. Van Huysse JW, Dostanic I, Lingrel JB, Hou X, Wu H. Hypertension from chronic central sodium chloride in mice is mediated by the ouabain-binding site on the Na,K-ATPase alpha(2)-isoform. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(5):H2147-53.

177. Witt S, Zieseniss A, Fock U, Jockusch BM, Illenberger S. Comparative Biochemical Analysis Suggests That Vinculin and Metavinculin Cooperate in Muscular Adhesion Sites. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(30):31533-43.



178. Thievessen I, Fakhri N, Steinwachs J, Kraus V, Mclsaac RS, Gao L, et al. Vinculin is required for cell polarization, migration, and extracellular matrix remodeling in 3D collagen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(11):4555-67.

179. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic acids research*. 2005;33(Database issue):D433-7.



# 7.0 ANEXO 1 – RESULTADOS

## DESCELULARIZAÇÃO DISSERTAÇÃO

### 7.1 Descelularização

#### 7.1.1 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 fosfolipídeos, 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 Figura A-1 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 Figura A-1A, enquanto a Figura A-1B representa o tecido descelularizado com uma aparência transparente, devido a eliminação do conteúdo de células.

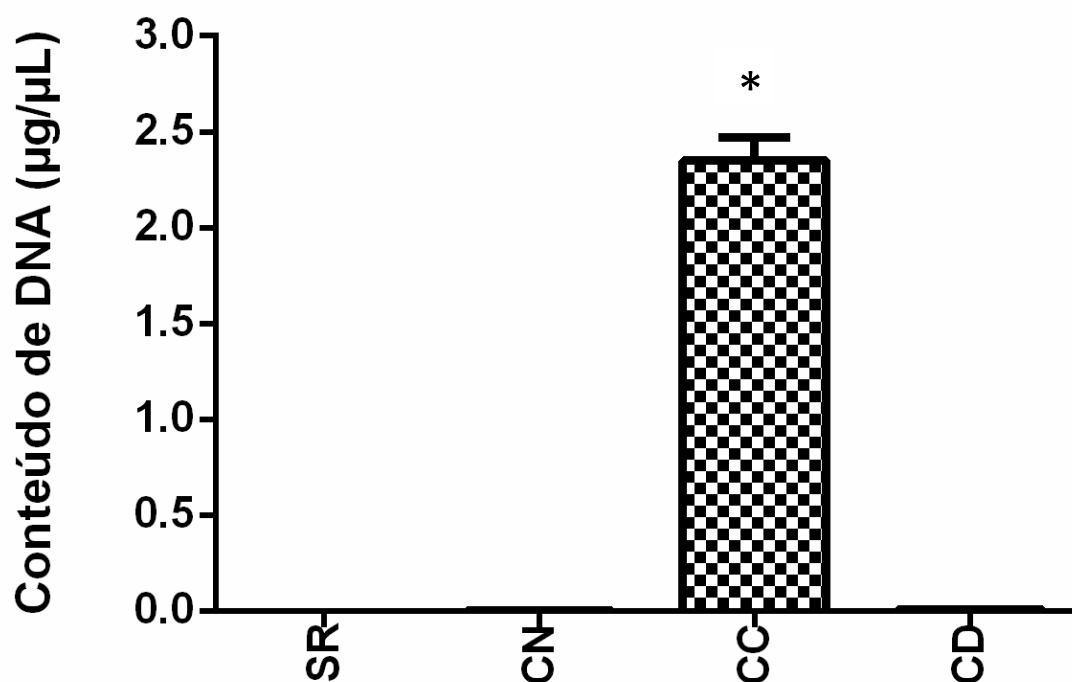


**Figura A-1 - Avaliação Macroscópica do Coração Descelularizado e Celularizado**

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.

### 7.1.2 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 A-2 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 muito baixos ( $0,008 \pm 0,002$ ).



