

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Christiane Freitas Abreu Mendes**



**Análise Proteômica dos  
Corações Hipertróficos de  
Animais C57BL6 Induzida por  
Isoproterenol**

**Belo Horizonte, 2013**

**Christiane Freitas Abreu Mendes**  
**Orientador: Dr. Jader Santos Cruz - UFMG**  
**Co-Orientadora: Dra. Suely Gomes de Figueiredo - UFES**

# **Análise Proteômica dos Corações Hipertróficos de Animais C57BL6 Induzida por Isoproterenol**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Belo Horizonte, 2013**

**Christiane Freitas Abreu Mendes**  
**Orientador: Jader Santos Cruz - UFMG**  
**Co-Orientadora: Suely Gomes de Figueiredo - UFES**

# **Análise Proteômica dos Corações Hipertroóficos de Animais C57BL6 Induzida por Isoproterenol**

Área de concentração: Bioquímica

Data de apresentação: 20 de Dezembro de 2013

Resultado: \_\_\_\_\_

Examinadores:

Dra. Fabiana Simão Machado \_\_\_\_\_  
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Daniel Moreira dos Santos \_\_\_\_\_  
Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador:

Dr. Jader dos Santos Cruz \_\_\_\_\_  
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-Orientadora:

Dra. Suely Gomes de Figueiredo \_\_\_\_\_  
Universidade Federal do Espírito Santo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e a Deus acima de tudo.

# **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à Dona Leila, minha mãe.

## INDEX

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Lista de figuras.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Lista de Tabelas.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>Lista de Abreviatuas.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>Introdução.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>Compreendendo Melhor o Coração.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>Microestrutura do Coração.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>A Importância dos Canais Iônicos para a Atividade Cardíaca....</b>                                       | <b>20</b> |
| <b>Hipertrofia Cardíaca.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>Mecanismos Moleculares da Hipertrofia Cardíaca.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>O Papel dos Canais Sensíveis a Voltagem no Processo<br/>        Hipertrofico Patológico.....</b>         | <b>27</b> |
| <b>A Função do ANP e do BNP.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>O Uso de Agonistas dos Receptores Beta Adrenérgicos e a<br/>    Indução da Hipertrofia Cardíaca.....</b> | <b>30</b> |
| <b>Objetivos.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>Métodos.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>Aspectos Éticos.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Indução da Hipertrofia Cardíaca.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Análises Histomorfométricas.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>Preparo das Lâminas Histológicas.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>Dosagem de ANP.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Mensuração da Expressão de Canais para Cálcio.....</b>   | <b>40</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Análise Estatística dos Parâmetros Morfométricos.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Análise Proteômica.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>Obtenção do Extrato Protéico dos Ventrículos Esquerdos.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>Eletroforese Bidimensional.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>Focalização Isoelétrica.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>Redução e Alquilação das Proteínas Eletrofocalizadas.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>Aquisição, Processamento e Análise das Imagens.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Identificação das Proteínas Diferencialmente Expressas entre os grupos.....</b>                                 | <b>46</b> |
| <b>Digestão das Proteínas, Extração dos Peptídeos e Análise por Espectrometria de Massas.....</b>                  | <b>46</b> |
| <b>Pesquisa em Bancos de Dados.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>Análise Estatística dos Experimentos de Proteômica.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>Indução da Hipertrofia Cardíaca.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>Parâmetros Morfométricos.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>Parâmetros Histomorfométricos.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>Determinação do Nível de Expressão das Proteínas dos Canais para Cálcio do Tipo T e L por Western Blot.....</b> | <b>58</b> |
| <b>Análise Proteômica.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>Análise Comparativa dos Géis Bidimensionais dos</b>   |           |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Extratos Protéicos do Ventrículo Esquerdo.....</b> | <b>59</b> |
| <b>Identificação das Proteínas.....</b>               | <b>62</b> |
| <b>Discussão.....</b>                                 | <b>69</b> |
| <b>Indução da Hipertrofia Cardíaca.....</b>           | <b>70</b> |
| <b>Análise Proteômica.....</b>                        | <b>76</b> |
| <b>Conclusão.....</b>                                 | <b>89</b> |
| <b>Referências.....</b>                               | <b>91</b> |



