

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA DO TECIDO CARDÍACO
DE CAMUNDONGOS FÊMEAS JOVENS, IDOSAS E IDOSAS
TRATADAS COM ESTRADIOL

ANA CAROLINA LARA RIBEIRO

BELO HORIZONTE
2019

ANA CAROLINA LARA RIBEIRO

ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA DO TECIDO CARDÍACO DE
CAMUNDONGOS FÊMEAS JOVENS, IDOSAS E IDOSAS TRATADAS COM
ESTRADIOL

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaela Fernandes da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga

BELO HORIZONTE
2019

043

Ribeiro, Ana Carolina Lara.

Análise comparativa do proteoma do tecido cardíaco de camundongos fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com estradiol [manuscrito] / Ana Carolina Lara Ribeiro. – 2019.

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

Orientadora: Rafaela Fernandes da Silva. Co-orientador: Thiago Verano Braga.

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

1. Envelhecimento. 2. Doenças Cardiovasculares. 3. Proteoma. 4. Estrogênios. 5. Terapia de reposição hormonal. I. Silva, Rafaela Fernandes da. II. Braga, Thiago Verano. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 515 DE ANA CAROLINA LARA RIBEIRO

**" Análise Comparativa do Proteoma do Tecido Cardíaco de Camundongos Fêmeas Jovens,
Idosas e Idosas Tratadas com Estradiol "**

ANA CAROLINA LARA RIBEIRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **03 de setembro de 2019**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Rafaela Fernandes da Silva - Orientadora

Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos

Prof. Dr. Thiago Verano Braga - Coorientador

Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/03/2022, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1303552** e o código CRC **C6655490**.

Dedicatória

Á minha mãe **Maria das Graças** e
ao meu irmão **Alexandre**.

Agradecimentos

A **Deus**, pela capacidade concedida.

Á minha **família**. Base de tudo. Meus pais, **Rubens** e **Maria das Graças**, meus irmãos **Alexandre** e **Gabriela**, minha cunhada **Marina** e minha pequena **Jolie**. Agradeço também, em especial aos meus “dindinhos” **José Eustáquio** e **Edwiges** (*in memoriam*), por sempre torcerem pelo meu sucesso e pela presença constante em minha vida.

Á minha orientadora, **Rafaela Fernandes**. Agradeço imensamente pela oportunidade, confiança em minha capacidade e sua grande contribuição em minha formação pessoal e profissional. Agradeço ainda por todo incentivo, paciência e apoio e amizade, mesmo com a distância Registro o meu respeito e admiração pela pessoa e profissional que é.

Ao meu co-orientador, **Thiago Verano**. Agradeço pela acolhida em seu grupo de trabalho, pelas discussões produtivas, por estar sempre presente, por toda ajuda, apoio e amizade. Com certeza cresci e aprendi muito com você.

Á prof. **Maria Aparecida Ribeiro**. Gratidão por me receber com tanto carinho em seu laboratório, pela amizade, presteza, conhecimentos partilhados, apoio e torcida. Obrigado pelo cuidado de mãe que sempre teve para comigo.

Á **Gleisy Gonçalves**, peça fundamental durante o mestrado. Agradeço pela confiança, pela paciência e por tudo que me ensinou.

Aos amigos do **Laboratório de Fisiologia Renal “Prof. Fernando Alzamora”**: **Ildernandes Vieira**, que se tornou um grande amigo. **Fernando Pedro**, meu primeiro contato na pós-graduação, me ajudou desde o primeiro momento, e com certeza trouxe mais alegria para os meus dias. **Miriane Fernandes**, pela amizade que desenvolvemos, apoio e momentos de descontração compartilhados. **Mário Moraes**, por todas as conversas e pelo carinho. **Bruno Sanches**, pela ajuda nos experimentos, pela presteza e amizade.

As amigas: **Carol Borges**, nos conhecemos quando a pós-graduação ainda era só um sonho. Hoje estamos realizando muito mais do que sonhamos, juntas. Obrigada pela amizade de sempre e pelo carinho. **Roberta Cristelli**, uma grata surpresa da pós-graduação, obrigada pelo apoio e carinho. **Mérian**, pela amizade, cuidado e pelos bons momentos compartilhados. Á **Sabrina**, que tornou mais leves os últimos meses que antecederam a defesa desta dissertação. Á **Isabel** e **Aline**, pelos laços que criamos desde a graduação e que se fortaleceram mesmo com a distância.

Ao **NPF, Núcleo de Proteômica Funcional**, por me acolherem com tanto carinho no grupo, pela amizade, pelos momentos de descontração compartilhados e por toda contribuição ao meu trabalho. Agradeço em especial ao **Lucas Rodrigues**, pela ajuda com os experimentos de proteômica e também nas análises feitas.

Aos amigos do **Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo (Endolab)**, pela amizade, por cederem o espaço para que eu pudesse realizar meus experimentos e por toda ajuda dispensada a mim. Agradeço em especial aos profs. **Adelina Reis**, **Raphael Escorsim** e a técnica **Simone Pio**.

Aos amigos do **Laboratório de Hipertensão**, por toda estrutura e suporte para realizar meus experimentos. Pelas amizades feitas, ajuda e momentos de descontração compartilhados. Agradeço, mais uma vez, ao prof. **Thiago Verano** e também ao prof. **Robson Santos**.

Aos **funcionários** e **professores** dos departamentos de Fisiologia e Farmacologia, os quais contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

As instituições de fomento: **CAPES** e **CNPq**, os quais concederam auxílio financeiro para a realização deste projeto.

*“Se pude enxergar mais longe, é porque
me apoiei nos ombros de gigantes”
Isaac Newton*

Resumo

Introdução: O envelhecimento é um processo fisiológico e multifatorial, caracterizado pela perda progressiva da integridade anatômica e funcional, que leva a um risco aumentado das doenças cardiovasculares (DCVs). É possível inferir que o envelhecimento cardíaco afeta vias fisiopatológicas do desenvolvimento de DCVs em ambos os sexos, devido a um remodelamento estrutural e funcional do coração. Nesse sentido, destacam-se as mulheres no período da pós menopausa, que apresentam um risco cardíaco maior, devido a redução do nível de hormônios estrogênicos, os quais estão associados à cardioproteção. Os mecanismos moleculares e proteínas envolvidas no processo de envelhecimento do tecido cardíaco e tratamento hormonal com estrógenos (E2) ainda não estão bem definidos. **Objetivo:** Através da técnica de proteômica, identificar e avaliar as alterações na expressão de proteínas do tecido cardíaco de camundongos fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com estradiol. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos fêmeas selvagens da linhagem C57BL/6J, com idade entre 10 e 12 semanas para o grupo de jovens, idade entre 22 e 24 meses para os grupos de idosas e para fêmeas idosas tratadas com estradiol (E2) (7 dias de tratamento com E2 por via subcutânea). Após tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram o ápice e base do coração coletados para análises posteriores. **Resultados:** No tecido cardíaco de fêmeas idosas observou-se um aumento no diâmetro dos cardiomiócitos, do espaço extracelular e na expressão proteica do AT1r. quando comparadas com jovem. A análise proteômica da senescência evidenciou proteínas positivamente relacionadas a contração de fibras musculares, como Myh7 e Myl6, as quais sugerem um aumento da força de contração do músculo cardíaco em fêmeas idosas. Outro ponto observado foi o envolvimento de genes relacionados a homeostase celular, a qual se mostrou prejudicada no envelhecimento. Ao analisar o tratamento com E2 pela ótica da proteômica, evidenciou-se 7 genes, *upregulated*, relacionados a funções de respiração aeróbica, processo de oxirredução e síntese de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de elétrons, sugerindo uma melhora geral do metabolismo celular após tratamento com E2. De forma interessante, a proteína S100a10 esteve presente como a maior regulação positiva no envelhecimento, ao comparar os animais jovens e idosos e ao mesmo tempo também apresentou a maior regulação negativa após o tratamento com E2, na comparação entre idosas e idosas tratadas com estradiol. Por fim, através de análises de Western blot, observou-se uma redução da expressão de enzimas pró-oxidantes, como Gp91 e SOD2 em fêmeas tratadas com E2. **Conclusões:** A proteômica demonstrou ser uma técnica eficiente para criar um link entre a variação da expressão de proteínas e genes, e doenças cardiovasculares. Os resultados reforçaram o desequilíbrio celular na senescência, apresentando uma desregulação da homeostase química celular e um maior recrutamento de proteínas relacionadas à contração do músculo liso. O tratamento agudo com E2 levou a uma redução da produção de ROS mitocondrial e uma relação com a melhora do metabolismo celular geral, além de uma produção de ATP mais abundante e uma respiração celular mais eficiente. Adicionalmente, o tratamento com E2 na senescência demonstrou efeitos anti-hipertróficos. Estudos adicionais serão necessários para elucidar o papel da S100a10 e outras proteínas identificadas no presente estudo, no envelhecimento natural e sua modulação pelo E2. Este trabalho fornece uma base para o

desenvolvimento de novos estudos acerca do tratamento hormonal estrogênico e sua correlação com DCVs.

Palavras-chave: envelhecimento, proteoma cardíaco, estrógeno, reposição hormonal, doenças cardiovasculares.

Abstract

Introduction: Aging is a physiological and multifactorial process characterized by the progressive loss of anatomical and functional integrity, which leads to an increased risk of cardiovascular diseases (CVDs). It can be inferred that cardiac aging affects pathophysiological pathways of CVD development in both sexes due to structural and functional remodeling of the heart. In this sense, postmenopausal women stand out, who present a higher cardiac risk due to the reduction in the levels of estrogen hormones, which are associated with cardioprotection. The molecular mechanisms and proteins involved in the cardiac tissue during natural aging of females mice and the effects of estrogen (E2) are not yet well defined. **Objective:** To evaluate the proteomic changes in cardiac tissue in young, elderly and elderly female mice treated with E2. **Methodology:** Wild female C57BL / 6J mice aged 10 to 12 weeks were used for the young group, aged 22 to 24 months for the elderly and estradiol (E2)-treated elderly females (7 days of treatment with E2 subcutaneously). After treatment, the animals were euthanized and had the apex and base of the heart collected for further analysis. **Results:** In cardiac tissue of older females, there was an increase in cardiomyocyte diameter, extracellular space and AT1r protein expression when compared to young group. Proteomic analysis of senescence showed proteins positively related to muscle fiber contraction, such as Myh7 and Myl6, which suggest an increase in cardiac muscle contraction force in older females. Another point observed was the involvement of genes related to cellular homeostasis, which was impaired in aging. Analyzing the E2 treatment from the proteomic perspective, it was found 7 upregulated genes related to aerobic respiration functions, oxirreduction process and synthesis of mitochondrial ATP coupled with electron transport, suggesting a general improvement of cellular metabolism after treatment with E2. Interestingly, the protein S100a10 was present as the highest up-regulated by senescence when comparing young and old animals, and at the same time also had the highest down-regulation after E2 treatment when comparing elderly group to elderly treated with E2. Finally, Western blot analysis showed a reduction in the expression of pro-oxidant enzymes such as Gp91 and SOD2 in females treated with E2. **Conclusions:** Proteomics has been shown to be an efficient technique for linking protein and gene expression variations with CVDs. The results reinforced cellular imbalance in senescence, presenting a deregulation of cellular chemical homeostasis and a higher recruitment of proteins related to smooth muscle contraction. Acute treatment with E2 led to a reduction in mitochondrial ROS production and a relationship to improved overall cell metabolism, more abundant ATP production and more efficient cellular respiration. Additionally, treatment with E2 in senescence demonstrated antihypertrophic effects. Additional studies are needed to elucidate the role of S100a10 and other proteins identified in this study in natural aging and its modulation by E2. This paper provides a basis for the development of new studies on estrogen hormone treatment and its correlation with CVDs.

Keywords: aging, cardiac proteome, estrogen, hormone replacement, cardiovascular disease.

Lista de figuras

Figura 1: Características fisiológicas dos animais e efeitos da terapia estrogênica.

Figura 2: Avaliação de parâmetros da hipertrofia cardíaca por meio de HE.

Figura 3: Avaliação da hipertrofia cardíaca por meio da expressão do receptor AT1.

Figura 4: Relações entre genes apontadas pela ontologia gênica na comparação entre fêmeas idosas e jovens.

Figura 5: Relações entre genes apontadas pela ontologia gênica na comparação entre fêmeas idosas tratadas e não tratadas.

Figura 6: Expressão de enzimas anti e pró-oxidantes no tecido cardíaco de fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com E2.

Figura 7: Avaliação de ROS por fluorescência total derivada da oxidação da DHE.

Lista de tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais.

Tabela 2: Mapa de calor demonstrativo da razão idosas vs jovens em escala logarítmica.

Tabela 3: Mapa de calor demonstrativo da razão idosas+E2 vs idosas em escala logarítmica.

Tabela 4: Mapa de calor demonstrativo da razão idosas+E2 vs jovens em escala logarítmica.

Tabela 5: Descrição de cada um dos genes na senescência destacados nas relações estabelecidas por GO.

Tabela 6: Descrição de cada um dos genes no tratamento estrogênico destacados nas relações estabelecidas por GO.

Lista de abreviações

Ang II : Angiotensina II

AKT: Proteína quinase B

ALDH2: Aldeído desidrogenase 2

ANOVA: Análise de variância

AT1: Receptor de angiotensina do tipo 1

AT2: Receptor de angiotensina do tipo 2

ATP: Adenosina trifosfato

Bsa: Albumina de soro bovino

Capi: Centro de aquisição e processamento de imagens do ICB/UFMG

Cebio: Centro de bioterismo do ICB/UFMG

Ceua: Comitê de ética com o uso de animais

DCV: Doença cardiovascular

Dhe: Diidroetidina

DNA: Ácido desoxirribonucléico

E2: 17- β estradiol

Elisa: Ensaio de imunoabsorção enzimática

EHR: Elemento de resposta hormonal

Epm: Erro padrão da média

ER: Receptor de estrógeno

ERK: Quinase regulada por sinal extracelular

ER α : Receptor de estrógeno tipo α

ER β : Receptor de estrógeno tipo β

ESI: Fonte de ionização por Eletrospray

GO: Ontologia gênica

G-1: Agonista seletivo GPER

Gp91: Subunidade de ligação heme da NADPH oxidase geradora de superóxido.