SR: solução de ressuspensão  
 CN: controle negativo  
 CC: coração celularizado  
 CD: coração descelularizado

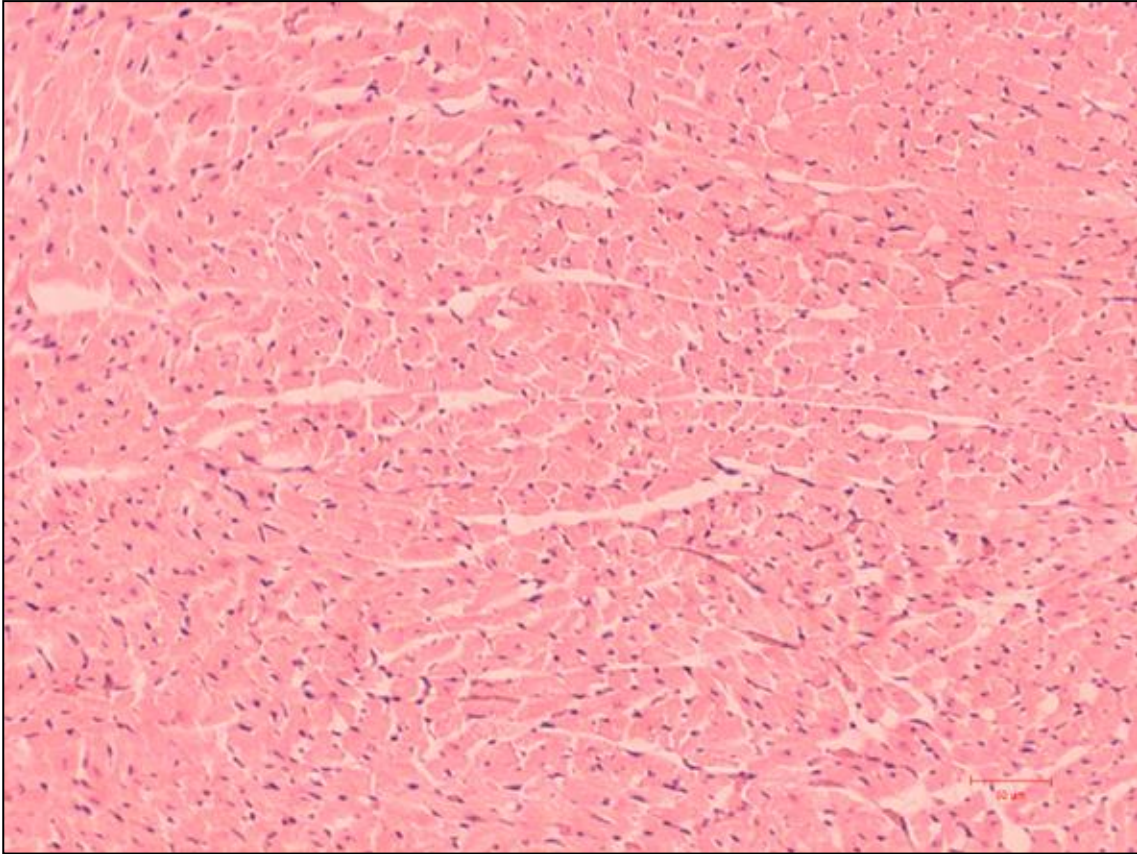
**Figura A-2 - Análise do conteúdo de DNA no coração descelularizado e com células** O coração celularizado possui conteúdo significativo de DNA, enquanto o submetido ao processo de descelularização apresenta valores baixos. \*  $p = 0,0026$ ;  $n = 3$ ; (Teste  $t$  não-paramétrico)