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Ilustração de um corte transversal identificando as suas cavidades cardíacas bem como suas artérias e valvas componentes.....15*
- Figura 2:** *Micrografia eletrônica das miofibrilas – unidades básicas do tecido cardíaco.....19*
- Figura 3:** *Desenho esquemático apresentando como seria a interação entre as bandas A, I e linhas Z.....19*
- Figura 4:** *Potencial de ação do músculo cardíaco mostrando suas cinco fases componentes.....21*
- Figura 5:** *Número de brasileiros mortos por ano devido a problemas associados ao aparelho circulatório.....23*
- Figura 6:** *Perfil de expressão dos canais para cálcio do tipo T e tipo L no coração ao longo do desenvolvimento.....28*
- Figura 7:** *Exemplo de cardiomiócito contendo núcleo oval, claro e central que foi utilizado nas medidas de diâmetro das células cardíacas.....35*
- Figura 8:** *Valores absolutos obtidos para massa do coração; ventrículo esquerdo; e dos átrios de animais do grupo controle e tratado.....48*
- Figura 9:** *Variação da massa corporal dos animais ao longo do tratamento com isoproterenol e solução salina.....49*
- Figura 10:** *Correlações obtidas para os grupos controle e tratado da massa do coração vs massa corporal; e da massa do coração vs tamanho da tíbia.....50*
- Figura 11:** *Relação morfométrica entre a massa do ventrículo esquerdo e massa corporal; massa do coração; e tamanho da tíbia.....51*
- Figura 12:** *Dosagem de ANP presente nos átrios de animais do grupo controle e tratado por RIE.....52*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 13:</b> <i>Diâmetro aferido das células cardíacas em animais do grupo controle e animais do grupo tratado.....</i>                    | <i>53</i> |
| <b>Figura 14:</b> <i>Contagem dos miócitos cardíacos nos grupos controle e tratado em um total de 40 micrografias para cada grupo.....</i>      | <i>53</i> |
| <b>Figura 15:</b> <i>Micrografia representativa do tecido de um animal controle e de um animal tratado com isoproterenol.....</i>               | <i>54</i> |
| <b>Figura 16:</b> <i>Micrografias do tecido cardíaco de animais do grupo controle e tratado com isoproterenol.....</i>                          | <i>55</i> |
| <b>Figura 17:</b> <i>Células sanguíneas encontradas fora dos vasos e entre as fibras musculares cardíacas.....</i>                              | <i>56</i> |
| <b>Figura 18:</b> <i>Expressão protéica de canais para cálcio do tipo T e L em animais controle e tratados com isoproterenol.....</i>           | <i>57</i> |
| <b>Figura 19:</b> <i>Perfil protéico de amostras de ventrículos esquerdos dos animais dos grupos controle e tratado.....</i>                    | <i>58</i> |
| <b>Figura 20:</b> <i>Gráfico de análise de fatores onde há a projeção dos géis analisados para o delineamento dos grupos experimentais.....</i> | <i>60</i> |
| <b>Figura 21:</b> <i>Figura esquemática mostrando o processo de análise de um spot protéico ente dois grupos distintos.....</i>                 | <i>61</i> |

## LISTA DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> <i>Composição dos tubos utilizados na dosagem de ANP por RIE.....</i>  | <i>37</i> |
| <b>Tabela 2:</b> <i>Correlações obtidas a partir das massas dos átrios quando comparadas às massas corpóreas, do coração e ao tamanho da tibia.....</i>       | <i>52</i> |
| <b>Tabela 3:</b> <i>Análise do tamanho do coração; da espessura do ventrículo esquerdo; do diâmetro do ventrículo esquerdo; e do diâmetro dos átrios.....</i> | <i>55</i> |
| <b>Tabela 4:</b> <i>Análise de reprodutibilidade dos géis.....</i>  | <i>59</i> |
| <b>Tabela 5:</b> <i>Identidade dos spots protéicos diferencialmente expressos entre os grupos controle e tratado por MS e MS/MS.....</i>                      | <i>63</i> |
| <b>Tabela 6:</b> <i>Dados das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos.....</i>   | <i>65</i> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANP** – Peptídeo atrial  
natriurético

**BDNF** – Fator neurotrófico  
derivado do cérebro (do inglês  
*Brain derived neurothrophic  
factor*)

**BK** – Branco

**BSA** – Albumina de soro bovino  
(do inglês *Bovine serum  
albumin*)

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de cálcio

**CaMK** – Calmodulina quinase

**CaMKII** – Calmodulina quinase  
II

**C<sub>av</sub> 2.1** – Canais para cálcio  
dependentes de voltagem do  
tipo 2.1

**C<sub>av</sub> 3.2** – Canais para cálcio  
dependentes de voltagem do  
tipo 3.2

**CPM** – Contagem por minuto

**DA** – Diâmetro dos átrios

**DAG** – Diacil glicerol

**DTT** – Ditioneitol

**DVE** – Diâmetro do ventrículo  
esquerdo

**EDTA** – Ácido etilenodiamino  
tetra-acético

**GSK3b** – Glicogênio sintase  
quinase 3 beta

**IP3** – Inositol-3-fosfato

<sup>125</sup>I – Iodo 125 radioativo

**JNK** – Quinases Jun N terminal  
(do inglês *Jun N-terminal  
kinases*)

**HCl** – Ácido clorídrico

**KCl** – Cloreto de Potássio

**MAPK** – MAP quinase

**MAts** – Massa dos átrios

**MCr** – Massa do coração

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**MM** – Massa molecular

**mRNA** – RNA mensageiro

**MS** – Espectrometria de massa  
(do inglês *Mass spectrometry*)

**MVe** – Massa do ventrículo

esquerdo

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NaNO<sub>3</sub>** – Nitrato de sódio

**NFAT** – Fator nuclear de células T ativadas (do inglês *nuclear factor of activated T cells*)

**NL** – Não linear

**PI** – Ponto isoelétrico

**PKC** – Proteína quinase C

**PLB** – Fosfolambam

**PMSF** – Ácido Fenil metil sulfonil fluorídrico ( do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

**PVDF** - Polivinilideno

**rANP** – ANP radioativo

**RE** – Retículo Endoplasmático

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxigene species*)

**RyR2** – Receptores de rianodina

**SDS** – Sódio duodecil sulfato

**SDS-PAGE** – gel de poliacrilamida com sódio duodecil sulfato

**SERCA** – ATPases transportadoras de cálcio do retículo sarcoplasmático (do inglês *Sarcoplasmic reticulum calcium-transporting ATPases*)

**SNC** – Soro normal de coelho

**TC** – Tamanho do coração

**TEMED** – tetrametiletileno diamina

**TFA** – Ácido trifluoroacético

**UFES** – Universidade Federal do Espírito Santo

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**VE** – Ventrículo esquerdo