GPER1: Receptor de estrógeno acoplado à proteína G tipo 1

HCl: Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina e Eosina

hFABP: Proteína de ligação a ácidos graxos do tipo coração

ID: Identificação

α -KGDH: α -cetoglutarato desidrogenase

LC-MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas

MMP-2: Metaloproteinase 2

MAP quinase (MAPK): Proteína quinase ativada por mitógeno

NaCl: Cloreto de sódio

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina **PFA:** Paraformaldeído

Pi3k: Fosfoinositídeo 3-quinase

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RNAm: RNA mensageiro

ROS: Espécie reativa de oxigênio

RPM: Rotações por minuto

S100: Proteína de ligação ao cálcio

SDS Page: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SOD2: Superóxido dismutase 2

TBS-T: Solução salina tamponada com tris

TCEP: (tris(2-carboxiethyl)fosfina)

TEAB: Brometo de tetraetilamônio

Temed: Tetrametiletilenodiamina

TFA: Ácido trifluoracético

TOF: Time of Flight, ou “tempo de vôo”. Basicamente, é um sensor que consegue determinar a distância entre objetos a partir da emissão de luz.

Tris: (hidroximetil)aminometano

Sumário

1. Introdução	15
1.1. Remodelamento cardíaco no envelhecimento.....	15
1.2. Função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e o envelhecimento.....	16
1.3. Pós menopausa e as doenças cardiovasculares.....	18
1.4. Mecanismos cardioprotetores conferidos pelo E2.....	20
1.5. Ferramenta proteômica na pesquisa cardiovascular.....	22
2. Objetivo.....	24
2.2. Objetivo geral.....	24
2.1. Objetivos específicos.....	24
3. Metodologia.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Eutanásia e coleta do tecido cardíaco.....	26
3.3. Quantificação do hormônio 17 β -estradiol no plasma.....	26
3.4. Análises histomorfométricas.....	26
3.5. Imunofluorescência e coloração através da sonda Dihidroetidina.....	27
3.6. Western Blot.....	27
3.7. Preparação das amostras para proteômica.....	28
3.8. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS).....	29
3.9. Análise estatística.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Características dos grupos experimentais relacionadas ao	

envelhecimento fisiológico e ao tratamento agudo com E2.....	31
4.2 Avaliação de parâmetros relacionados à hipertrofia cardíaca.....	33
4.2.1 Avaliação da hipertrofia cardíaca por meio de histologia.....	34
4.2.2 Avaliação da hipertrofia cardíaca pela expressão proteica do receptor AT1.....	35
4.3 Análise proteômica do tecido cardíaco.....	36
4.3.1 Análise da senescência: fêmeas jovens versus fêmeas idosas.....	40
4.3.2 Análise do tratamento estrogênico: fêmeas idosas tratadas versus fêmeas idosas	42
4.4 Avaliação das espécies reativas de oxigênio (ROS).....	44
5. Discussão.....	48
6. Conclusões.....	54
7. Perspectivas.....	55
8. Referências bibliográficas.....	56

1. Introdução

1.1. Remodelamento cardíaco no envelhecimento

O envelhecimento pode ser definido como um distúrbio progressivo o qual diminui de forma significativa a aptidão de um indivíduo manter sua capacidade funcional. Essa redução é relacionada a uma gama de doenças e também está fortemente associada a uma maior incidência de patologias cardiovasculares (Sheydina, Riordon, & Boheler, 2011). A idade é, portanto, considerada um fator de risco independente para morbimortalidade cardiovascular, além de gerar distúrbios que necessitam de assistência médica a longo prazo. A incidência de tais patologias é abrangente (Sheydina et al., 2011), sendo considerada a principal ameaça à saúde no mundo. Atualmente, com o aumento da longevidade e diminuição da fertilidade ocorre um rápido envelhecimento populacional (Steenman & Lande, 2017). O risco de se desenvolver doenças cardiovasculares (DCV), como já citado, aumenta dramaticamente em ambos os sexos (Merz & Cheng, 2016a, 2016b). Em especial, as mulheres em pós menopausa, apresentam um risco maior, uma vez que ocorre uma redução do nível de hormônios relacionados a cardioproteção. O remodelamento estrutural e funcional do coração na senescência explica em parte a maior propensão a essas doenças, o que motiva estudos no campo do envelhecimento cardíaco (Keller & Howlett, 2016)

Durante o envelhecimento, alterações na homeostase cardíaca podem ser observadas nos níveis celular, extracelular e tecidual (Sheydina et al., 2011). Macroscopicamente é observado um aumento da deposição de tecido adiposo epicárdico, bem como a calcificação de regiões específicas, como os folhetos da válvula aórtica. A estrutura morfológica cardíaca se modifica: ocorre um remodelamento atrial, onde o tamanho e o volume ficam aumentados. A espessura do ventrículo esquerdo aumenta, em contrapartida, os volumes sistólicos e diastólicos diminuem. Também ocorre um remodelamento idade-dependente no nível microscópico, como a redução acentuada do número de células marca-passo no nodo sinoatrial, ocorrendo o mesmo declínio com os

miócitos ventriculares (Keller & Howlett, 2016). Essa perda de células pode, teoricamente, promover uma hipertrofia dos miócitos sobreviventes, uma vez que estão sobrecarregados. Por outro lado, há um aumento de fibroblastos, os quais produzem colágeno e matriz extracelular. A consequência direta do aumento de colágeno é a fibrose intersticial de átrios, células marca-passo do nodo sinoatrial e ventrículos de idosos (Keller & Howlett, 2016). O sistema cardiovascular é alvo de estresse ambiental durante o envelhecimento, o que inclui o estresse ligado ao alto nível de glicose e lipídios no sangue ou mesmo pelo estresse oxidativo, proveniente da presença de lipoproteínas oxidativas (Kudryavtseva et al., 2016).

Deste modo, o coração e vasos desenvolvem um comprometimento funcional que pode levar a certas cardiopatias, como aterosclerose, isquemia e insuficiência cardíaca. É possível inferir que o envelhecimento cardíaco afeta as vias fisiopatológicas do desenvolvimento de DCV, fato que explicaria a relação entre envelhecimento e a maior predisposição a elas. Dessa forma, um melhor entendimento acerca do envelhecimento cardíaco pode ter implicações na prevenção das DCV em humanos (Steenman & Lande, 2017).

1.2 Função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e o envelhecimento

As mitocôndrias, importantes organelas celulares, possuem como função central a produção de ATP pela fosforilação oxidativa, que ocorre graças aos complexos I a IV da cadeia respiratória e pelo complexo V, da ATP sintase (Britic & Larsson, 2013).

A fosforilação oxidativa naturalmente produz o oxigênio reativo e instável, o qual pode formar espécies reativas de oxigênio (ROS), o que em excesso, é chamado de estresse oxidativo e contribui grandemente para o dano oxidativo e perda funcional de órgãos e tecidos com o passar dos anos, bem como com doenças tipicamente relacionadas a idade (Liguori et al., 2018; Scialò, Fernández-Ayala, & Sanz, 2017). As mitocôndrias de indivíduos idosos possuem maior teor de ROS em comparação com um indivíduo jovem, porém parte dessa produção é utilizada na sinalização celular, logo, uma baixa

produção de ROS é considerada benéfica, facilitando a sinalização celular e a adaptação em situações de estresse (Scialò et al., 2017). Considerando, portanto, que altas concentrações de ROS desencadeiam o estresse oxidativo, o DNA mitocondrial é um alvo dos radicais livres. A consequência direta é um DNA muito mais suscetível a sofrer mutações e danos oxidativos (Wei, 1998). As enzimas respiratórias que contêm as proteínas defeituosas codificadas por esse DNA mitocondrial mutado também terão sua função modificada na cadeia respiratória, levando a um maior vazamento de elétrons durante o metabolismo mitocondrial. Esse vazamento de elétrons é utilizado na formação de mais ROS e, conseqüentemente, um aumento do estresse oxidativo, danificando a mitocôndria e outras células. Este fato gera um ciclo vicioso, e considerando o passar dos anos, ocorre um acúmulo desses danos mitocondriais os quais podem contribuir para o desenvolvimento de diversas DCV (Paravicini & Touyz, 2008; Wei, Lu, Lee, Pang, & Ma, 1998).

Estudos demonstram que a função mitocondrial declina com a idade: a capacidade da cadeia respiratória regride no músculo cardíaco (Short et al., 2005) ao passo que o dano oxidativo na função mitocondrial acumulado também desencadeia uma resposta nuclear adaptativa, ou seja, altera sua expressão gênica (Kudryavtseva et al., 2016). Existem também outros estímulos que também alteram a função mitocondrial, entre eles, o declínio na função hormonal ovariana em mulheres, considerando a chegada da menopausa. Isto é explicado considerando que alguns hormônios, como o estradiol (E2), possuem um papel na regulação da biogênese mitocondrial, interferindo então na sua manutenção (Bratic & Larsson, 2013).

O estrogênio possui uma função protetora no organismo, e na pós-menopausa, este efeito é perdido e predispõe a mulher a diversas doenças, inclusive cardiovasculares. Estudos demonstram que as ROS também contribuem de outras formas para o desenvolvimento de tais patologias: a ação dos estrogênios se dá por meio da expressão de enzimas antioxidantes (Cervellati & Bergamini Carlo, 2016). Ou seja, no período da transição da peri para a pós-menopausa, a mulher experimenta uma menor defesa antioxidante contra o ataque de radicais livres, estando portanto, mais exposta a danos.

1.3 Pós-menopausa, reposição hormonal com E2 e as doenças cardiovasculares

Após a transição para a pós-menopausa, as mulheres apresentam uma maior tendência a desenvolver doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes e DCV (Cervellati & Bergamini Carlo, 2016). As DCV são as principais causas de morte no Brasil e no mundo, e atingem ambos os sexos. Comparativamente, em idade reprodutiva, mulheres possuem menor incidência de DCV que os homens, e este panorama se inverte após a menopausa. Sendo assim, a idade é o principal fator de risco não modificável para DCV em mulheres e comprova o papel protetor do E2 no sistema cardiovascular (Pérez-Cremades et al, 2018).

Modelos animais podem ser poderosas ferramentas com possibilidade de representar o organismo humano. Para o estudo da função ovariana, camundongos fêmeas constituem um bom modelo, uma vez que seu ciclo reprodutivo é curto, durando de 4 a 5 dias (Marcondes et al, 2002). Em modelos murinos, tem-se quatro fases durante o período reprodutivo: proestro, estro, metaestro e diestro. Geralmente, a prolactina, LH e FSH aumentam durante a fase do proestro, enquanto o estradiol inicia seu aumento gradual no metaestro, chegando a níveis máximos no proestro. A progesterona também inicia seu aumento no metaestro e atinge seu segundo pico ao final do proestro (Marcondes et al, 2002).

A função ovariana feminina inicia seu declínio aproximadamente aos 37 anos, sendo que o envelhecimento provoca o empobrecimento de folículos e diminuição da qualidade dos oócitos. Transportando esse pensamento para o modelo murino, estudos apontam que o declínio ovariano começa a ocorrer a partir de 28 semanas de vida (Qin, 2019).

O ciclo estral ocorre até os 12 meses de idade, quando os animais experimentam o fim de seu período reprodutivo. Após esse período, ocorre uma deficiência estrogênica importante. Ainda em idade reprodutiva, a dosagem de estradiol plasmática gira em torno de 5-35 pg/mL para camundongos em situações normais. Quando os animais entram na deficiência

estrogênica, estes níveis caem para 2-25 pg/mL aproximadamente (Strom, 2012).

A prescrição da reposição hormonal para mulheres na pós-menopausa é motivada por acreditar-se que o tratamento atua na profilaxia de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes, acidente vascular encefálico, entre outros, os quais apresentam maior tendência a ocorrer nessa época da vida da mulher. Porém, as evidências que demonstram um benefício real sobre esta terapia ainda permanecem inconclusivas. Estudos em humanos pontuam como benefícios do tratamento somente com E2 uma redução significativa de riscos para o desenvolvimento de diabetes (Gartlehner et al., 2017), uma melhora na função vascular, colesterol, metabolismo de carboidratos, o que resulta na diminuição geral de eventos coronarianos, miocárdicos e infartos (Paszkowski et al., 2019). A melhora dos parâmetros citados foi observada em pacientes sintomáticas, com até 60 anos de idade e que utilizaram a terapia hormonal em até 10 anos a partir da última menstruação (Paszkowski et al., 2019; Sood, Faubion, Kuhle, Thielen, & Shuster, 2014). Adicionalmente, a escolha da terapia hormonal feita somente com E2 demonstra benefício em comparação com a terapia combinada de progestágeno e estrógeno (Sood et al., 2014). Por outro lado, a decisão de prescrever ou não a terapia de reposição hormonal deve ser individualizada para cada paciente, balanceando os riscos e benefícios. Pesquisas contrárias a reposição hormonal apontam que o tratamento tardio (posterior a 60 anos de idade e mais de 10 anos a partir da última menstruação) não auxilia na prevenção de DCV, bem como aumentam as chances de ocorrer tais doenças, principalmente no início da reposição hormonal (Paszkowski et al., 2019). Dado a escassez de estudos envolvendo o tratamento tardio, é fundamental que existam mais pesquisas acerca do assunto para detalhar os riscos e benefícios de forma que traga mais segurança para candidatas ao uso da terapia de reposição hormonal.

1.4 Mecanismos cardioprotetores conferidos pelo E2

O estrógeno, um potente hormônio esteróide, possui efeitos nucleares e não nucleares. As ações cardiovasculares do E2 são geralmente associadas aos seus receptores de estrógeno associados à membrana (ERs) do tipo alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$), os quais estão expressos no miocárdio (Arnal et al., 2012).