### 7.1.3 Histologia e Coloração HE e Tricômico de Masson

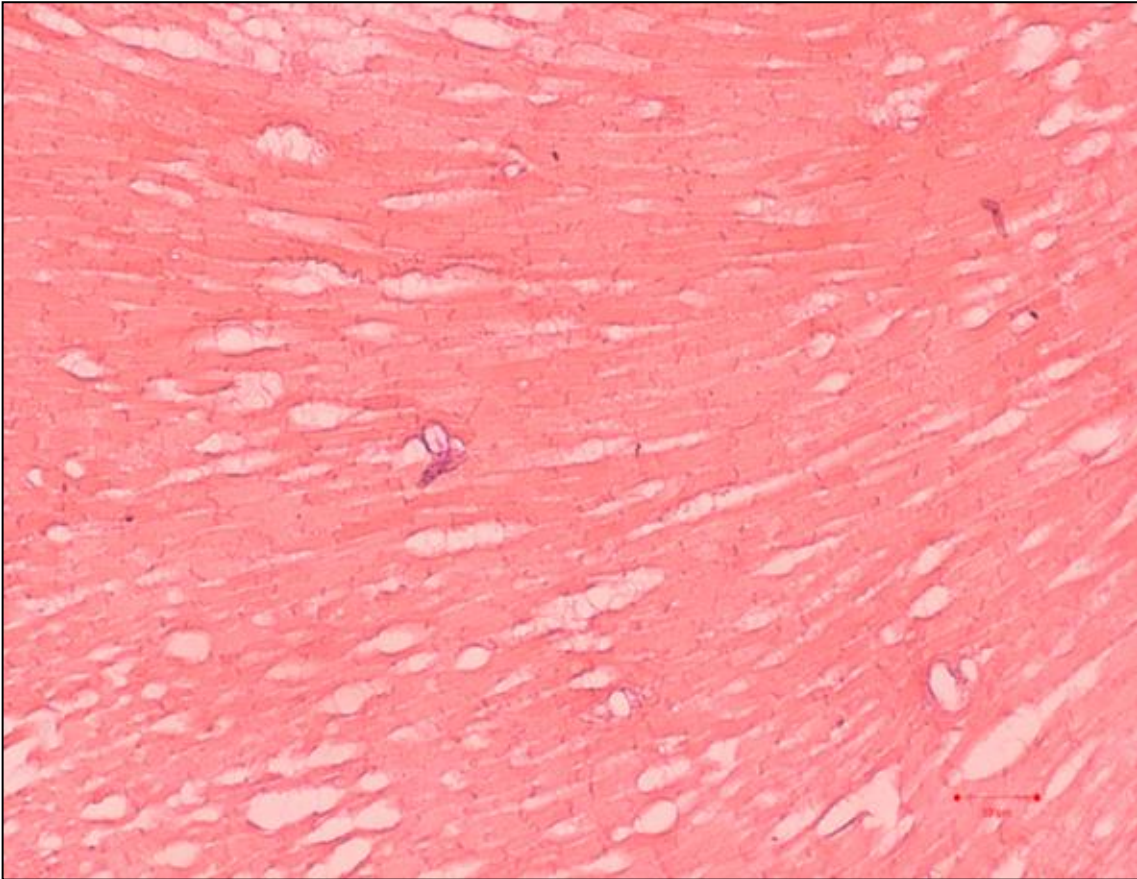
Cortes histológicos do coração celularizado e descelularizado foram realizados para demonstrar a presença de células musculares e fibras de colágeno no tecido. Os cortes foram submetidos aos dois tipos de coloração: HE

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 Figura A-3. Já no coração descelularizado, percebe-se ausência dos núcleos em tons arroxeados, sendo possível visualizar apenas a região que envolve as células, composta principalmente por fibras colágenas (Figura A-4).

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 descelularização que o tecido foi submetido promoveu danos ao tecido. Na Figura A-5 é possível observar essas características.