---

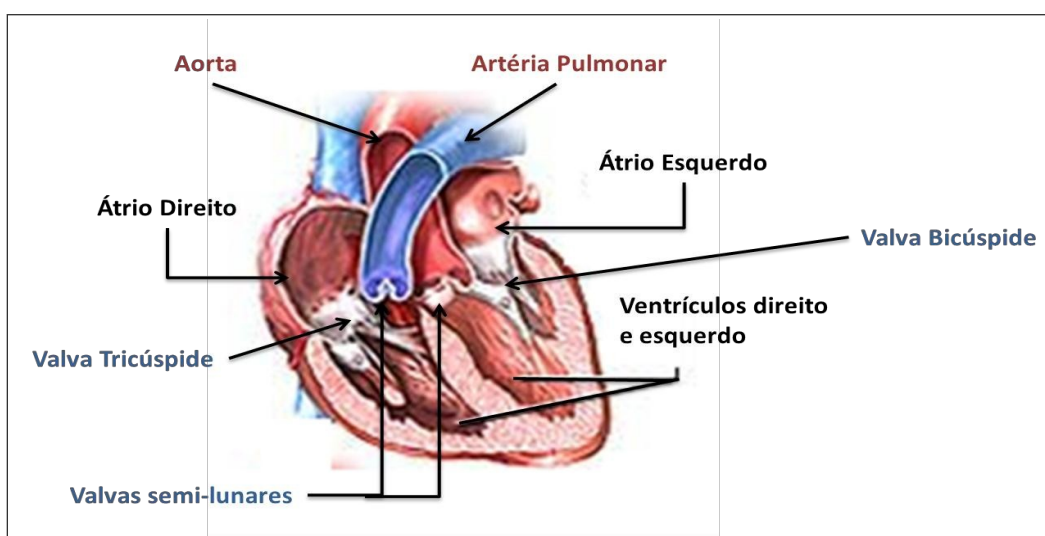
# Introdução

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.2 COMPREENDENDO MELHOR O CORAÇÃO

O coração, órgão pulsátil tetracavitário, tem sido considerado desde os primórdios da ciência como uma das principais peças em seres humanos. Para o filósofo grego Aristóteles, que observou o coração de galinhas, este órgão seria o primeiro a se formar durante o desenvolvimento dos organismos “que possuem sangue” e portanto, atribuiu a ele importância maior que todos os demais componentes de um ser vivo.

O coração é composto por quatro câmaras bombeadoras, dois átrios (superiores) e dois ventrículos (inferiores), sendo que a musculatura dos ventrículos é consideravelmente mais espessa que a dos átrios uma vez que aqueles estão sujeitos a maiores pressões. A função destas câmaras é bombear o sangue, através dos grandes vasos localizados na base do órgão, em direção aos tecidos de forma a remover os resíduos provenientes do metabolismo das células além de transportar nutrientes, oxigênio e mensageiros, como hormônios e neurotransmissores. A **figura 1** mostra um desenho esquemático das cavidades e vasos que compõem o coração.



*Fig. 1: Ilustração de um corte transversal identificando as suas cavidades cardíacas bem como suas artérias e valvas componentes.*

Como é possível observar pela figura, na margem superior direita está localizada a veia cava que desemboca no átrio direito, e na margem superior esquerda a artéria pulmonar que recebe o sangue vindo do ventrículo direito. Entre estes vasos encontra-se a artéria aorta que está diretamente conectada ao ventrículo esquerdo. Lateralmente à aorta estão as veias pulmonares que direcionam o sangue vindo dos pulmões para o átrio esquerdo. No ápice localiza-se a junção das paredes ventriculares e o septo ventricular. Revisto por Fuster et al., 1998.

O sangue venoso originário dos tecidos chega ao coração via veia cava superior e desemboca no átrio direito, onde é armazenado durante a sístole ventricular. Durante a diástole ventricular o sangue flui através da valva tricúspide em direção ao ventrículo direito que então bombeia o sangue para a artéria pulmonar atravessando a valva semi-lunar. Este sangue circula pelo pulmão onde ocorre a liberação de CO<sub>2</sub> e a oxigenação da hemoglobina. O átrio esquerdo recebe o sangue oxigenado através das veias pulmonares e durante a sístole atrial provê sangue ao ventrículo esquerdo fazendo-o distender e preparando-o para ejeção. À medida que a contração ventricular aumenta, a valva átrio-ventricular se fecha, a valva semi-lunar se abre e o sangue é direcionado para a aorta. Este processo é seguido da diástole atrial e ventricular reiniciando o ciclo cardíaco (Fuster et al., 1998).

Para suprir as necessidades fisiológicas de um indivíduo as câmaras cardíacas precisam realizar movimentos de contração e relaxamento de maneira sincronizada aproximadamente setenta vezes a cada minuto e cem mil vezes ao longo de um dia. Em uma pessoa com setenta anos de idade o coração terá batido mais de dois bilhões de vezes sem nenhuma pausa. A observação do médico e filósofo Cláudio Galeno de que as fibras cardíacas superam todos os demais tecidos em resistência a injúrias, tensão e força é aceita ainda hoje pela comunidade científica como verdadeira .