Após a ativação dos ERs, três vias podem ser iniciadas: a via clássica, via genômica ou a via independente de elementos de resposta hormonal no DNA (ERH). A via clássica ocorre quando o E2 se liga aos receptores nucleares $ER\alpha$ e $ER\beta$, os quais se dimerizam e se ligam a regiões responsivas do E2, alterando a expressão gênica. A via independente de ERH, o complexo formado pelo E2 e seus receptores altera a transcrição de genes por meio da interação com elementos de resposta alternativos, a qual é independente das regiões responsivas ao estrógeno. Por fim, a via não genômica ocorre quando o E2 ativa sítios de ligação associados a membrana, desencadeando uma rápida sinalização tecidual (Hall; Couse; Korach, 2001; Nilsson et al., 2001).

A ação rápida, ou não nuclear, do E2 tem seus efeitos mediados pela sinalização através de Pi3K, Akt e ERK, além de ser descrita por exercer uma ação protetora, uma vez que evita a lesão celular. Por outro lado, a resposta nuclear é lenta uma vez que o complexo E2 juntamente com seus ERs devem se mover para o núcleo da célula e atuar como fatores transcricionais, o que possibilita a ativação ou repressão da expressão gênica, culminando na alteração do balanço da expressão de proteínas (Knowlton, 2012).

Trabalhos identificaram um terceiro receptor de estrogênio acoplado à proteína G, denominado de GPER1 (Despermps & Murphy, 2009). Este receptor também demonstrou ser ativado pelo E2, onde a fosforilação da Akt tem sido relacionada aos efeitos cardioprotetores mediados pelo mesmo (Nilsson et al, 2001).

Indiscutivelmente, o envelhecimento é acompanhado da diminuição dos níveis de E2. No sistema cardiovascular o envelhecimento causa uma disfunção, onde ocorrem aumento da rigidez e fibrose, além do aumento de

ROS. A depleção de E2 influi neste quadro, uma vez que exerce efeitos antioxidantes pela regulação indireta da expressão de genes de antioxidantes e diminui a produção de superóxidos (Knowlton, 2012).

O receptor β é relacionado às atividades anti-hipertroóficas do E2 no coração. Em estudo, foi citada a inibição pelo E2 da hipertrofia mediada por Ang II, ao passo que camundongos *knockout* para o receptor β não apresentaram efeitos de reversão da hipertrofia (Pedram et al, 2008). A atenuação dos efeitos hipertroóficos pelo E2 parece estar relacionada à uma via que aumenta a degradação de calcineurina (Donaldson et al, 2009).

Estudos demonstram que o estrógeno afeta as mitocôndrias cardíacas diretamente. Os receptores α e β estão localizados nas mitocôndrias de vários tecidos e células, em machos e fêmeas. As ações do E2 nas mitocôndrias são predominantemente mediadas pelo receptor β , uma vez que a transcrição de proteínas mitocondriais, particularmente aquelas codificadas no DNA mitocondrial, é regulada por este receptor. É visto na literatura que o E2 causa um aumento na fosforilação e atividade da ALDH2 (aldeído desidrogenase 2) e da α -cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH), após lesão. Esses achados reforçam a ação do receptor β no metabolismo mitocondrial, uma vez que a ALDH2 metaboliza adutos tóxicos gerados pelas ROS, bem como o aumento da fosforilação de α -KGDH reduz a produção de ROS (Lagranha, Deschamps, Aponte, Steenbergen, & Murphy, 2010).

Observa-se também um envolvimento dos receptores ER α e β como promotores de proteção contra a isquemia cardíaca em modelos de *knockout* e uso de agonistas seletivos (Wang et al., 2006 ; Wang et al., 2009 ; Deschamps e cols., 2010 ; Zhai et al, 2000 ; Booth et al, 2003). Curiosamente, o receptor GPER também se mostrou envolvido com a proteção em modelos de isquemia-reperfusão. É descrito que uma ativação de GPER com um agonista seletivo (G-1) reduziu o tamanho do infarto cardíaco e melhorou sua recuperação funcional (Simoncini et al., 2000a).

Por fim, estudos demonstram a inibição da MMP2 e redução da fibrose pelo E2. Em fibroblastos cardíacos, o E2 inibiu a expressão de MMP-2, apresentando um efeito não genômico, o qual era mediado pela sinalização via ER α , pela MAP quinase e ERK, reprimindo a transcrição de MMP-2 (Mahmoodzadeh et al , 2010).

1.5 Ferramenta proteômica na pesquisa cardiovascular

O papel dinâmico das moléculas é documentado desde os primórdios da pesquisa biológica. Em 1838, Berzelius, empregou o termo “proteína”, derivada do grego *proteios*, que significa “o primeiro posto” (Cristea, 2004). Mais tarde, o termo “proteômica” foi utilizado pela primeira vez em 1996, por Marc Wilkins para se referir ao “conteúdo protéico de um genoma” (Wilkins, 1996). De fato, a maior parte da informação funcional dos genes é caracterizada pelo proteoma, que por sofrer constantes modificações pós-traducionais, se torna complexo. Sua análise é desafiadora, uma vez que o proteoma descreve uma diversidade de funções, exhibe diferenças quantitativas e de tamanho molecular, além de apresentar diferenças de hidrofobicidade. De forma interessante, o proteoma é dinâmico e sofre flutuações em diferentes tempos, células e em resposta a diferentes estímulos externos (Pandey, 2000).

A análise proteômica se tornou uma das técnicas mais importantes na compreensão da funcionalidade de genes, uma vez que as proteínas são efetoras de funções biológicas, cujos níveis não apenas dependem dos níveis correspondentes do RNAm, mas também do controle e regulação da tradução das mesmas (Lander, 2001). A proteômica destaca-se, uma vez que é mais complexa que a genômica, e, adicionalmente, a análise do transcriptoma por microarranjos não é eficiente em medir o aumento da síntese de RNAm (Canales, 2006). Desta forma, a proteômica é considerada um conjunto de dados relevante para a caracterização de sistemas biológicos (Cox, 2007).

A utilização da proteômica é de grande importância e utilidade na condução da ciência básica. A partir desta ferramenta é possível realizar uma tradução de dados de pesquisas clínicas e contribuir no diagnóstico e terapias de diversas condições biológicas, na saúde e na doença. Há aproximadamente 25 anos atrás, quando o termo proteômica foi empregado pela primeira vez, descreveu uma análise em larga escala de proteínas em tecidos ou amostras sanguíneas, algo bem útil na pesquisa cardiovascular (Lindsey et al., 2015). Quando essas novas tecnologias moleculares com alta produtividade surgiram, houve uma mudança na abordagem científica utilizada até então. A ciência reducionista, que analisava moléculas únicas agora poderia integrar vários

dados, em sistemas mais complexos. Nesse momento, novas possibilidades se abriram para a pesquisa cardiovascular, uma vez que as doenças estudadas nesse campo do conhecimento são complexas e envolvem fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Arab et al., 2006; Ouzounian et al., 2007).

A proteômica é uma técnica onde a amostra é preparada segundo um protocolo específico, onde as proteínas são extraídas de células ou tecidos e reduzidas a peptídeos ou, dependendo do objetivo, também podem ser utilizadas intactas. A amostra, após ser preparada, é analisada no espectrômetro de massa acoplado à cromatografia líquida (LC-MS). O espectrômetro de massa é composto por uma fonte de ionização, que geralmente é do tipo eletrospray (ESI), um analisador de massa, que pode ser do tipo armadilha de íons (“Orbitrap”, por exemplo), e um detector. A amostra que é eluída, na etapa de cromatografia, é ionizada, aplicando-se um campo elétrico, e analisada pelo por um analisador de massa, o qual separa os peptídeos (íons) de acordo com a relação massa-carga (m/z). A partir dos dados obtidos, utiliza-se ferramentas de bioinformática para inferir funções para as mesmas (Nayara Braga et al., 2016). A possibilidade de obter informações sobre todas as proteínas expressas pode nos dar informações valiosas e formar um mapa geral da condição das células, dos tecidos, dos órgãos e, assim, estimar a condição de um organismo inteiro. Adicionalmente, a proteômica também nos fornecer informações sobre as modificações pós-traducionais e a regulação de enzimas e outras proteínas (Lindsey et al., 2015).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações proteômicas do tecido cardíaco de camundongos fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com estradiol.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar nos grupos experimentais as características relacionadas ao envelhecimento fisiológico e ao tratamento agudo com E2.

2.2.2 Avaliar o efeito do envelhecimento e do tratamento agudo com E2 na hipertrofia cardíaca, através da análise morfométrica do tecido cardíaco e expressão do receptor AT1.

2.2.3 Comparar o padrão de expressão de proteínas cardíacas entre os grupos fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com E2, através de proteômica.

2.2.4 Avaliar o efeito do envelhecimento e do tratamento agudo com E2 na expressão de SOD, NADPH (Gp91) e produção de ROS no tecido cardíaco.

3. Metodologia

3.1 Animais

Neste estudo utilizou-se camundongos fêmeas selvagens da linhagem C57BL/6J. Os camundongos foram obtidos a partir Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO), e mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob condições de temperatura controlada (22°C), em ciclo claro/escuro de 12h, com ração (Labina) e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais do projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob protocolo 365 e 372/2017.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, discriminados na tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS
Fêmeas jovens	Camundongos fêmeas, entre 10-12 semanas de idade.
Fêmeas idosas	Camundongos fêmeas, entre 22-24 meses de idade, tratadas com o veículo (óleo de milho) de administração do hormônio, por via subcutânea, durante os últimos 7 dias de vida.
Fêmeas idosas tratadas com E2	Camundongos fêmeas, entre 22-24 meses de idade, tratadas com 1µg/dia de 17β-estradiol (diluído em óleo de milho), por via subcutânea, durante os últimos 7 dias de vida.

3.2 Eutanásia e coleta do tecido cardíaco

Realizou-se a eutanásia de todos os animais por meio de decapitação e coletou-se o sangue do tronco do animal em *eppendorfs* com auxílio de um funil. O sangue foi centrifugado por 20 minutos à 3000 rpm, sendo o sobrenadante coletado para futura dosagem plasmática de estradiol. O coração e útero dos animais foram retirados e pesados em seguida.

Os átrios do coração foram retirados e incluídos em Tissue Tek O.C.T. – *Optimal Cutting Temperature* (Sakura Finetek, CA, USA) e, posteriormente congelado à -80°C. Os ventrículos dos corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e acondicionados também a -80°C para experimentos de biologia molecular e proteômica.

3.3 Quantificação do hormônio 17 β -estradiol no plasma

Após coletado o plasma do animal, este foi acondicionado em *eppendorfs* na temperatura de -80°C. A dosagem de 17 β -estradiol foi realizada por técnica imuno-enzimática (ELISA), utilizando o kit ELISA DRG® Estradiol ELISA para dosagem de Estradiol (EIA2693, DRG Instruments) seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

3.4 Análises histomorfométricas

Para as análises histológicas, utilizou-se um criostato (Leica CM1950), com o qual foram feitos cortes transversais do átrio esquerdo com espessura de 8 μ m. Os cortes foram colocados sequencialmente em lâminas previamente gelatinizadas.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) seguindo protocolo padrão.

A obtenção de imagens foi realizada com uma câmera conectada a um microscópio de luz com objetiva de 40x (Zeiss Axio Cam). Para análise morfométrica, foram selecionadas entre 80-100 células, dentro das 20 imagens capturas por N. Tanto o diâmetro dos cardiomiócitos, quanto o espaço entre os

cardiomiócitos (área total da imagem - área total de tecido marcado pelo HE x 100, para expressar os dados em %) foram calculados com software ImageJ.

3.5 Coloração através da sonda dihidroetidina

A verificação de ROS ocorreu via oxidação da dihidroetidina (DHE). Para tanto, as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente antes de iniciar os procedimentos. Primeiramente, incubou-se as lâminas com tampão fosfato (PBS) por 10 minutos, a 37 °C em câmara úmida. Após lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com sonda fluorescente DHE a 10µM, diluída em tampão fosfato, por 30 minutos, também em câmara úmida, a 37 °C.

A obtenção de imagens foi realizada em um microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager com módulo Apotome) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB/UFMG. Para análise das imagens geradas, utilizou-se o software ImageJ.

3.6 Western Blot

Utilizou-se a técnica de Western Blot para determinar a expressão protéica do receptor AT1 (AT1r) e das proteínas SOD2 e Gp91. Primeiramente, o tecido cardíaco foi lisado e as proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford. O gel utilizado para a separação do extrato protéico foi preparado a partir de acrilamida, a 10%, e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e assim, proteínas foram separadas pelo seu peso molecular. Procedeu-se com o preparo das amostras utilizando tampão Laemmli e aquecidas em banho-maria a 95 °C a fim de desnaturar as proteínas até sua estrutura primária. As amostras e o padrão de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-rad Laboratories) foram aplicados em gel de concentração (1M Tris pH: 6,8; acrilamida 30%; SDS 10%; APS 10% e Temed) e correram em corrente elétrica constante por 1h 30 min, 120v em gel de separação (1,5M Tris pH: 8,8; acrilamida 30%; SDS 10%; APS 10% e Temed), no sistema montado

(PowerPac™ HC, BioRad CA, EUA). As placas contendo os géis foram imersos em tampão de corrida (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0.1 % de SDS).

Ao término da corrida eletroforética, iniciou-se a etapa da transferência: as proteínas foram transferidas do gel de acrilamida para uma membrana de PVDF, a qual foi posicionada entre duas espumas embebidas com solução de transferência (Tris 25mM, Glicina 190mM, Metanol 20%) em um sistema de semi-dry (Trans-Blot™ SD semi-dry transfer cell, Biorad CA, EUA), sob uma corrente contínua de 20v, durante 40 minutos.

Com as proteínas já transferidas para a membrana de PVDF, esta foi submetida a um bloqueio com BSA 5% (Sigma) diluído em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,6), durante 1h sob agitação, com a finalidade de evitar a ocorrência de ligações específicas.

As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas, overnight, a 4°C. com os anticorpos primários: receptor AT1 (1:1000, AAR-012, Alomone, Jerusalém, Israel), SOD2 (1:1000, sc137254, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx, USA), Gp91 (1:500, sc74514, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx, USA) e β -actina (1:1000, sc-376010, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx, USA).