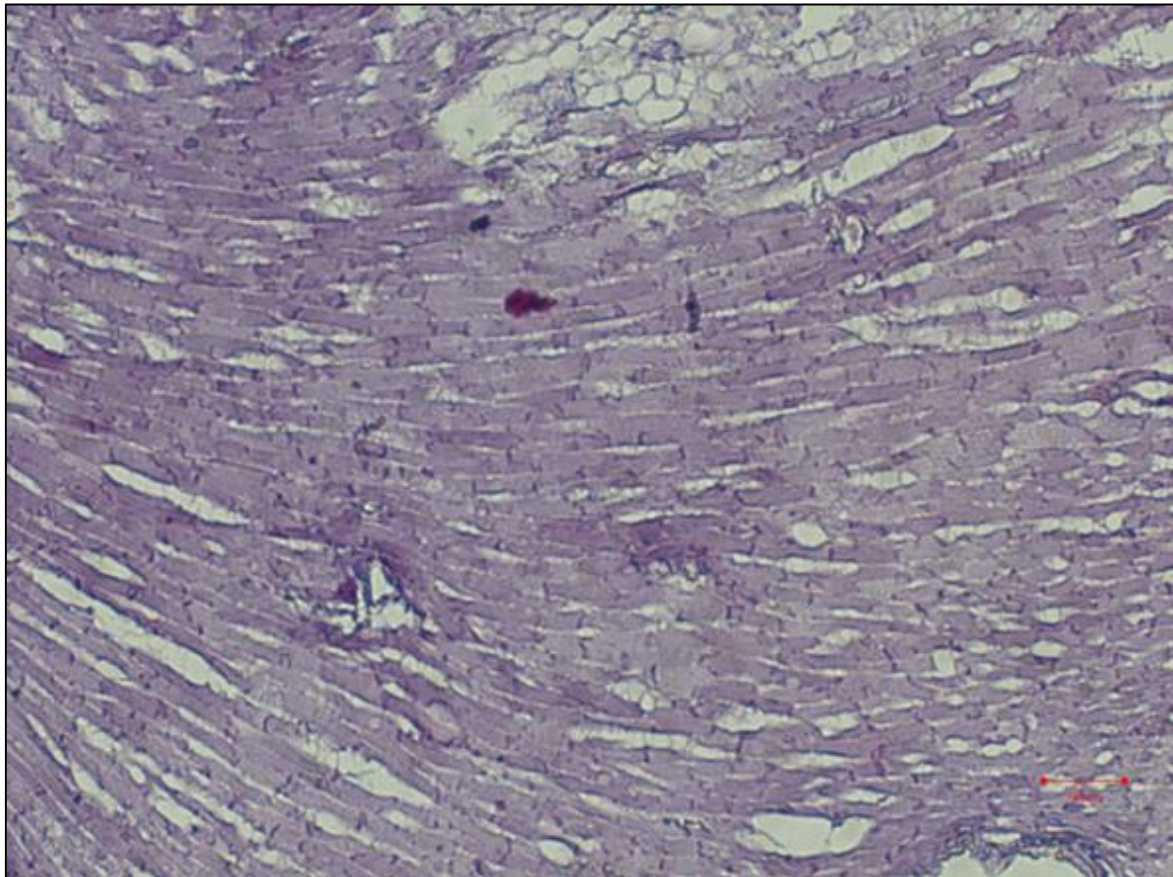


**Figura A-3 - Corte histológico do coração celularizado corado por HE – 20X** No corte histológico do coração descclularizado com HE percebe-se ausência de núcleos, indicando que o tecido pode ter perdido células devido ao processo de descclularização. Além disso, observa se que as fibras colágenas estão integras. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.



**Figura A-4 - 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 A-5 - 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 à matriz extracelular do tecido. n = 10; Camundongos C57BL/6WT.