A fim de realizar o bombeamento de sangue de maneira síncrona, o coração utiliza de diferentes tipos celulares como os miócitos contráteis, especializados na contração; as fibras de Purkinje, especializadas na



condução rápida dos estímulos elétricos; e as células nodais responsáveis pela atividade de marca-passo. Cada um deles com papel fundamental para a atividade cardíaca (Katz A. M., 1992). Além disso, o nodo sinoatrial, uma pequena área especializada localizada entre a veia cava superior e o átrio direito que contém tecido nervoso além outros tipos celulares, espontaneamente despolariza-se e envia sinais elétricos que estimulam a contração dos átrios forçando a passagem de sangue para os ventrículos. A sístole ventricular inicia-se quando o estímulo elétrico é propagado em direção ao ápice cardíaco através do nódulo átrio-ventricular. Este impulso entra então no sistema His- Purkinje e determina a contração ventricular. A sincronia da atividade de contração e relaxamento destas duas câmaras é dada também por um complexo sistema de membranas e compartimentos intracelulares que permitem a comunicação íntima entre as células e um rápido fluxo de informação (estímulos elétricos e/ou mensageiros moleculares) através do tecido cardíaco (Boyden et al., 2010) (Katz, A. M., 1992) (Fabiato and Fabiato, 1972) (Silverman et al., 2006).

Além de sua função contrátil, o coração também apresenta atividade endócrina. Se observados ao microscópio óptico de luz, os miócitos cardíacos atriais apresentam grânulos densamente corados que representam estoques intracelulares do peptídeo atrial natriurético (ANP) (Lattion et al., 1986). Desta forma, o coração não é apenas uma bomba, mas também um órgão endócrino. Pequenas quantidades de ANP e de BNP ('brain natriuretic peptide'), uma molécula estruturalmente relacionada ao ANP, são também encontradas nos ventrículos, porém em pequenas quantidades. Estes peptídeos são liberados dos estoques internos quando as paredes dos átrios e/ou ventrículos são distendidas e podem ser vistas como sensores de volume (Lattion et al., 1986; Katz, 1992). O ANP é encontrado como um hormônio circulante e atua também em diversos processos biológicos como vasodilatação, diurese, natriurese, regulação da pressão sanguínea e inibição da secreção de renina e aldosterona (de Bold, 1985; Laragh, 1985; Cantin and Genest, 1987).

### 1.3 MICROESTRUTURA DO CORAÇÃO

Uma análise microscópica da estrutura dos cardiomiócitos mostra que aproximadamente metade do volume destas células é ocupada por miofibrilas, o arranjo molecular básico do tecido cardíaco que executa a contração. Cada miofibrila é constituída principalmente das proteínas actina, miosina e titina, além do envoltório que as mantém unidas. Estas proteínas se organizam de maneira a formar filamentos finos (dupla fita de actina juntamente com tropomiosina e três proteínas do complexo troponina) e filamentos grossos (polímeros de miosina e titina). O encurtamento do músculo cardíaco durante a contração é dado pelo deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos. O restante da célula é densamente ocupada por mitocôndrias responsáveis suprir o tecido com energia suficiente para realizar o bombeamento vigoroso e contínuo de sangue (Stenger and Spiro, 1961; Katz, 1992).

Na **figura 2**, a região de coloração escura contém os miócitos responsáveis pela contração e é denominada banda A. A região mais clara, banda I, contém apenas os filamentos finos. Cada banda I é delimitada por uma linha altamente corada, a linha Z. Um sarcômero está contido entre duas linhas Z e é composto, portanto, por uma banda A e duas bandas I. O disco intercalar representa uma junção célula-célula e apresentam baixa resistência elétrica. A **figura 3** apresenta um esquema simplificado de um sarcômero e seus componentes.



Fig. 2: Micrografia eletrônica das miofibrilas - unidades básicas do tecido cardíaco. (M) mitocôndrias; (Z) linha Z; (D) disco intercalar; (L) lipídeos; (A) banda A; (I) banda I; Adaptado de Katz et al.

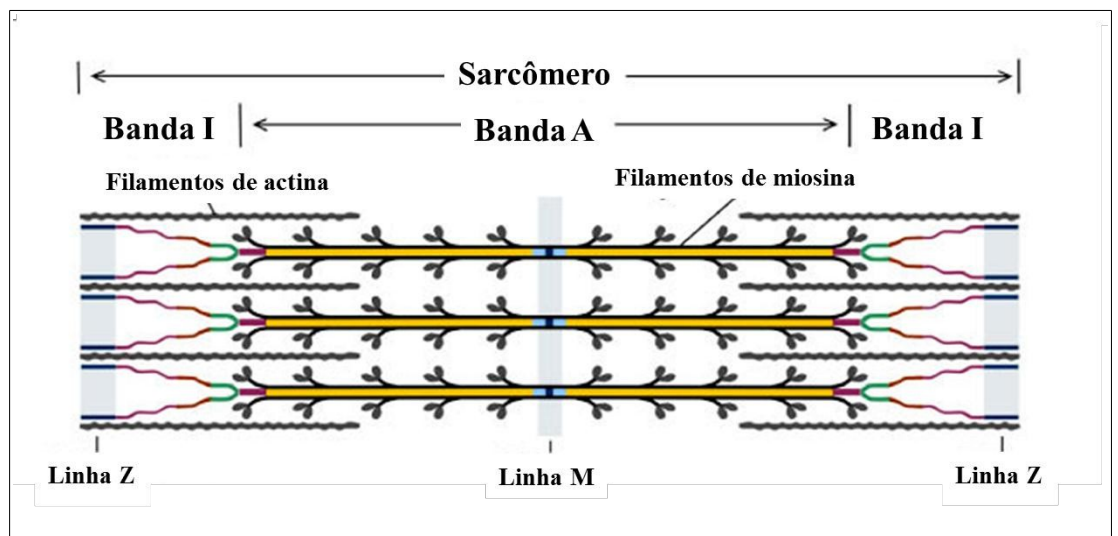


Fig. 3: Desenho esquemático apresentando como seria a interação entre as bandas A, I e linhas Z. Adaptado de Ferreira-Castro, 2011.