Após o período de incubação com os anticorpos primários de interesse, novamente procedeu-se a com TBS-T, seguida de uma nova incubação com os anticorpos secundários, durante 1 hora sob agitação e temperatura ambiente.

Repetiu-se a etapa da lavagem com TBS-T e por fim, as membranas foram incubadas com reagente para imunodeteção por quimioluminescência (ECL plus – Amersham Biotechnology). A revelação das bandas se fez por análise densitométrica com auxílio do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 Series (GE Healthcare Life Sciences).

3.7 Preparação das amostras para proteômica

As amostras foram processadas essencialmente como publicado por Rodrigues-Ribeiro et al. Os ventrículos congelados foram macerados com o auxílio de um gral e pistilo. Por conseguinte, os macerados foram ressuspensos em tampão de lise (7M de uréia, 2M de tiuréia, 10mM TCEP, 40 mM cloroacetamida, 50mM de TEAB, inibidor de proteases) e as proteínas

foram reduzidas e alquiladas em temperatura ambiente por 2h. Posteriormente as amostras foram diluídas 10x com TEAB 50mM. A concentração de proteínas por amostra foi quantificada pelo método fluorimétrico Qubit (Thermo), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. Seguiu-se com a digestão, a qual ocorreu *overnight*, a 25°C, utilizando a tripsina na proporção de 1:50 (enzima/ proteínas). A reação enzimática foi interrompida com a adição de 0,5% (concentração final) de TFA e as amostras foram secas utilizando Speedvac. Para a dessalinização das amostras foi utilizado o ZipTip (*Eppendorf*) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A marcação das amostras ocorreu pela técnica de dimetilação (Boersema, 2009), utilizando isótopos com diferentes massas moleculares, para permitir a quantificação relativa dos peptídeos digeridos provenientes de tecidos cardíacos de camundongos fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com E2. Após a marcação, as amostras foram combinadas na mesma proporção 1:1:1.

3.8 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e análises de bioinformática

As amostras foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e nanofluxo (nano HPLC ou nHPLC), utilizando um sistema EASY-nLC (Thermo), acoplado a um espectrômetro de massa do tipo QExactive HF (Thermo).

Os peptídeos foram ressuspensos em solvente A (0,1% (v/v) de ácido fórmico) e separados no sistema nHPLC utilizando uma coluna analítica, de 20 cm de comprimento por 75 nm de largura, empacotada com uma resina de fase-reversa C-18 com partículas de 3 µm de diâmetro (Dr. Maisch GmbH). Foi utilizado um gradiente segmentado para separação dos peptídeos com um fluxo constante de 250 nL/min. O gradiente utilizado, expresso em porcentagem de solvente B (95 % (v/v) de acetonitrila e 0,1 % (v/v) de ácido fórmico), foi o seguinte: i) 1-3% em 3 min, ii) 3-25% em 80 min, iii) 25-45% em 10 min, e iv) 45-100% em 3 min. Os peptídeos eluídos da coluna eram ionizados na fonte do tipo nano-eletrospray (nESI), e analisados no analisador de massa do tipo Orbitrap, utilizando uma resolução de 120.000 FWHM em 200

m/z. Os 20 íons de peptídeos, também chamados íons parentais, mais intensos (Top 20) eram selecionados no quadrupolo e fragmentados por HCD (energia de colisão normalizada = 28%). Os fragmentos gerados eram analisados no Orbitrap utilizando uma resolução de 15.000 FWHM em 200 m/z. Os íons parentais já selecionados para fragmentação (MS/MS) eram incluídos em uma lista de exclusão dinâmica, por 30 segundos, para evitar que os mesmos fossem fragmentados novamente.

Os espectros gerados foram processados no programa Maxquant, versão 1.6.1.0, para a identificação e a quantificação das proteínas presentes nas amostras. Foram utilizados os seguintes parâmetros para as buscas, utilizando um arquivo fasta de proteínas de camundongos (*Mus musculus*) obtido do banco de dados Uniprot: i) tolerância para a massa molecular dos peptídeos igual a 4,5 partes por milhão (ppm), ii) até dois sítios de clivagem perdidas foram permitidos, iii) carbamidometilação da cisteína (modificação fixa), iv) oxidação de metionina e acetilação do N-terminal de proteínas (modificações variáveis). Apenas proteínas contendo, pelo menos, um peptídeo único com 99% de confiança ($FDR \leq 0,01$) foram consideradas.

Posteriormente, utilizou-se o programa DanteR para tratamento dos dados, visando identificar quais proteínas eram estatisticamente diferentes entre os tecidos cardíacos dos três grupos experimentais. Para tal, as intensidades das proteínas foram transformadas em escala logarítmica na base 2 (\log_2), normalizadas, baseado nas medianas, e construídas as razões (jovem vs. idosa, jovem vs. idosa tratada, e idosa vs. idosa tratada). As proteínas foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores das razões eram maiores do que 1,5 vezes o desvio padrão de cada condição.

3.9 Análise estatística

Para os demais experimentos (exceto os dados da proteômica), as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 e os dados estão representados como média \pm erro padrão médio (EPM). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para comparação entre os

grupos, e Teste de Tukey como pós-teste. Estabeleceu-se o nível de significância em $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Características dos grupos experimentais relacionadas ao envelhecimento fisiológico e ao tratamento agudo com E2

Objetivando analisar os efeitos da terapia estrogênica sobre os parâmetros ponderais, verificou-se o peso corporal dos animais e o peso do coração. Pode-se observar que houve um aumento significativo no ganho de peso pelas fêmeas idosas e idosas tratadas com estradiol, quando comparadas ao grupo controle representado por fêmeas jovens (Fig.1 A: jovens $0,139 \pm 0,018$ g; idosas $0,056 \pm 0,007$ g e idosas+E2 $0,205 \pm 0,011$ g). De forma semelhante, ocorreu o aumento do peso do coração dos animais destes grupos (Fig.1 B: jovens $74,70 \pm 0,96$ mg; idosas $120,80 \pm 4,35$ mg e idosas+E2 $126,42 \pm 2,68$ mg). Por outro lado, a razão peso do coração por peso corporal foi significativamente alterada apenas no grupo de idosas tratadas com E2 (Fig. 1 C: jovens $3,80 \pm 0,16$ mg/g; idosas $4,37 \pm 0,27$ mg/g e idosas+E2 $4,86 \pm 0,33$ mg/g).

Visando comprovar a eficiência do tratamento hormonal com estradiol, verificou-se o peso uterino e a dosagem plasmática de 17β -estradiol nos animais. Comprovou-se a deficiência estrogênica no grupo de fêmeas idosas ao passo que o tratamento hormonal foi capaz de reverter os níveis plasmáticos de estradiol (Fig.1 D: jovens $41,08 \pm 6,56$ pg/mL; idosas $12,57 \pm 2,22$ pg/mL e idosas+E2 $36,05 \pm 9,16$ pg/mL).

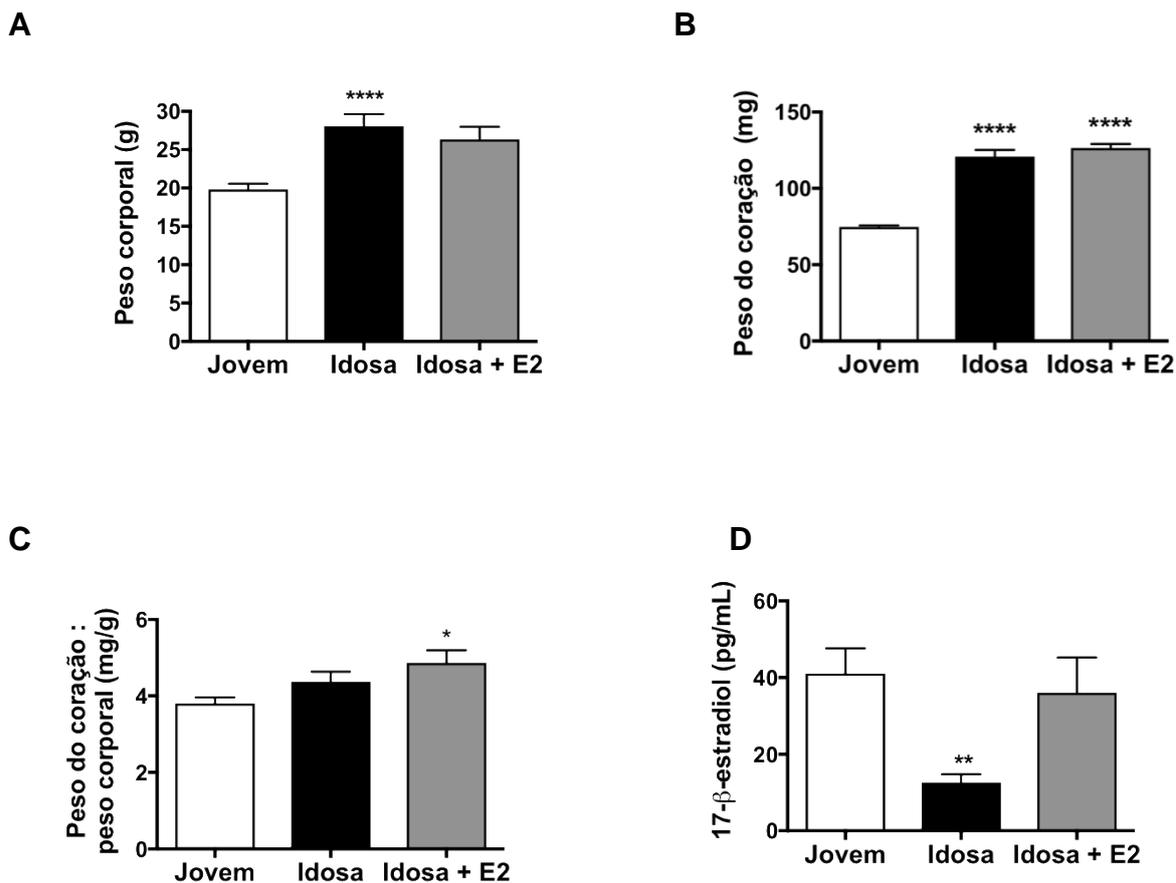


Figura 1: Características fisiológicas dos animais e efeitos da terapia estrogênica. A) Análise do peso corporal (g) dos grupos experimentais. B) Análise do peso do coração (mg) dos grupos experimentais. C) Razão entre o peso do coração pelo peso corporal dos animais (mg/g). D) Dosagem plasmática de E2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Jovem. $n = 4-6$.

4.2 Avaliação de parâmetros relacionados a hipertrofia cardíaca

Com a finalidade de caracterizar a hipertrofia cardíaca nos grupos experimentais, utilizou-se análise histológica do tecido cardíaco pela coloração HE, e a expressão protéica do AT1r por Western Blot.

4.2.1 Avaliação da hipertrofia cardíaca por meio de histologia

Pode-se observar, por meio da coloração HE, que houve um número equivalente do diâmetro dos cardiomiócitos em idosas e idosas+E2, os quais apresentaram aumento do diâmetro em relação ao controle, demonstrando uma hipertrofia idade dependente (Fig. 2 B: jovens $18,53 \pm 0,46 \mu\text{m}$; idosas $25,18 \pm 0,99 \mu\text{m}$ e idosas+E2 $24,25 \pm 1,20 \mu\text{m}$). Entretanto, ao analisar a espaço entre cardiomiócitos, apenas o grupo de idosas se apresentou diferente dos demais. Isso demonstra que o grupo que recebeu estrogênio não obteve alteração do espaço entre os cardiomiócitos, comparado ao controle (Fig 2 C: jovens $22,92 \pm 4,16 \%$; idosa $39,24 \pm 2,94 \%$ e idosa+E2 $30,92 \pm 1,2 \%$).

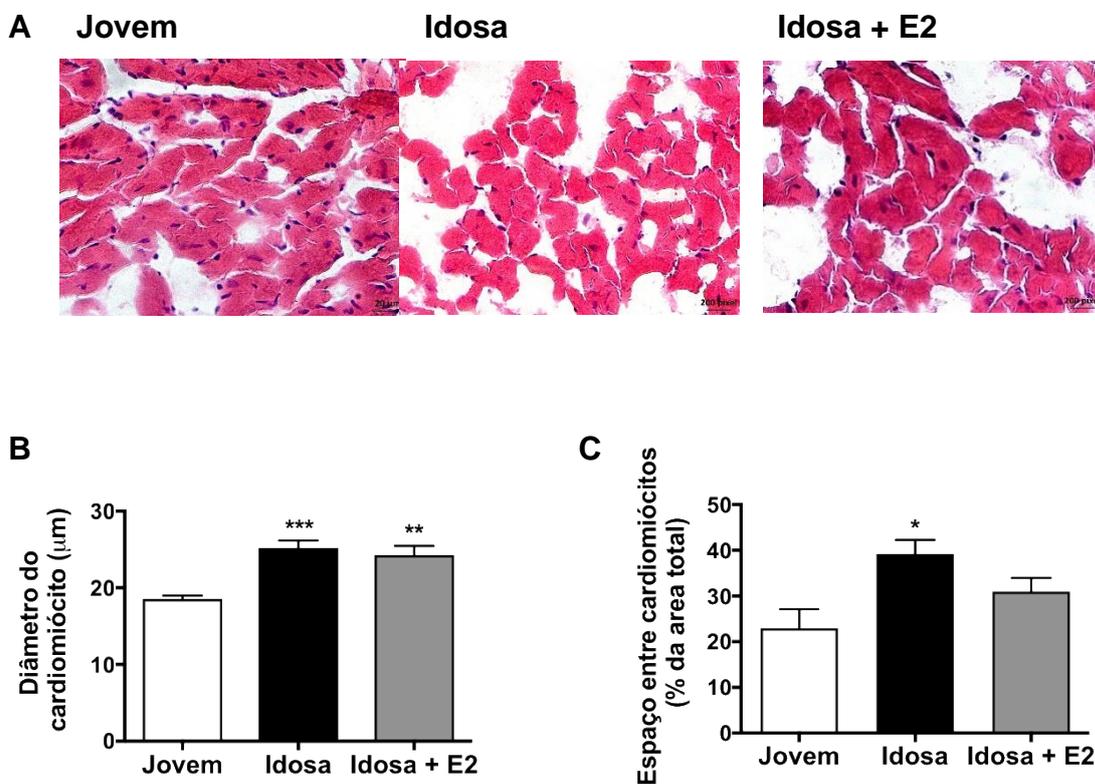


Figura 2: Avaliação de parâmetros da hipertrofia cardíaca por meio de HE.