#### **7.1.4 Microscopia eletrônica**

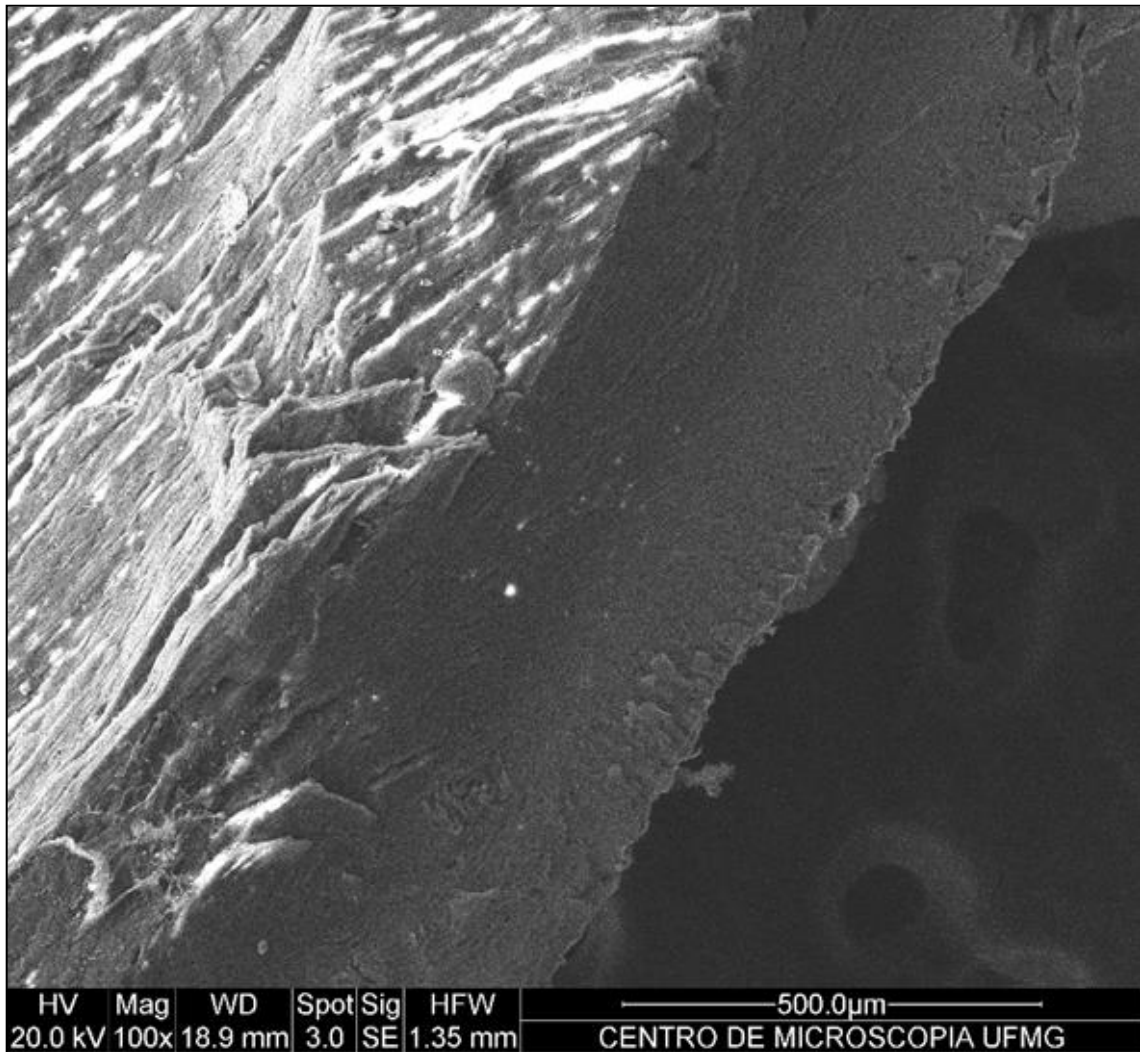
Com o intuito de demonstrar a topografia de superfície e as variações espaciais do tecido com células e do que foi submetido ao processo de descelularização, realizou-se microscopia eletrônica de varredura. Essa técnica utiliza um feixe de elétrons que reflete na amostra permitindo obter informações

a respeito da microestrutura do tecido, produzindo imagens de alta resolução da superfície.