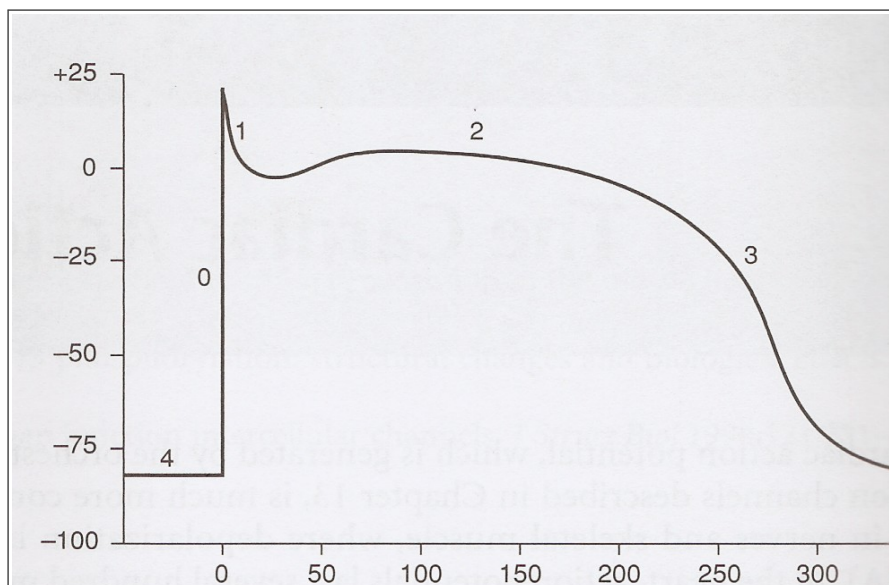
## 1.4 A IMPORTÂNCIA DOS CANAIS IÔNICOS PARA ATIVIDADE CARDÍACA

A partir da descoberta de que o cálcio seria o mensageiro responsável pela ativação das proteínas contráteis, C. A. V Hill concluiu ainda em 1949 que devido à intensa atividade cardíaca esse íon não poderia ser propagado por difusão através da superfície das células. De acordo com o autor, um estímulo excitatório deveria ser propagado ao interior da célula para ser controlado por mecanismos mais rápidos (Fabiato & Fabiato, 1979; Hill, 1949).

Como predito por Hill, o coração de um mamífero adulto depende da interação de dois sistemas de membranas para superar as limitações impostas pela difusão e para realizar de maneira eficiente o processo de excitação-contração. O primeiro deles, denominado túbulos transversos (ou túbulos-T) são projeções da membrana plasmática que rapidamente propagam os potenciais de ação para o interior das células cardíacas. O segundo sistema, o retículo sarcoplasmático (RS), é uma região especializada do retículo endoplasmático capaz de armazenar íons cálcio. A propagação do potencial de ação através dos túbulos-T e a liberação e recaptação de cálcio pelo RS explica a rápida atividade cardíaca.

Juntamente com este complexo sistema de membranas, os canais iônicos, poros transmembranares que permitem a passagem seletiva de substâncias carregadas através da bicamada lipídica, controlam o fluxo rápido de informações entre o meio extracelular e o intracelular bem como entre duas células justapostas (Hille, 2001).

Uma elaborada sequência de abertura e fechamento de canais iônicos resulta em mudanças no potencial elétrico através da membrana plasmática que, dependendo da magnitude, pode desencadear o potencial de ação. No coração, o potencial de ação consiste em diversas fases (**Fig. 4**) que podem ser diferentes de acordo com a região analisada. Em cada fase podemos identificar a prevalência do fluxo de um íon específico sem entretanto, alterar a composição química do meio intracelular (Katz, 1992; Hille, 2001)).



*Fig. 4: Potencial de ação do músculo cardíaco mostrando suas cinco fases componentes (0-4). O eixo X representa o tempo e milissegundos e o eixo Y representa o potencial de membrana em milivolts. Adaptado de Katz, A.M.*

De maneira simplificada, o potencial de ação cardíaco dura aproximadamente 300ms e consiste em cinco fases: fase zero (despolarização, onde cátions sódio fluem em direção ao citossol); fase 1 (repolarização inicial, relativa à saída de íons potássio para o meio extracelular); fase 2 (plateau, onde há um intercâmbio de íons em ambas as direções sendo que as correntes de saída de potássio são balanceadas pelas correntes de entrada de cálcio); fase 3 (repolarização consistindo basicamente pela saída de íons potássio); e fase 4 (correspondente ao potencial de repouso) (Draper And Weidmann, 1951; Katz, 1992; Hille, 2001).