A) Imagens demonstrativas da coloração HE no tecido cardíaco dos grupos experimentais. B) Análise do diâmetro dos cardiomiócitos (μm). C) Análise do espaço entre cardiomiócitos pela área total (% de área total). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com grupo Jovem. $n = 4-5$. Escala, 200 pixels = $15 \mu\text{m}$.

4.2.2 Avaliação da hipertrofia cardíaca pela expressão protéica do receptor AT1

O AT1r é expresso em vários tecidos do sistema cardiovascular, como o músculo cardíaco, e é um dos mediadores das ações da angiotensina II (Ang II), a qual é um potente vasoconstritor e regulador do volume extracelular (Kawai et al., 2017). A Ang II, também conhecida por participar ativamente do mecanismo de hipertrofia cardíaca, uma vez que o estiramento hipertrófico de cardiomiócitos ativa a liberação de Ang II, a qual é pré-formada e armazenada no próprio tecido cardíaco. Outro mecanismo possível diz respeito a uma maior síntese intracelular de Ang II (Mill, Pimentel et al. 2004). Dessa maneira, é possível realizar uma avaliação da hipertrofia cardíaca através do AT1r, sendo considerado, neste trabalho, um dos marcadores hipertróficos.

Por meio da técnica de Western Blot, observou-se um aumento na expressão protéica do AT1r no tecido cardíaco de fêmeas idosas quando comparadas com o controle (jovens). De forma interessante, o tratamento agudo de fêmeas idosas com E2, reverteu a expressão do receptor a níveis similares aos do controle (Fig. 3: jovens $1,00 \pm 2,61e-006$ U.A.; idosas $2,02 \pm 0,094$ U.A. e idosas + E2 $0,68 \pm 0,26$ U.A.).

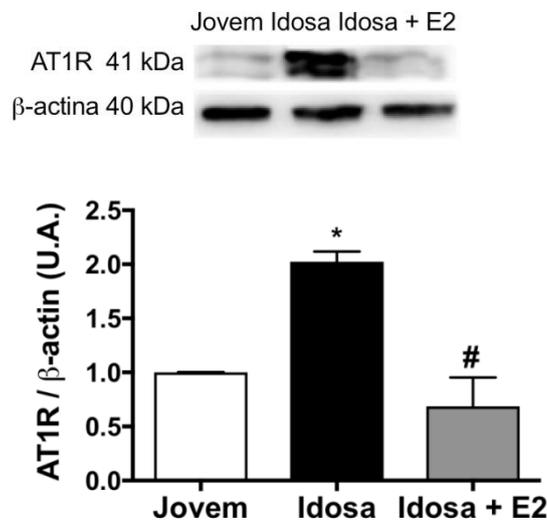


Figura 3: Avaliação da hipertrofia cardíaca por meio da expressão do AT1r. Análise da expressão protéica do receptor AT1r por Western Blot dos grupos experimentais. Normalização feita com β -actina como controle interno.

* $p < 0,05$ vs Jovem e # $p < 0,05$ vs Idosa. $n = 4$.

4.3 Análise quantitativa do proteoma cardíaco

Através da ferramenta proteômica foram identificadas 1435 proteínas cardíacas. Para realizar inferências biológicas, fez-se o tratamento estatístico e a normalização dos dados, para que, dessa forma, fosse possível visualizar as proteínas que estão diferencialmente reguladas nas três condições. Foram encontradas 63 proteínas reguladas, as quais foram comparadas da seguinte maneira: fêmea idosa vs fêmea jovem, fêmea idosa tratada vs fêmea idosa e fêmea idosa+E2 vs fêmea jovem, as quais foram demonstradas nas tabelas a seguir por meio de um mapa de calor, onde cores frias representam proteínas reguladas positivamente e as quentes, proteínas reguladas negativamente.

Na comparação entre os grupos fêmea idosa vs fêmea jovem observou-se a regulação de 13 proteínas (Tabela 2). Dessas proteínas, 7 estavam aumentadas e 6 reduzidas em fêmeas idosas quando comparadas com fêmeas

jovens. As duas proteínas com maior expressão diferencial em fêmeas idosas foram: proteína S100-a10 (3,54) e miosina-7 isoforma X1 (3,32). Por outro lado, proteínas como Carboxylesterase 1D, secernin-3 isoform X2 e Serine/threonine-protein kinase WNK2 se destacaram pela expressiva regulação negativa (*downregulation*) no grupo de fêmeas idosas quando comparada às fêmeas jovens (-3,23; -3,15 e -2,58; respectivamente).

Tabela 2: Mapa de calor demonstrativo da razão idosas vs jovens em escala logarítmica.

ID	GENE	PROTEÍNA	EXPRESSÃO DIFERENCIAL (xlog2)
P08207	S100a10	Protein S100-a10	3.54
Q91Z83	Myh7	Myosin-7 isoform X1	3.32
P29699	Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	2.65
Q60605	Myl6	Myosin light polypeptide 6	2.06
Q91X72	Hpx	Hemopexin	1.95
Q3TXS7	Psm1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	1.61
P06728	Apoa4	Apolipoprotein A-IV	1.35
P00920	Car2	Carbonic anhydrase 2	-1.72
P04919	Slc4a1	Band 3 anion transport protein	-1.81
P62075	Timm13	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13	-2.16
Q3UH66	Wnk2	Serine/threonine-protein kinase WNK2	-2.58
Q3TMH2	Scrn3	Secernin-3 isoform X2	-3.15
Q8VCT4	Ces1d	Carboxylesterase 1D	-3.23

Ao compararmos o grupo de idosas tratadas vs idosas observou-se um total de 27 proteínas reguladas (Tabela 3), das quais 16 estavam reguladas positivamente, ou seja, aumentadas nas idosas tratadas. Podem-se destacar, entre elas, as proteínas com maior expressão diferencial: Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial (2,83) e Serine/threonine-protein kinase WNK2 (2,48). De forma contrária, observam-se 11 proteínas reguladas negativamente, sendo que a Protein S100-a10 apresentou a maior regulação

diferencial entre estas (-4,57), demonstrando que ocorreu uma grande redução de sua expressão após o tratamento hormonal, seguida pela proteína Microtubule-associated protein 4 (-2,78).

Tabela 3: Mapa de calor demonstrativo da razão idosas+E2 vs idosas em escala logarítmica.

ID	GENE	PROTEÍNA	EXPRESSÃO DIFERENCIAL (xlog2)
P17665	Cox7c	Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	2.83
Q3UH66	Wnk2	Serine/threonine-protein kinase WNK2	2.48
P62075	Timm13	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13	2.35
P62897	Cycc	Cytochrome c, somatic	2.02
O35566	Cd151	CD151 antigen	2.01
Q9WVC3	Cav2	Caveolin-2	1.95
P26350	Ptma	Prothymosin alpha	1.95
Q02357	Ank1	Ankyrin-1	1.90
P10639	Txn1	Thioredoxin	1.85
P09528	Fth1	Ferritinheavychain	1.74
O88844	Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1.68
Q9CZB0	Sdhc	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	1.55
P01942	Hba	Hemoglobin subunit alpha	1.34
P14131	Rps16	40S ribosomal protein S16	0.93
Q9CR21	Ndufab1	PREDICTED: acyl carrier protein, mitochondrial isoform X1	0.79
Q9D023	Mpc2	Mitochondrial pyruvate carrier 2	0.56
P62855	Rps26	40S ribosomal protein S26	-1.41
P42208	Sept2	PREDICTED: septin-2 isoform X3	-1.50
P01868	Ighg1	Ig gamma-1 chain C region secreted form	-1.57
Q99N96	Mrpl1	PREDICTED: 39S ribosomal protein L1, mitochondrial isoform X1	-1.81
Q8BK72	Mrps27	28S ribosomal protein S27, mitochondrial	-1.86
O08677	Kng1	Kininogen-1	-1.89
P28650	Adssl1	Adenylo succinate synthetase isozyme 1	-1.92

P61982	Ywhag	14-3-3 protein gamma	-1.92
Q9EP69	Sacm1l	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	-2.02
P27546	Map4	Microtubule-associated protein 4	-2.78
P08207	S100a10	Protein S100-a10	-4.57

Na comparação entre idosas+E2 vs jovens, 20 proteínas estiveram significativamente reguladas (Tabela 4). Destas, observa-se 7 proteínas aumentadas, com a maior expressão diferencial sendo de 2,94 e correspondendo a proteína CD151 antigen. Com valor bem próximo de 2,93, tem-se a Alpha-1-anti trypsin 1-2. De forma contrária, 13 proteínas apresentaram uma regulação negativa (*downregulated*), sendo que a Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase apresentou o menor valor de expressão diferencial (-4,33).

Tabela 4: Mapa de calor demonstrativo da razão idosas+E2 vs jovens em escala logarítmica.

ID	GENE	PROTEÍNA	EXPRESSÃO DIFERENCIAL (xlog2)
O35566	Cd151	CD151 antigen	2.94
P22599	Serpina1b	Alpha-1-antitrypsin 1-2	2.93
Q91X72	Hpx	Hemopexin	2.53
Q9DC07	Nebi	LIM zinc-binding domain-containing Nebulette	2.34
Q9D023	Mpc2	Mitochondrial pyruvate carrier 2	2.06
Q61234	Snta1	Alpha-1-syntrophin	2.02
Q8CHP8	Pgp	Glycerol-3-phosphate phosphatase	1.93
P46425	Gstp2	Glutathione S-transferase P 2	-1.38
P62852	Rps25	40S ribosomal protein S25	-1.60
Q99KR7	Ppif	Peptidyl-prolylcis-transisomerase F, mitochondrial	-1.77
P84228	Histone H3.2	histone H3.2	-1.95
P09103	P4hb	Proteinbdisulfide-isomerase	-1.95
Q9D7J4	Cox20	Cytochrome c oxidasebprotein 20 homolog	-1.95
Q8R404	Mic13	MICOS complexsubunit MIC13	-2.33

P27546	Map4	Microtubule-associatedprotein 4	-2.49
P13634	Car1	PREDICTED: carbonic anhydrase 1 isoform X1	-2.94
Q9CPR4	Rpl17	60S ribosomal protein L17	-3.05
P53986	Slc16a1	Monocarboxylate transporter 1	-4.00
P62900	Rpl31	60S ribosomal protein L31	-4.20
Q9WVQ5	Apip	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	-4.33

Após a obtenção destes dados, foi possível analisá-los quanto as funções que desempenham no tecido cardíaco, na senescência e após tratamento estrogênico. O software String é um banco de dados online que permite obter informações sobre proteínas e suas interações, portanto, foi de suma importância na análise proteômica a seguir.

4.3.1 Análise da senescência: fêmeas jovens vs fêmeas idosas

Como mencionado anteriormente, realizou-se a construção de mapas de interações, com a ferramenta String, e uma análise de ontologia gênica (GO), com termos biológicos, onde foram destacadas as relações em comum que agruparam dois ou mais genes. A Figura 4 mostra a interrelação de duas funções biológicas dentro da análise da senescência: sistema de contração de fibras musculares, representado em vermelho e homeostase química, em azul. Genes representados por círculos em cinza possuem relação com os outros genes ligados a ele, porém não as referidas funções que foram citadas anteriormente.

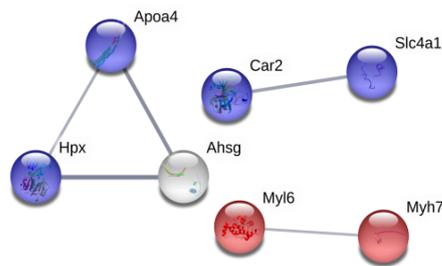


Figura 4: Relações entre genes apontadas pela ontologia gênica na comparação entre fêmeas idosas e jovens. Representação das proteínas que se relacionam entre si nas funções de homeostase química (em azul) e contração de fibras musculares (em vermelho), através da GO.

Após a análise efetuada, observa-se na Tabela 5, o envolvimento de quatro genes na homeostase química, implicados na manutenção de um estado de equilíbrio químico celular, sendo que metade está regulada negativamente. Este fato aponta para uma deterioração da função fisiológica, que é idade dependente, onde há também uma perda regenerativa da mesma. Considerando a comparação feita, entre idosas e jovens, é natural que exista essa perda de equilíbrio. De forma contrária, é possível ver todos os genes regulados positivamente no processo de contração muscular, uma vez que no envelhecimento é factível um maior recrutamento da maquinaria da contração do músculo cardíaco, para que exista um bombeamento sanguíneo mais efetivo. Nesse caso, também é um achado que concorda com a fisiologia do envelhecimento, pois estão sendo recrutadas mais proteínas, ou seja, existe uma regulação positiva, para auxiliar neste processo.

Tabela 5: Descrição de cada um dos genes destacados na senescência nas relações estabelecidas.

Gene	Regulação	GO
Myh7	<i>Upregulated</i>	Sistema de contração de fibras musculares
Myl6	<i>Upregulated</i>	Sistema de contração de fibras musculares
Hpx	<i>Upregulated</i>	Homeostase química
Apoa4	<i>Upregulated</i>	Homeostase química
Car2	<i>Downregulated</i>	Homeostase química
Slc4a1	<i>Downregulated</i>	Homeostase química

4.3.2 Análise do tratamento estrogênico: fêmeas idosas tratadas vs fêmeas idosas

Após análise da senescência, procurou-se entender o que ocorre na senescência durante o tratamento estrogênico, sob a ótica da proteômica. Semelhantemente, fez-se uma análise de GO para verificar o efeito do tratamento estrogênico, entre fêmeas idosas tratadas e não tratadas (Figura 5).