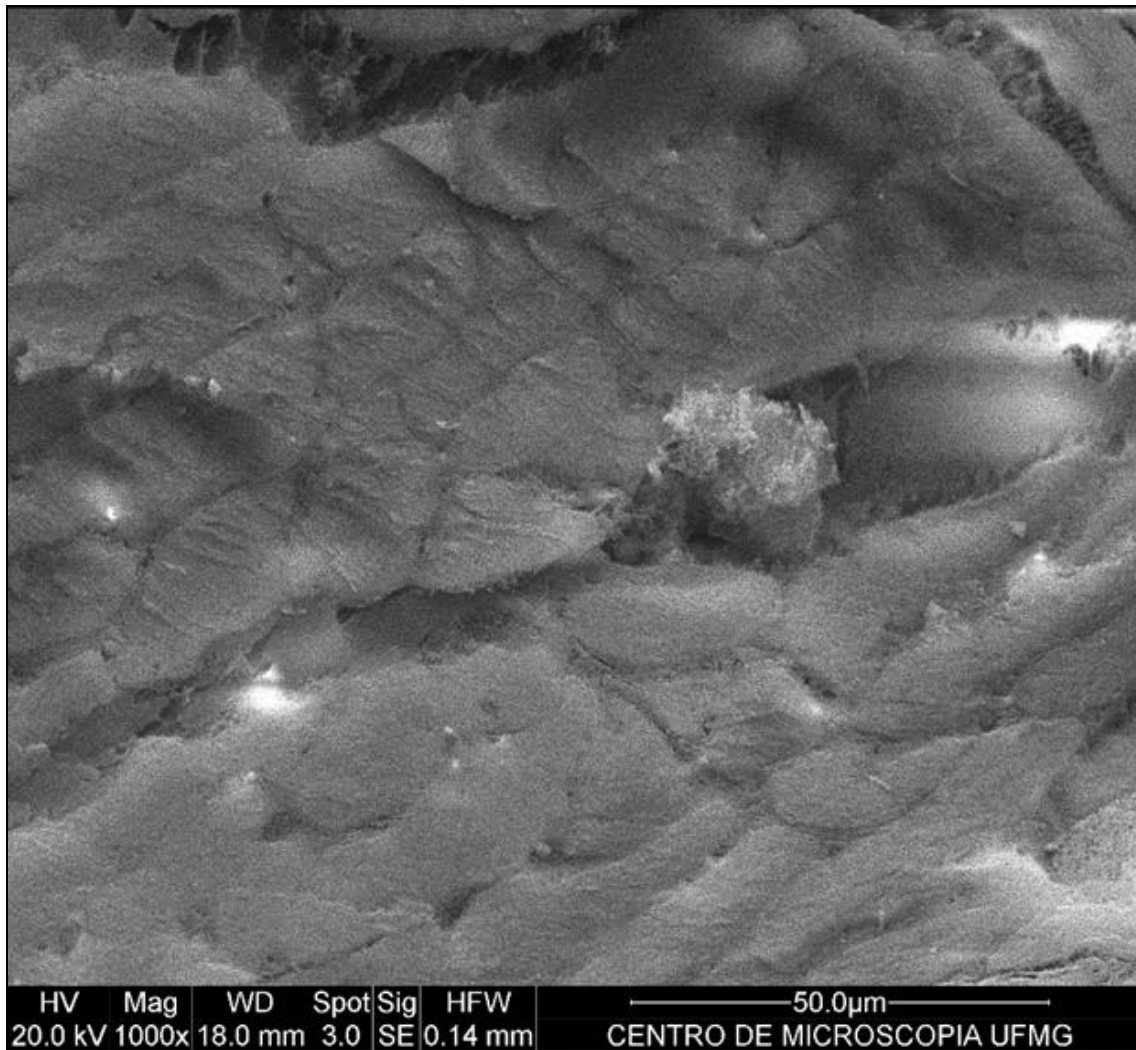
A microscopia eletrônica do tecido com células representada na Figura A-6 mostra as células cardíacas em forma de feixes em disposição longitudinal. Percebe-se também a profundidade do tecido, constituído por células e fibras de colágeno.

A Figura A-7 corresponde à microscopia eletrônica das células musculares cardíacas em corte transversal. É possível observar os limites em torno de cada fibra muscular.