Assim, o fluxo de íons através de canais dependentes de voltagem regulam não apenas os batimentos cardíacos através do potencial de ação mas também são responsáveis pela despolarização do nodo sinoatrial e sua consequente atividade de marca-passo; e são os principais responsáveis pelo transporte de informação para o interior da célula (que é feito especialmente através do influxo de íons cálcio) (Carmeliet And Lacquet, 1956) (Guilbault and Coraboeuf, 1965). Além dessas funções no coração de um indivíduo

adulto, os canais iônicos, particularmente os canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo T ( $C_{av. 3.2}$ ) e do tipo L ( $C_{av. 2.1}$ ) têm papel fundamental no correto desenvolvimento do coração durante o estágio embrionário.  $C_{av. 3.2}$ , prevalece principalmente nos estágios precoces do desenvolvimento do embrião enquanto  $C_{av. 2.1}$  se torna mais abundante a partir do nascimento do indivíduo (Yasui et al., 2005). O controle da expressão dos genes para estes canais em cada estágio de vida é, portanto, necessário para a correta formação do sistema circulatório e para a fisiologia cardíaca saudável em um indivíduo adulto como discutiremos posteriormente.

### 1.5 HIPERTROFIA CARDÍACA

A falência cardíaca é uma desordem clínica grave que representa a causa primária de internações hospitalares e morte na Europa e nos Estados Unidos. Devido a alta prevalência na população americana (em torno de 10%) aproximadamente 28 bilhões de dólares são gastos anualmente com tratamento pelo governo americano. No mundo, mais de 15 milhões de pessoas são acometidas por esta doença, sendo o grupo de risco composto por hipertensos, fumantes, diabéticos, pessoas que já sofreram infarto ou possuem alguma doença que afete as artérias coronárias (Srivastava et al., 2008)(Rapp, 2000)(Mill et al., 1998)(Widgren et al., 1993)(Cooper, 1987). No Brasil, o número de mortes por doenças associadas ao aparelho circulatório tem crescido assustadoramente ao longo dos anos de acordo com dados do Sistema Único de Saúde – SUS (**Fig. 5**).

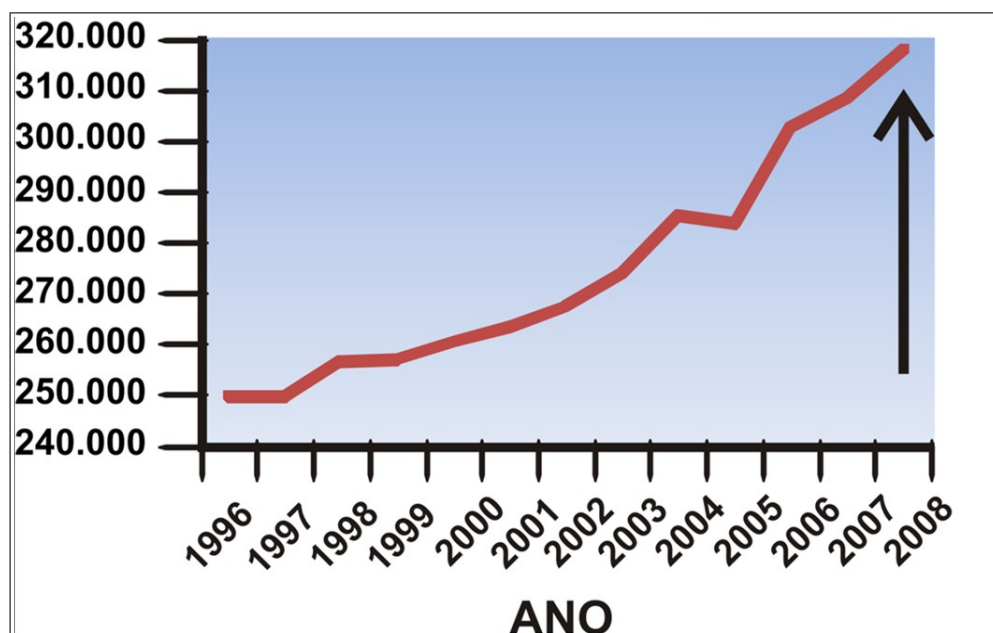


Fig. 5: Número de brasileiros mortos por ano devido a problemas associados ao aparelho circulatório. Freitas & Cruz, 2011

A maior parte das doenças que acometem o sistema cardiovascular prejudicam o fluxo sanguíneo e geram uma sobrecarga hemodinâmica no coração. Portanto, para compensar essa redução no fluxo de sangue e suprir as demandas energéticas aumentadas do órgão, o coração precisa passar por um remodelamento morfológico e molecular que leva ao aumento em massa deste tecido. Esse estímulo, entretanto, se persistente, gera danos ao coração e aumenta as taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes (Mudd and Kass, 2008).

A hipertrofia cardíaca é classificada em patológica e fisiológica: (i) Hipertrofia cardíaca patológica é aquela em resposta ao aumento no stress biomecânico induzido tanto por fatores extrínsecos (aumento de pressão e/ou volume em doenças como hipertensão e/ou disfunções nas válvulas cardíacas) ou em resposta a fatores intrínsecos (como o remodelamento cardíaco induzido por isquemia ou cardiomiopatias hipertróficas). O aumento em massa do órgão pode ser explicado pelo aumento nas dimensões do cardiomiócitos, aumento no número de células, e proliferação do tecido fibroso intersticial (Abduch et al., 2009; Du et al., 2010; Ieda and Fukuda, 2009). Além destas

alterações ainda são identificados um aumento no número de mitocôndrias, no número de miofibrilas por sarcômero e de sarcômeros em série (Anversa et al., 1984; Bernardo et al., 2010; Grossman et al., 1975).(ii) Hipertrofia cardíaca fisiológica é aquela que também induz ao aumento em massa do coração mas não acarreta danos como fibrose, arritmias e falência do órgão, nem compromete a saúde do paciente. Este processo é comum em atletas e gestantes, pessoas que por certo período de tempo apresentam uma maior demanda energética. Diversos estudos tentam entender os mecanismos moleculares que determinam as principais consequências dos tipos de hipertrofia, com o objetivo de gerar conhecimentos para minimizar os danos em pacientes acometidos pela hipertrofia cardíaca patológica (Ligeti, 1960; Santacruz et al., 2013).