As funções biológicas destacadas nesta análise de GO são representadas pela cor vermelha, demonstrando genes relacionados à respiração aeróbica; pela cor azul na síntese de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de elétrons; e pela cor verde indicando o processo de oxirredução. Genes representados por círculos em cinza possuem relação com os outros genes ligados a ele, porém não as referidas funções que foram citadas anteriormente.

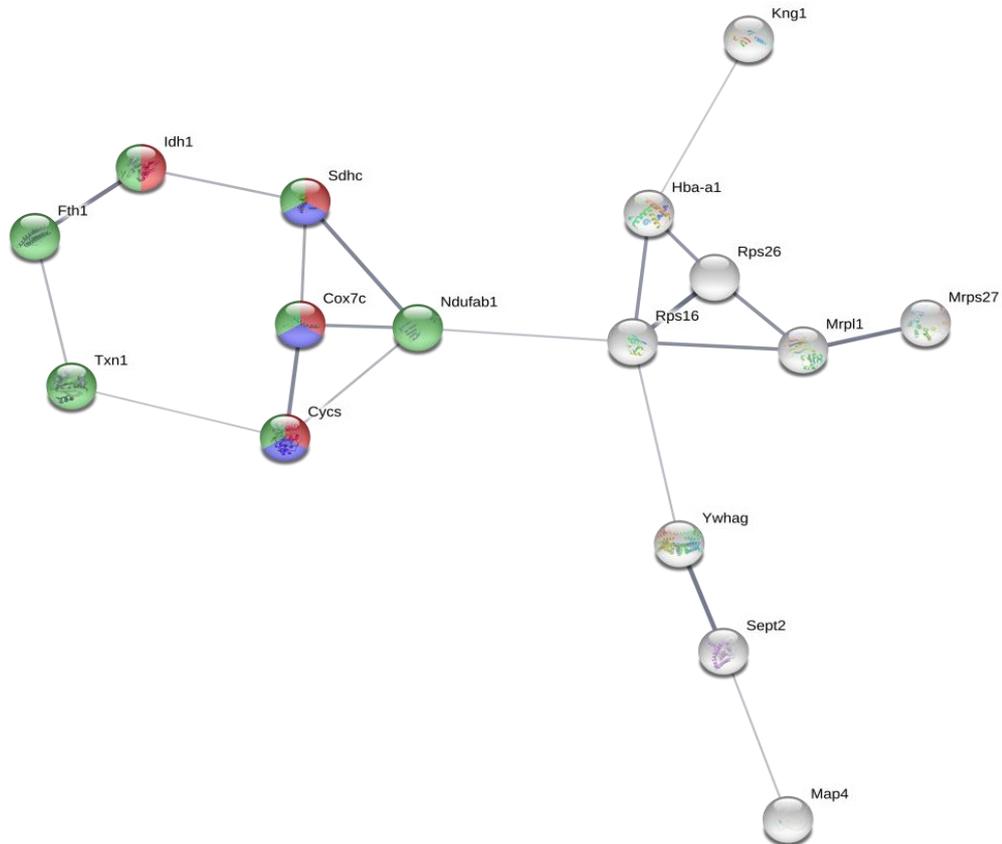


Figura 5: Relações entre genes apontadas pela ontologia gênica na comparação entre fêmeas idosas tratadas e não tratadas. Representação das proteínas que se relacionam entre si nas funções de respiração aeróbica (em vermelho), síntese de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de elétrons (em azul) e oxirredução (em verde), através da GO.

Nesta análise verificou-se que existem sete genes envolvidos em três processos biológicos os quais apresentaram uma regulação positiva após tratamento. O processo de oxirredução, a respiração aeróbica e a síntese de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de elétrons apresentou uma melhora significativa, indicando que o estrógeno contribuiu para uma melhora da estabilidade celular geral. É possível sugerir que o tratamento estrogênico conferiu uma maior defesa antioxidante e uma respiração celular mais efetiva, o que pode ser um caminho para a proteção do tecido cardíaco aos danos ocasionados pelo envelhecimento.

A Tabela 6 descreve cada um dos genes destacados nas relações estabelecidas.

Tabela 6: Descrição de cada um dos genes destacados o tratamento com E2 nas relações estabelecidas.

Gene	Regulation	GO
Idh1	<i>Upregulated</i>	Oxereduction process Aerobic respiration
Fth1	<i>Upregulated</i>	Oxereduction process
Txn1	<i>Upregulated</i>	Oxereduction process
Cycs	<i>Upregulated</i>	Oxereduction process Aerobic breathing Mitochondrial ATP synthesis coupled to electron transport
Cox7c	<i>Upregulated</i>	Oxereduction process Aerobic breathing Mitochondrial ATP synthesis coupled to electron transport
Sdhc	<i>Upregulated</i>	Oxereduction process Aerobic breathing Mitochondrial ATP synthesis coupled to electron transport
Ndufab1	<i>Upregulated</i>	Oxerrereduction process

4.4 Avaliação das espécies reativas de oxigênio (ROS)

A fim de verificar a contribuição das ROS no processo de senescência do tecido cardíaco, como sugerido anteriormente, comparou-se os três grupos experimentais por meio de técnicas de biologia molecular e histologia. Dois alvos foram testados via Western Blot: SOD2 e NADPH oxidase (Gp91), e para histologia, oxidação da DHE.

Como demonstrado nas Figuras 6 A e B, ambos os alvos testados, SOD2 (Fig. 6 A: jovem $1,00 \pm 8,819e-006$ U.A.; idosa $0,98 \pm 0,23$ U.A. e idosa + E2 $0,50 \pm 0,018$ U.A.) e Gp91 (Fig. 6 B: jovem $0,99 \pm 6,403e006$ U.A.; idosa $0,83 \pm 0,16$ U.A. e idosa+E2 $0,24 \pm 0,060$ U.A.), tiveram sua expressão diminuída pelo tratamento estrogênico, quando comparados com o grupo controle. Isso sugere que houve uma diminuição da formação de íons superóxidos, pelo Gp91, e uma menor manutenção das ROS pela SOD2. Sugere-se que, além de uma menor formação das ROS que potencialmente atacariam o tecido cardíaco, como visto anteriormente, existe uma maior proteção antioxidante no tecido cardíaco, ou seja, o mesmo sofre menos ataques pelo oxigênio e demanda uma menor defesa contra o mesmo, o que explicaria o resultado visto.

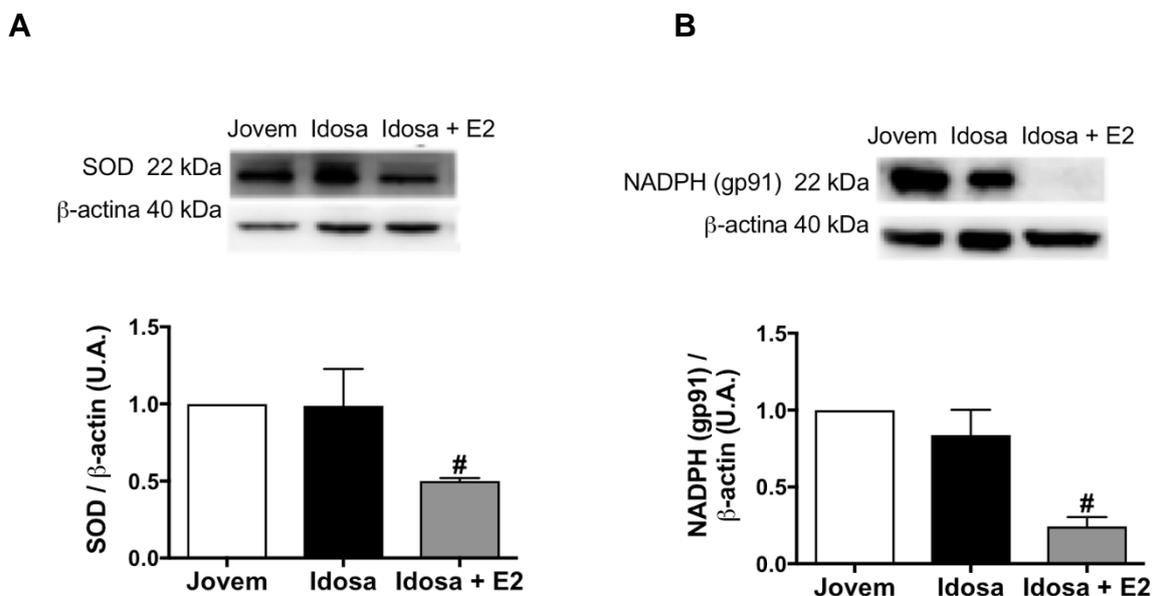


Figura 6: Expressão de enzimas anti e pró-oxidantes no tecido cardíaco de fêmeas jovens, idosas e idosas tratadas com E2. A) Análise da expressão protéica da SOD2 em tecido cardíaco por Western Blot. B) Análise da expressão protéica da Gp91 em tecido cardíaco por Western Blot. Normalização feita com β -actina como controle interno. # $p < 0,05$ vs Idosa. =4.

A partir dos resultados acima, avaliou-se a presença de ROS em cortes histológicos, via imunofluorescência. Não observou-se uma diferença significativa entre os grupos estudados, não sendo possível avaliar os produtos de oxidação da DHE e da geração de EROS (Fig. 7 A e B: jovem $2,95 \pm 0,77 \times 10^4$ U.A.; idosa $3,17 \pm 0,68 \times 10^4$ U.A e idosa+E2 $2,92 \pm 0,60 \times 10^4$ U.A).

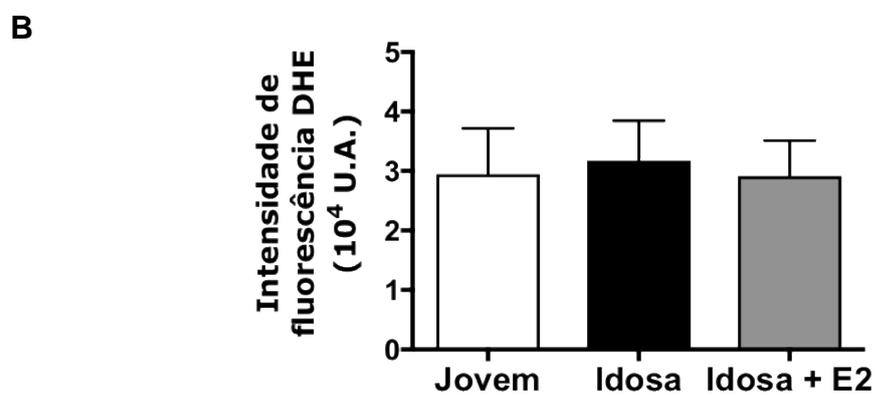
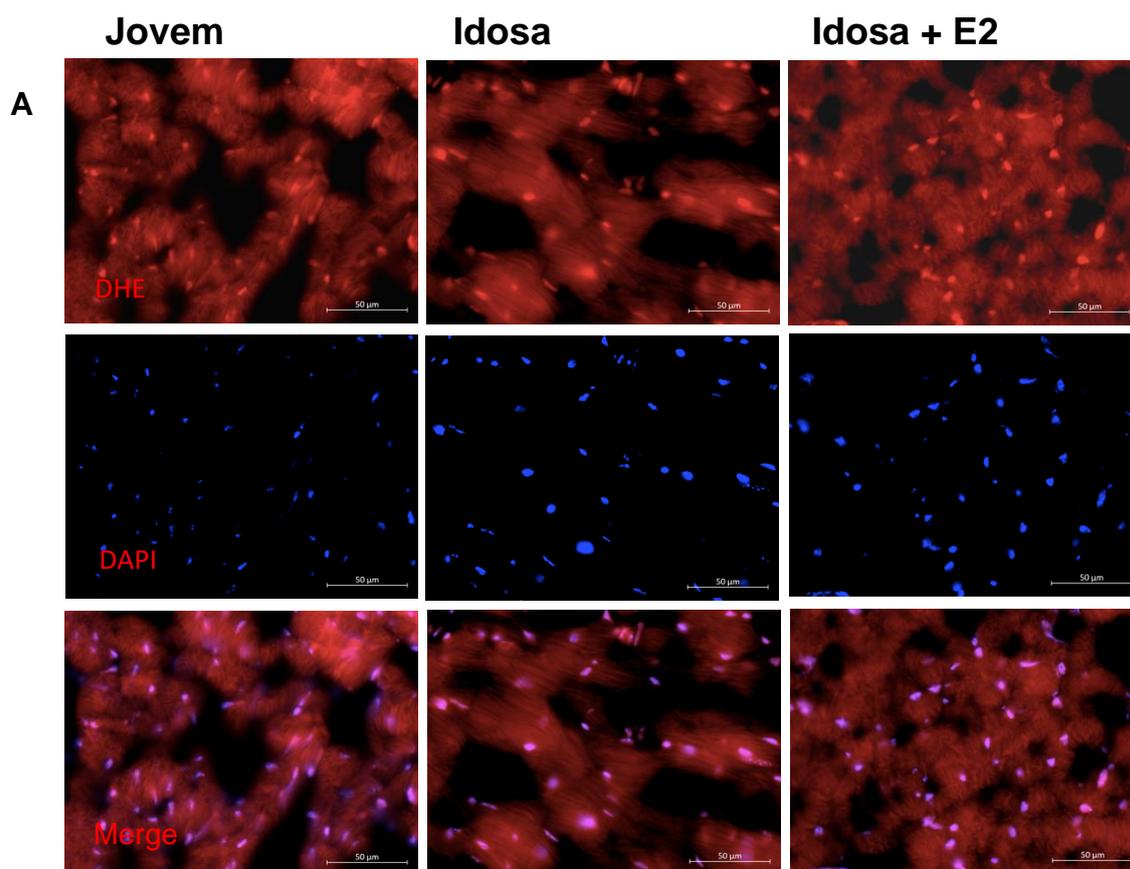


Figura 7: Avaliação de ROS por fluorescência total derivada da oxidação da DHE. A) Imagem representativa da coloração DHE (em vermelho) dos três grupos experimentais, demonstrando as marcações do tecido cardíaco e dos núcleos dos cardiomiócitos (DAPI, em azul). B) Quantificação da intensidade de fluorescência pela oxidação da DHE no tecido cardíaco.