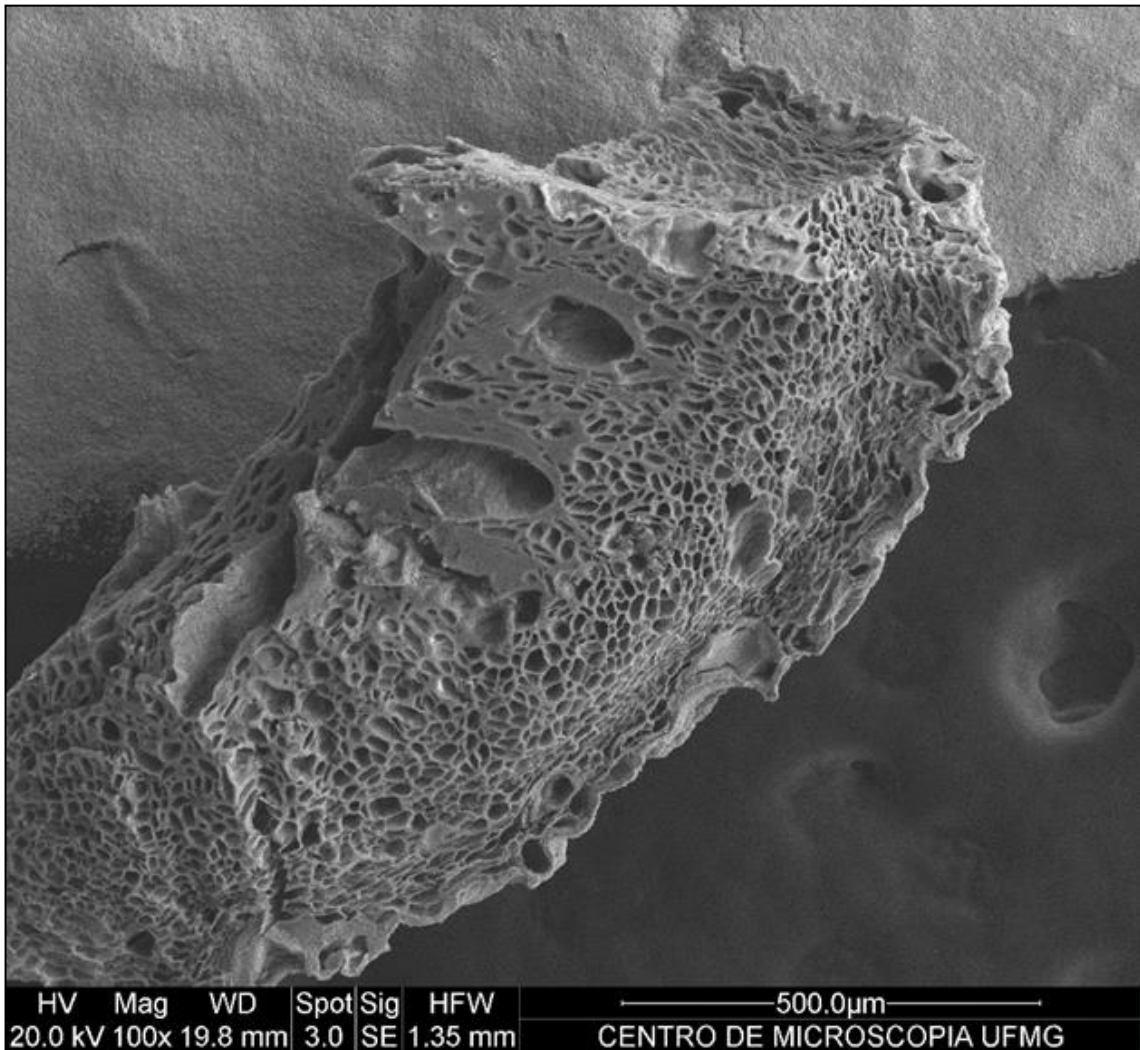
O corte de microscopia eletrônica do coração descelularizado é representado nas Figuras A-8 e A-9. Percebe-se que as células que se encontravam aderidas a matriz não estão mais presentes, constatando a presença do arcabouço da matriz extracelular e de vasos sanguíneos. Por meio da figura podemos verificar 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.