Durante o processo hipertrófico patológico, o órgão passa por duas fases distintas, sendo a primeira chamada de compensatória e a segunda, descompensada. Durante a fase compensatória, a resposta do coração ao estímulo hipertrófico corresponde ao aumento no trabalho realizado e portanto, não existem impactos negativos à sua morfologia e performance contrátil. Em contraste, a fase descompensada da hipertrofia cardíaca inicia-se logo após a fase compensada e é nesta fase onde se inicia processos de disfunção cardíaca e falência do órgão (Luethy et al., 1964; Meerson and P Ogosova, 1962).

Caso a sinalização hipertrófica patológica persista, há um aumento exponencial do risco de falência cardíaca e/ou morte súbita. Essa observação sugere que a hipertrofia cardíaca apesar de ser considerada uma adaptação, se torna mal adaptativa e leva à falência cardíaca se prolongada. A falência aparece, portanto, como um desfecho desfavorável da hipertrofia cardíaca patológica (Bi, 2012; Clemo et al., 1998).

No nível celular, a hipertrofia cardíaca patológica pode ser considerada como uma resposta dos cardiomiócitos ao estresse biomecânico incluindo o aumento da pressão e do volume sanguíneos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e neuro hormônios circulantes, os quais podem ativar



cascatas intrínsecas e específicas de sinalização. Muitas destas vias de sinalização terminam no núcleo com a ativação de fatores de transcrição, co-reguladores e microRNAs levando à alterações na expressão gênica cardíaca (Chien et al., 1997; Swynghedauw, 1999; Swynghedauw et al., 2010). As alterações moleculares observadas durante o desenvolvimento do processo hipertrófico patológico são similares a aqueles observados durante o desenvolvimento fetal do coração e portanto, a hipertrofia cardíaca patológica é frequentemente descrita como sendo acompanhada da reativação de genes fetais. Apesar da reativação deste programa gênico fetal ser apenas uma resposta adaptativa ao stresse, está claro que a expressão aberrante de genes fetais envolvidos na contratilidade, no mauseio do cálcio intracelular e também de moléculas envolvidas com processos energéticos levam a mudanças mal-adaptativas da função cardíaca (Haberland et al., 2009; Molkenin, 2004).

### **1.5.1 MECANISMOS MOLECULARES DA HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA**

Os processos que desencadeiam a hipertrofia cardíaca são considerados complexos e, apesar de muito estudados não são compreendidos em sua totalidade e diversos mecanismos já foram descritos como reguladores do processo hipertrófico patológico. Arber e colaboradores escreveram sobre a participação de proteínas do citoesqueleto e dos receptores ativados por estiramento (proteínas LIM) na cardiomiopatia dilatada (Arber et al., 1997), enquanto outros autores focaram-se nas complexas vias envolvendo quinases como a GSK3 $\beta$ , p38, MAPK, GATA-4, JNK e etc (Marber et al., 2011; Rohini et al., 2010; Sugden et al., 2008; Wilkins and Molkentin, 2004).

Dentre os mecanismos propostos o mais bem estudado é o desencadeado pela ativação de receptores associados à proteína G. A partir da ligação de um agonista à proteína receptora de membrana, ocorre a dissociação do complexo alfa e beta-gama, componentes das proteínas G, levando à ativação da fosfolipase C. Esta realiza a hidrólise de lipídios de membrana formando diacil glicerol (DAG) - responsável por ativar a proteína quinase C (PKC) que fosforila proteínas citosólicas e nucleares críticas para o crescimento celular - e inositol- 1,4,5-trifosfato (IP3) (Komuro et al., 1991; Poggioli et al., 1986; Sadoshima et al., 1992). O IP3 liga-se a receptores no retículo endoplasmático (RE) ou no envelope nuclear e mobiliza estoques internos de cálcio (Berridge, 2009). O cálcio liberado destes estoques associa-se à calmodulina quinase (CaMK) e ativa a fosfatase calcineurina. A calcineurina promove a ativação por desfosforilação, de resíduos de serina no domínio N-terminal, do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), o que possibilita seu translocamento para o interior do núcleo onde participa da transcrição de genes envolvidos na hipertrofia (Prasad and Inesi, 2011; Yamaguchi et al., 2011; Zarain-Herzberg et al., 2011). Parte dos genes ativados durante o remodelamento hipertrófico em um animal adulto atuam, em condições normais, durante o desenvolvimento embrionário e, portanto os

mecanismos moleculares da hipertrofia cardíaca estão associados à re-expressão de proteínas do estágio fetal como o ANP, a enzima conversora de angiotensina I, a subunidade beta da creatina quinase, a subunidade M da lactato desidrogenase, algumas isoformas de proteínas contráteis e de canais para cálcio do tipo T (Bjørnstad et al., 2012; Eppenberger-Eberhardt et al., 1990; Lompré et al., 1984; Naito et al., 2006; Weikert et al., 2003). Dependendo do estímulo, quinases presentes no núcleo podem cessar a expressão destes genes fetais a partir da fosforilação do NFAT, evento que determina o retorno desta molécula para o citosol. O cálcio liberado dos estoques internos participa ainda da acetilação de histonas, desenovelando-as do DNA e permitindo que algumas regiões do genoma estejam disponíveis para a transcrição (Haberland et al., 2009; Molkentin, 2006).