5. Discussão

A hipertrofia cardíaca é uma marca do envelhecimento cardíaco, a qual é considerada um mecanismo adaptativo a diversos estímulos fisiológicos e patológicos. Uma vez que os cardiomiócitos possuem uma capacidade limitada de proliferação, o coração então modula seu volume e massa muscular como um meio de aumentar sua força contrátil. Esse remodelamento hipertrófico ocorre, portanto, com um aumento de tamanho e forma dos cardiomiócitos com o passar da idade, entretanto, esta adaptação acarreta em desfechos adversos e aumenta a mortalidade por DCV (Gallo, 2019). Corroborando com o exposto, em fêmeas idosas, observou-se, por meio de histologia, uma hipertrofia fisiológica do tecido cardíaco. Adicionalmente, apenas fêmeas idosas apresentaram um aumento do espaço entre cardiomiócitos em relação ao controle. De forma interessante, o tratamento agudo com E2, proporcionou a manutenção do tamanho do cardiomiócito e espaço extracelular entre os cardiomiócitos quando comparado com as fêmeas idosas, o que demonstra um potencial benefício do tratamento em relação à hipertrofia de cardiomiócitos. É sabido que o estrógeno causa uma maior degradação da calcineurina por via ubiquitina-proteassoma, ativada pelo receptor de estrógeno β . Estudos demonstraram que camundongos *knockout* para a calcineurina não apresentaram hipertrofia cardíaca. Essa falta da calcineurina anula a sinalização citada anteriormente, por meio da família NFAT de fatores de transcrição, sugerindo que esta pode ser uma via para a inibição da hipertrofia pelo estrógeno (Knowlton, 2012). Adicionalmente, é bem descrito na literatura a ação cardioprotetora do E2 sobre a extensão da hipertrofia em modelo de sobrecarga pressórica, diminuindo a deterioração da função sistólica, bem como preservou a contratilidade do ventrículo esquerdo (Iorga, 2018), o que demonstra a contribuição do E2 para reverter o dano causado pela hipertrofia cardíaca.

Outro marcador utilizado para avaliação da hipertrofia neste trabalho foi o AT1r. Verificou-se um aumento da expressão protéica deste receptor em fêmeas idosas, em relação ao controle. De fato, existem evidências do papel do AT1r no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, como na resposta à coarctação aórtica ou infarto agudo do miocárdio (Chen, 2004). Outros estudos

demonstram que o uso crônico de Losartan, um bloqueador do AT1r, em ratos espontaneamente hipertensos reduziu a massa ventricular esquerda (Xie, 2005). Camundongos fêmeas que passaram pelo tratamento com E2 demonstraram uma redução da expressão do AT1r, bem como um resultado positivo na redução da hipertrofia cardíaca. É citada a regulação negativa do estradiol na expressão gênica do AT1r, e a super expressão do AT1r em ratos fêmeas ovariectomizados. Essa superexpressão é descrita com um papel decisivo no desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão (Hong, 1992; Nickenig, 1998).

Adentrando na análise proteômica da senescência, observou-se um envolvimento de genes relacionados à contração muscular das fibras cardíacas, como Myh7 e Myl6, ambas reguladas positivamente. Com o envelhecimento, são geradas forças desiguais entre os cardiomiócitos e outras células, os quais hipercontraem. Esse aumento da contração está ligado não só a um desarranjo de cardiomiócitos, mas também a ativação de vias dependentes de estiramento, como a do TGF- β , que pode resultar em fibrose intersticial e hipertrofia (Montag, 2018). Outro ponto abordado foi a homeostase química, a qual se mostrou prejudicada na comparação entre animais jovens e idosos. Hpx e APOA4 estão reguladas positivamente, enquanto Car2 e Slc4a1, negativamente. Várias doenças compartilham a característica de possuírem depósitos intra e extracelulares de proteínas alteradas, com prejuízo da maquinaria celular, seja por conformação ou modificações pós-traducionais. Este fato demonstra como a homeostase é importante para que haja um funcionamento celular adequado, e que se adapte a situações de estresse fisiológico ou patológico (Morimoto, 2014). Na senescência é esperado que a capacidade funcional, e portanto, a homeostase, das células diminuam, bem como a função dos órgãos e a capacidade reparativa dos tecidos (Keyes, 2018), o que corrobora com os achados proteômicos.

Ao analisar o tratamento com E2 pela ótica da proteômica, evidenciou-se 7 genes, *upregulated*, relacionados a funções de respiração aeróbica, processo de oxirredução e síntese de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de elétrons. Estas três funções citadas remetem a uma melhora metabólica celular geral, a qual está intimamente ligada as funções mitocondriais, uma vez que a taxa de respiração mitocondrial pode ser utilizada para mensurar a

bioenergética mitocondrial (Son, 2017). Outro ponto interessante, demonstrado por Lapointe e Hekimi, é que a vida útil de roedores gira em torno da função mitocondrial, incluindo a respiração e a síntese de ATP acoplado à cadeia de elétrons (Lapointe, 2008), logo, uma melhora do metabolismo mitocondrial pode retardar sinais do envelhecimento e o desenvolvimento de patologias no tecido cardíaco. De fato, é demonstrado na literatura que camundongos mutantes mitocondriais, os quais possuem uma subunidade de DNA polimerase deficiente, apresentaram uma diminuição da respiração celular, maior produção de ROS mitocondrial, acúmulo de mutação do DNA mitocondrial e dano oxidativo, ou seja, apresentou características proeminentes do envelhecimento (Wei, 2009). Dessa forma, o tratamento estrogênico nas fêmeas idosas demonstrou benefício na manutenção dos cardiomiócitos, com potencial para retardar o desenvolvimento de DCV e marcas do envelhecimento. O estrógeno é descrito como regulador direto de vários processos mitocondriais, como produção de ATP, potencial de membrana e produção de ROS e sua perda progressiva implica no declínio das funções mitocondriais e redox, o que explicaria o resultado obtido (Torres, 2018).

Curiosamente, a proteína S100a10 esteve presente como a maior regulação positiva no envelhecimento, ao comparar os animais jovens e idosos e ao mesmo tempo também apresentou a maior regulação negativa após o tratamento com E2, na comparação entre idosas e idosas tratadas com estradiol. A anexina A2 forma um complexo heterotetramérico com a S100a10, onde duas moléculas de anexina A2 são ligadas entre si por um dímero da proteína S100a10. Observa-se também quatro domínios α -helicoidais, que permitem a ligação com o cálcio e a adequada funcionalidade celular. A formação do complexo confere à S100a10 uma maior estabilidade, bem como uma proteção contra o sistema ubiquitina-proteassoma. É descrita a participação deste complexo na homeostase de cálcio no tecido cardíaco (Song, 1998). Também é relatado na literatura o aumento da expressão de DAMPS (padrões moleculares associados a danos), dentre eles, a família S100 de proteínas de ligação ao cálcio, em resposta a diminuição da funcionalidade do sistema ubiquitina-proteassoma no envelhecimento (Huang, 2015). DAMPS são indutores de estresse celular, sendo associados a diminuição da longevidade em modelos murinos, por gerar instabilidade genômica, inflamação

e lesão de organelas (Huang, 2015). A funcionalidade prejudicada do sistema ubiquitina-proteassoma não só é relacionada com o acúmulo de proteínas danificadas, mas também favorece a expressão de proteínas e o crescimento celular, sendo relacionado à hipertrofia ventricular (Cacciapuoti, 2014). A expressiva *downregulation* de S100a10 após o tratamento estrogênico demonstrada neste trabalho sugere que o E2 é benéfico neste sentido e possivelmente contribui para a reversão da funcionalidade do sistema ubiquitina-proteassoma, bem como uma maior defesa contra o dano oxidativo.

De forma semelhante, as proteínas Wnk2 e Timm13 também apresentaram mudança de seus comportamentos antes e após o tratamento estrogênico, tornando-se positivamente regulados.

O gene Wnk é integrante da família serina/treonina de proteínas quinase, reconhecidas pela regulação do transporte de íons através das membranas celulares em mamíferos e possui implicação na progressão de cânceres (Gallolu Kankanamalage, 2018). Particularmente, a proteína Wnk2 é expressa predominantemente no cérebro, coração, músculo cardíaco, intestino delgado e cólon (Costa, 2015). É citado por Costa *et al* que ausência da proteína Wnk2 está relacionada a uma maior atividade da MMP2, e portanto, uma maior degradação da matriz extracelular tecidual. A degradação da matriz extracelular do miocárdio é de grande importância para a homeostase cardíaca, e sua desregulação pode levar a um remodelamento cardíaco, com disfunção sistólica e diastólica, culminando em falência cardíaca. Durante o envelhecimento cardíaco foi visto uma regulação negativa (-2,58), a qual foi revertida com a reposição hormonal com estradiol (2,48). Diante do exposto, evidencia-se um benefício em manter os níveis da proteína Wnk2 baixos

Timm13, proteína mitocondrial, desempenha ações importantes no metabolismo energético celular (Lutz, 2003). Sua desregulação implica em aumento da sensibilidade do coração senescente ao estresse (Lesnefsky, 2016). Como verificado em análise proteômica, a proteína timm13 teve sua expressão diminuída no envelhecimento (-2,16) e elevada após tratamento com estradiol (2,35). Em comparação dos grupos idosos vs jovens, é possível inferir que existiu uma degeneração típica da idade no tecido cardíaco, enquanto que o aumento na expressão da referida proteína sugere que o tratamento conferiu

uma maior resistência ao estresse celular, e evitou o declínio do metabolismo mitocondrial cardíaco durante o envelhecimento.

O envelhecimento é marcado pela produção de altas taxas de ROS, o que leva ao acúmulo de danos ao DNA, e é implicado em várias doenças relacionadas a idade (Davalli, 2016). As células senescentes respondem ao estresse desenvolvendo alguns mecanismos para manter o fenótipo senescente, como o encurtamento de telômeros, acumulação de danos ao DNA, alterações metabólicas e a produção excessiva de ROS. Estes mecanismos geram conseqüências, como a produção constitutiva de mais ROS (Davalli, 2016). Fato este que corrobora com a expressão protéica aumentada de enzimas pró-oxidantes Gp91e SOD2 em fêmeas idosas, encontrados neste trabalho. A principal via responsável pela reparação do DNA mutado é o Reparo de Excisão de Bases (BER), o qual tem sua capacidade diminuída com o envelhecimento. Segundo estudos, esta diminuição de funcionalidade está relacionada a endonuclease apurinérgica / apirimidínica 1 / fator efetor redox 1 (APE1 / Ref-1), a qual representa um fator limitante para o BER. Quando as taxas da endonuclease são comparadas entre camundongos jovens e idosos, em situação de estresse, esta aparece aumentada em cobaias jovens, as quais são mais responsivas ao estresse oxidativo (Luceri, 2017) e demonstra a responsividade do organismo envelhecimento em resposta as ROS.

Estudos demonstram que a expressão de SOD2 pode conduzir a falência cardíaca, uma vez que contribui para hipertrofia celular, apoptose e fibrose intersticial. Outro fato interessante é a regulação positiva de SOD2 em cardiomiócitos em pacientes com insuficiência cardíaca submetidos a um modelo de sobrecarga cardíaca (Brandt, 2016)

De forma interessante, após tratamento com E2, as proteínas Gp91 e SOD2 obtiveram uma diminuição substancial, embora o estrógeno em si tenha uma fraca atividade direta no seqüestro de radicais livres, o resultado encontrado pode ser explicado por ações indiretas, como a inibição da peroxidação lipídica induzida pelo ferro, oxidação do LDL, oxidação do colesterol e a formação de dienos conjugados, as quais são consideradas atividades antioxidantes potentes (Jia, 2014). Também é importante citar que

foi proposto o aumento da expressão gênica de proteínas funcionais mitocondriais pelo E2, além de suas propriedades antioxidantes (Yao, 2014), o que contribui para a explicação. Adicionalmente, as ROS foram avaliadas também por meio da oxidação do DHE, o qual demonstrou que as fêmeas que receberam E2 apresentaram tendência de diminuição da produção de ROS, porém não de forma significativa.

6. Conclusões

A proteômica envolve a identificação de proteínas e a determinação de seu papel nas funções fisiológicas e fisiopatológicas. Devido ao grande número de genes envolvidos em DCV, os mecanismos pelos quais esses genes afetam o risco cardiovascular ainda não são bem estabelecidos. Neste estudo a ferramenta foi de suma importância, uma vez que ofereceu uma visão completa acerca do painel protéico do tecido cardíaco e demonstrou, de forma simples, marcas do envelhecimento através da análise da expressão de proteínas específicas e sua modulação pelo estradiol. Foi demonstrado, na senescência, o maior recrutamento de proteínas a fim de melhorar a eficiência da contração do músculo liso cardíaco, além de uma homeostase química celular prejudicada. Após tratamento estrogênico, percebe-se uma redução da produção de ROS mitocondrial, o qual está relacionado a uma melhora do metabolismo celular geral, com uma produção de ATP mais abundante e uma respiração celular mais eficiente.

Os resultados demonstraram que o tratamento agudo com E2 na senescência possui efeitos anti-hipertróficos, reduzindo o diâmetro dos cardiomiócitos e o espaço extracelular entre os mesmos. Observou-se uma redução da expressão de AT1r, também refletindo na hipertrofia do tecido. Adicionalmente, houve uma menor expressão de enzimas pró-oxidantes, contribuindo para a redução do estresse oxidativo celular.

Este trabalho fornece uma base para o desenvolvimento de novos estudos acerca da senescência, o tratamento hormonal estrogênico e sua correlação com doenças cardiovasculares.

7. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, novas questões surgiram acerca dos mecanismos celulares, moleculares e gênicos envolvidos na senescência e pelo tratamento estrogênico no tecido cardíaco. É válido destacar que embora esses sejam resultados importantes, experimentos adicionais são necessários para responder algumas questões e esclarecer melhor os mecanismos envolvidos nesses processos.

- Aprofundar e investigar melhor algumas proteínas e genes específicos encontrados pela análise proteômica realizada, como a proteína S100a10 e seu papel na senescência, além de realizar uma validação adicional por meio de outros métodos;
- Realizar análises mais detalhadas acerca da hipertrofia cardíaca, com a utilização de marcadores hipertróficos clássicos.