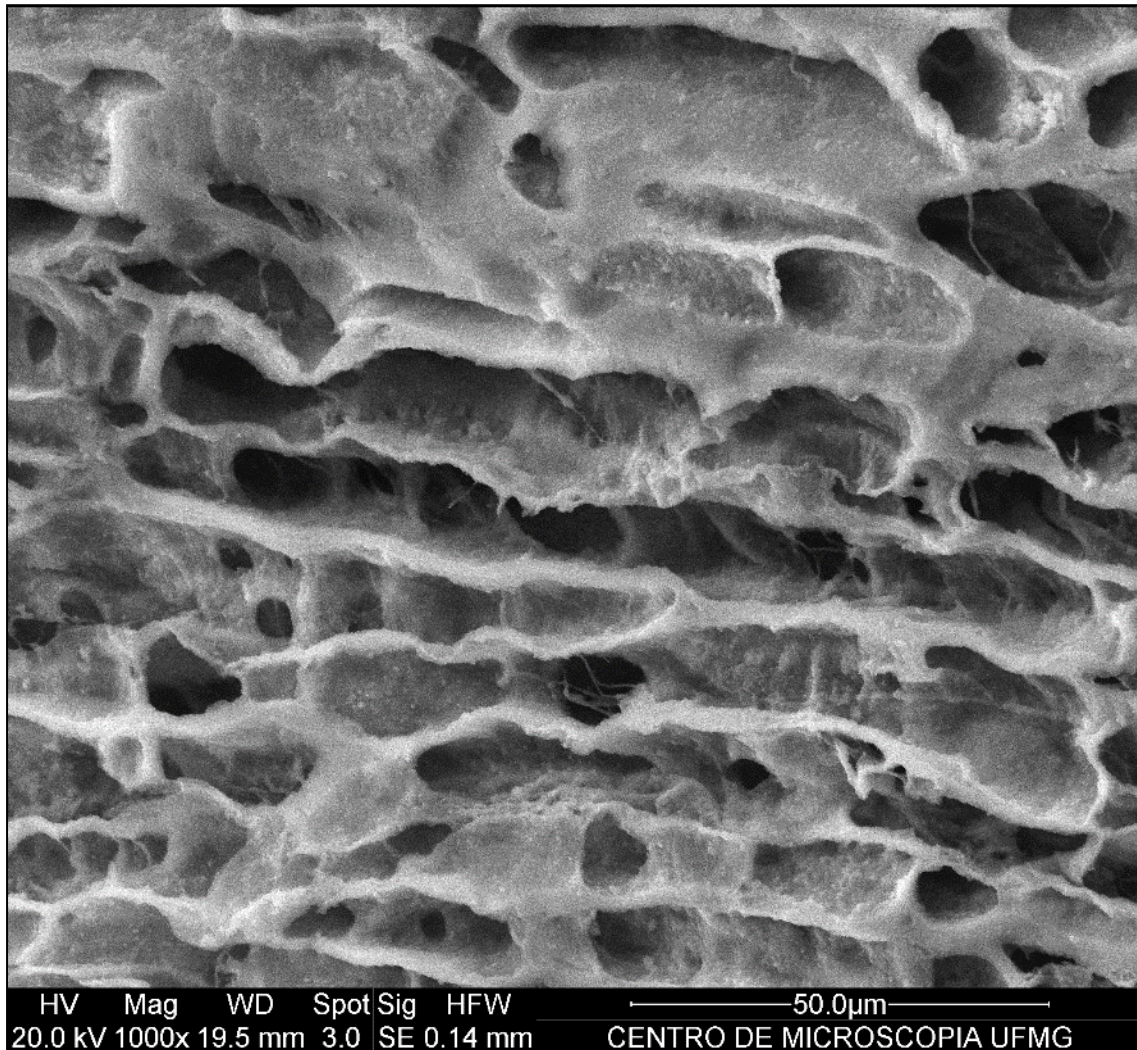
**Figura A-6 - Microscopia Eletrônica do coração celularizado – 100X** As células cardíacas estão localizadas de forma paralela formando feixes longitudinais que se estendem por todo o corte do tecido. Também é possível visualizar a profundidade do tecido, constituída por células e fibras de colágeno.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



**Figura A-7 - 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 A-8 - 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.



**Figura A-9 - 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.