8. Referências bibliográficas

ARNAL, J.-F. et al. Structure-function relationship of estrogen receptors in cardiovascular pathophysiological models. *Thrombosis Research*, v. 130 Suppl 1, p. S7-11, out. 2012.

Arab, S., Gramolini, A. O., Ping, P., Kislinger, T., Stanley, B., van Eyk, J., . . . Liu, P. P. (2006). Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. *J Am Coll Cardiol*, 48(9), 1733-1741. doi:10.1016/j.jacc.2006.06.063

Bratic, A., & Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951-957. doi:10.1172/JCI64125

Brandt, M., Garlapati, V., Oelze, M., Sotiriou, E., Knorr, M., Kröllerschön, S., . . . Wenzel, P. (2016). NOX2 amplifies acetaldehyde-mediated cardiomyocyte mitochondrial dysfunction in alcoholic cardiomyopathy. *Scientific reports*, 6, 32554-32554. doi: 10.1038/srep32554

Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., & Heck, A. J. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 4(4), 484-494. doi: 10.1038/nprot.2009.21

Cacciapuoti, F. (2014). Role of ubiquitin-proteasome system (UPS) in left ventricular hypertrophy (LVH). *American journal of cardiovascular disease*, 4(1), 1-5.

Canales, R. D., Luo, Y., Willey, J. C., Austermiller, B., Barbacioru, C. C., Boysen, C., . . . Goodsaid, F. M. (2006). Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol*, 24(9), 1115-1122. doi: 10.1038/nbt1236

Cervellati, C., & Bergamini Carlo, M. (2016). Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* (Vol. 54, pp. 739).

Chen, W. S., & Sim, M. K. (2004). Effects of des-aspartate-angiotensin I on the expression of angiotensin AT1 and AT2 receptors in ventricles of hypertrophic rat hearts. *Regul Pept*, 117(3), 207-212.

Costa, A. M., Pinto, F., Martinho, O., Oliveira, M. J., Jordan, P., & Reis, R. M. (2015). Silencing of the tumor suppressor gene WNK2 is associated with upregulation of MMP2 and JNK in gliomas. *Oncotarget*, 6(3), 1422-1434. doi: 10.18632/oncotarget.2805

Cox, J., & Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics? *Cell*, 130(3), 395-398. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.032

Cristea, I. M., Gaskell, S. J., & Whetton, A. D. (2004). Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood*, 103(10), 3624-3634. doi: 10.1182/blood-2003-09-3295

Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ERO, senescência celular e novos mecanismos moleculares no envelhecimento e doenças relacionadas à idade. *Medicina oxidativa e longevidade celular*, 2016, 3565127. doi: 10.1155 / 2016/3565127

DESCHAMPS, A. M.; MURPHY, E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 297, n. 5, p. H1806-1813, nov. 2009.

DONALDSON, C. et al. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circulation Research*, v.104, n. 2, p. 265–275, 11p following 275, 30 jan. 2009.

Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P. e Crepaldi, T. (2019). ERK: Um jogador chave na fisiopatologia da hipertrofia cardíaca. *Revista internacional de ciências moleculares*, 20(9), 2164. doi: 10.3390 / ijms20092164

Gartlehner, G., Patel, S. V., Feltner, C., Weber, R. P., Long, R., Mullican, K., . . . Viswanathan, M. (2017). Hormone Therapy for the Primary Prevention of Chronic Conditions in Postmenopausal Women: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *Jama*, 318(22), 2234-2249. doi:10.1001/jama.2017.16952

Gallolu Kankanamalage, S., Karra, A. S., & Cobb, M. H. (2018). WNK pathways in cancer signaling networks. *Cell communication and signaling : CCS*, 16(1), 72-72. doi: 10.1186/s12964-018-0287-1

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 40, p. 36869–36872, 5 out. 2001.

Heizmann, C. W. (2019). S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(7), 1197-1206. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.10.015

Huang, J., Xie, Y., Sun, X., Zeh, H. J., 3rd, Kang, R., Lotze, M. T., & Tang, D. (2015). DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. *Ageing research reviews*, 24(Pt A), 3-16. doi: 10.1016/j.arr.2014.10.004

Hong, M. K., Romm, P. A., Reagan, K., Green, C. E., & Rackley, C. E. (1992). Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *American Journal of Cardiology*, 69(3), 176-178. doi: 10.1016/0002-9149(92)91300-S

Iorga, A., Umar, S., Ruffenach, G., Aryan, L., Li, J., Sharma, S., . . . Eghbali, M. (2018). Estrogen rescues heart failure through estrogen receptor Beta activation. *Biology of sex differences*, 9(1), 48-48. doi: 10.1186/s13293-018-0206-6

Jia, G., Aroor, AR e Sowers, JR (2014). Estrogênio e mitocôndria atuam na síndrome metabólica cardiorenal. *Progresso em biologia molecular e ciência translacional*, 127, 229-249. doi: 10.1016 / B978-0-12-394625-6.00009-X

Kawai, T., Forrester, S. J., O'Brien, S., Baggett, A., Rizzo, V., & Eguchi, S. (2017). AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*, 125(Pt A), 4-13. doi:10.1016/j.phrs.2017.05.008

Keller, K. M., & Howlett, S. E. (2016). Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart. *Can J Cardiol*, 32(9), 1065-1073. doi:10.1016/j.cjca.2016.03.017

Knowlton, AA, & Lee, AR (2012). Estrogênio e sistema cardiovascular. *Farmacologia e terapêutica*, 135(1), 54-70. doi: 10.1016 / j.pharmthera.2012.03.007

Knowlton, A. A., & Lee, A. R. (2012). Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacology & therapeutics*, 135(1), 54-70. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.03.007

Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., . . . Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879-44905. doi:10.18632/oncotarget.9821

Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Diferenças Sexuais na Fosforilação de Proteínas Mitocondriais Resultam em

Produção Reduzida de Espécies de Oxigênio Reativas e Cardioproteção em Mulheres. *Pesquisa de Circulação*. 2010; 106 : 1681-1691.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . Szustakowki, J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921. doi: 10.1038/35057062

Lapointe, J., & Hekimi, S. (2008). Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mclk1+/- mice. *J Biol Chem*, 283(38), 26217-26227. doi: 10.1074/jbc.M803287200

Lesnefsky, E. J., Chen, Q., & Hoppel, C. L. (2016). Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circulation research*, 118(10), 1593-1611. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307505

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., . . . Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757-772. doi:10.2147/CIA.S158513

Lindsey, M. L., Mayr, M., Gomes, A. V., Delles, C., Arrell, D. K., Murphy, A. M., . . . Srinivas, P. R. (2015). Transformative Impact of Proteomics on Cardiovascular Health and Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 132(9), 852-872. doi:10.1161/cir.0000000000000226

Luceri, C., Bigagli, E., Femia, AP, Caderni, G., Giovannelli, L. e Lodovici, M. (2017). Mudanças relacionadas ao envelhecimento em espécies reativas de oxigênio (ROS) circulantes e carbonilas protéicas são indicativas de lesão oxidativa hepática. *Relatórios de toxicologia*, 5, 141–145. doi: 10.1016 / j.toxrep.2017.12.017

Lutz, T., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2003). Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *The EMBO journal*, 22(17), 4400-4408. doi: 10.1093/emboj/cdg421

Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-Zagrosek V. 17Beta-estradiol inibe a transcrição de metaloproteinase de matriz 2 via MAP cinase em fibroblastos. *Cardiovasc Res.* 2010; 85 : 719–728. doi: 10.1093 / cvr / cvp350.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., & TANNO, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62, 609-614.

Merz, A. A., & Cheng, S. (2016a). *Sex differences in cardiovascular ageing.* (102). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993677/pdf/nihms972380.pdf> Available from NLM (11)

Merz, A. A., & Cheng, S. (2016b). Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart*, 102(11), 825-831. doi:10.1136/heartjnl-2015-308769 Montag, J., Kowalski, K., Makul, M., Ernstberger, P., Radocaj, A., Beck, J., . . . Kraft, T. (2018).

Burst-Like Transcription of Mutant and Wildtype MYH7-Alleles as Possible Origin of Cell-to-Cell Contractile Imbalance in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Frontiers in physiology*, 9, 359. doi: 10.3389/fphys.2018.00359

Morimoto, R. I., & Cuervo, A. M. (2014). Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1, S33-38. doi: 10.1093/gerona/glu04

Nayara Braga, E., Arthur Girardi, C., Leonardo Ramos, Q., Priscila Silva, F., Eveline Gomes, V., & Priscila, F.-P. (2016). Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. *HU Revista*, 41(3 e 4). doi:10.34019/1982-8047.2015.v41.2482

Nickenig, G., Bäumer, A. T., Grohè, C., Kahlert, S., Strehlow, K., Rosenkranz, S., . . . Böhm, M. (1998). Estrogen Modulates AT₁ Receptor Gene Expression In Vitro and In Vivo. *Circulation*, 97(22), 2197-2201. doi: doi:10.1161/01.CIR.97.22.2197

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 4, p. 1535–1565, out. 2001.

Noye, M. T., Lokman, A. N., Oehler, K. M., & Ricciardelli, C. (2018). S100A10 and Cancer Hallmarks: Structure, Functions, and its Emerging Role in Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). doi:10.3390/ijms19124122

Ouzounian, M., Lee, D. S., Gramolini, A. O., Emili, A., Fukuoka, M., & Liu, P. P. (2007). Predict, prevent and personalize: Genomic and proteomic approaches to cardiovascular medicine. *Can J Cardiol*, 23 Suppl A(Suppl A), 28A-33A. doi:10.1016/s0828-282x(07)71003-6

Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788), 837-846. doi: 10.1038/35015709

Paravicini, T. M., & Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S170-180. doi:10.2337/dc08-s247

Paszkowski, T., Bińkowska, M., Dębski, R., Krzyczkowska-Sendrakowska, M., Skrzypulec-Plinta, V., & Zgliczyński, W. (2019). Menopausal hormone therapy in questions and answers - a manual for physicians of various specialties. *Przegląd menopauzalny = Menopause review*, 18(1), 1-8. doi:10.5114/pm.2019.84150

PEDRAM, A. et al. Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology*, v. 149, n. 7, p. 3361–3369, jul. 2008.

Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Vidal-Gómez, X., Hermenegildo, C., & Novella, S. (2018). Role of miRNA in the Regulatory Mechanisms of Estrogens in Cardiovascular Ageing. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 6082387-6082387. doi:10.1155/2018/6082387

Qin, X., Du, D., Chen, Q., Wu, M., Wu, T., Wen, J., ... Wang, S. (2019). A metformina previne o envelhecimento ovariano murino. *Envelhecimento*, 11(11), 3785-3794. doi: 10.18632 / aging.102016

Rodrigues-Ribeiro, L., Melo-Braga, M. N., Kjeldsen, F., Gomez-Mendoza, D. P., & Verano-Braga, T. (2019). Assessment of protein extraction and digestion efficiency of well-established shotgun protocols for heart proteomics. *Anal Biochem*, 578, 51-59. doi: 10.1016/j.ab.2019.05.006

Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., & Sanz, A. (2017). Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Frontiers in physiology*, 8, 428-428. doi:10.3389/fphys.2017.00428

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, DP Brasil, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interação do receptor estrogênico com a subunidade reguladora da fosfatidilinositol-3-OH quinase. *Natureza*. 2000a; 407 : 538-541.

Sheydina, A., Riordon, D. R., & Boheler, K. R. (2011). Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin Sci (Lond)*, 121(8), 315-329. doi:10.1042/cs20110115

Short, K. R., Bigelow, M. L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., & Nair, K. S. (2005).

Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15), 5618-5623. doi:10.1073/pnas.0501559102

Song, G., Campos, B., Wagoner, L. E., Dedman, J. R., & Walsh, R. A. (1998). Altered Cardiac Annexin mRNA and Protein Levels in the Left Ventricle of Patients with End-stage Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(3), 443-451. doi: 10.1006/jmcc.1997.0608

Sood, R., Faubion, S. S., Kuhle, C. L., Thielen, J. M., & Shuster, L. T. (2014). Prescribing menopausal hormone therapy: an evidence-based approach. *International journal of women's health*, 6, 47-57. doi:10.2147/IJWH.S38342

Ström, JO, Theodorsson, A., Ingberg, E., Isaksson, IM e Theodorsson, E. (2012). Ovariectomia e reposição de 17 β -estradiol em ratos e camundongos: uma demonstração visual. *Jornal de experimentos visualizados: JoVE*, (64), e4013. doi: 10.3791 / 4013

Torres, M. J., Kew, K. A., Ryan, T. E., Pennington, E. R., Lin, C. T., Buddo, K. A., . . . Neuffer, P. D. (2018). 17beta-Estradiol Directly Lowers Mitochondrial Membrane Microviscosity and Improves Bioenergetic Function in Skeletal Muscle. *Cell Metab*, 27(1), 167-179.e167. doi: 10.1016/j.cmet.2017.10.003

Steenman, M., & Lande, G. (2017). Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophys Rev*, 9(2), 131-137. doi:10.1007/s12551-017-0255-9

Wei, Y. H. (1998). Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 22(2), 55-67.

Wei, Y. H., Lu, C. Y., Lee, H. C., Pang, C. Y., & Ma, Y. S. (1998). Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 155-170. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09899.x

Wei, Y. H., Wu, S. B., Ma, Y. S., & Lee, H. C. (2009). Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J*, 32(2), 113-132.

Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13, 19-50.

Xie, H. H., Chen, Y. Y., Miao, C. Y., Shen, F. M., & Su, D. F. (2005). Effects of long-term treatment with candesartan on hemodynamics and organ damage in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther*, 19(6), 391-397. doi: 10.1007/s10557-005-5734-8

Yao, X., Wigginton, J. G., Maass, D. L., Ma, L., Carlson, D., Wolf, S. E., . . . Zang, Q. S. (2014). Estrogen-provided cardiac protection following burn trauma is mediated through a reduction in mitochondria-derived DAMPs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(6), H882-894. doi: 10.1152/ajpheart.00475.2013