### **1.5.2 O PAPEL DOS CANAIS PARA CÁLCIO SENSÍVEIS A VOLTAGEM NO PROCESSO HIPERTRÓFICO PATOLÓGICO**

O cálcio é o segundo mensageiro que controla o maior número de processos celulares inclusive a hipertrofia cardíaca. Durante a sinalização hipertrófica a dinâmica citosólica deste íon regula a atividade de proteínas como a calcineurina, a proteína quinase C (PKC) e a calmodulina quinase II (CaMKII) (Molkentin, 2006; Wilkins and Molkentin, 2004). Por influenciar diretamente diversas classes de proteínas intracelulares o fluxo de cálcio determina a regulação de processos importantes para o correto desenvolvimento e funcionamento da maquinaria celular, de órgãos e conseqüentemente para a sobrevivência do indivíduo. Nas células cardíacas, o fluxo de cálcio é controlado principalmente por dois tipos de canais para cálcio ativados por voltagem: os canais do tipo T (Cav 3.2) e os canais do tipo L (Cav 2.1). Ambas as classes de canais coexistem em um indivíduo adulto saudável, entretanto há a prevalência de uma das classes dependendo do estágio de desenvolvimento do indivíduo. Yasui e colaboradores demonstraram em 2005 que durante o desenvolvimento de um indivíduo normal ocorre uma clara

inversão da concentração de canais para cálcio do tipo L e T (Yasui et al., 2005; Freitas and Cruz, 2011) (**Figura 6**).

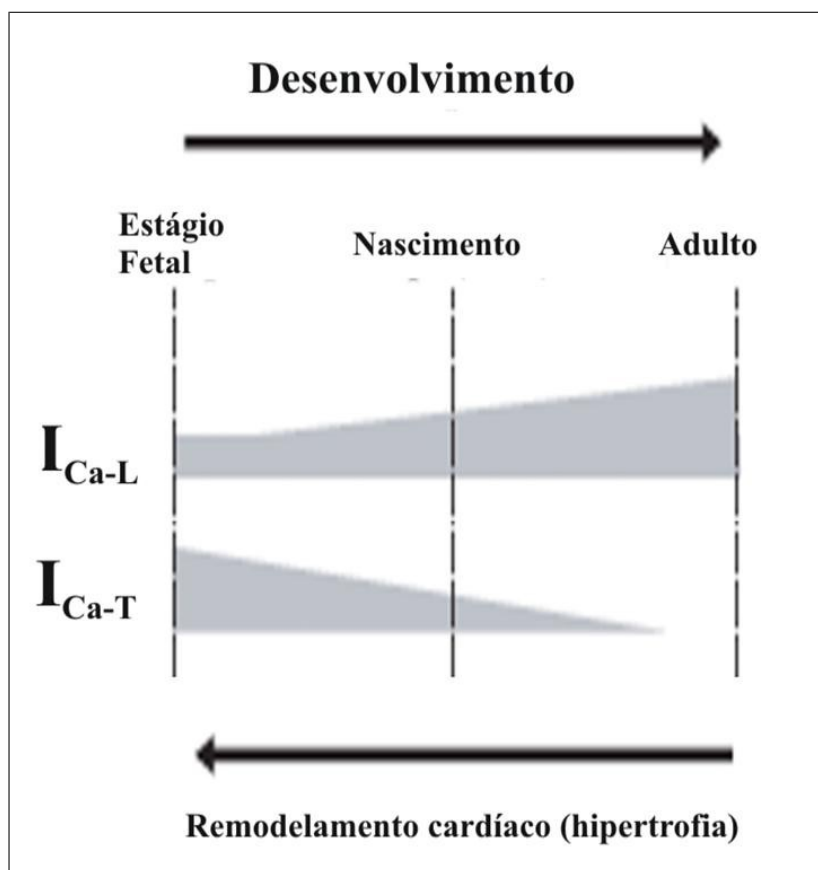


Fig. 6: Perfil de expressão dos canais para cálcio do tipo T e tipo L no coração ao longo do desenvolvimento. Adaptado de Yasui, 2005

No estágio embrionário, o cálcio necessário para ativar a contração lenta, característica dos miócitos cardíacos fetais, vem do fluido extracelular e atravessa a membrana plasmática majoritariamente por meio de canais para cálcio do tipo T. Para garantir a rápida contração dos cardiomiócitos de um coração adulto, é necessário que o cálcio extracelular induza a liberação de cálcio dos estoques internos (RS) – processo conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio. Nesta fase do desenvolvimento o cálcio que flui para o interior da célula utiliza os portões para cálcio do tipo L. Alterações na atividade dos canais para cálcio do tipo L respondem por

patologias cardíacas como arritmias, mas não estão implicados no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Houser, 2009).

Por outro lado, a superexpressão de canais para cálcio do tipo T não induz ao desequilíbrio contrátil do coração, mas estimula a ativação de mecanismos pró-hipertróficos (Cribbs, 2010; David et al., 2010; Nakao et al., 2009). Desta forma, podemos entender que estes complexos macromoleculares, mais do que transportar íons através da bicamada lipídica, regulam o transporte de informações específicas ao interior da célula.

### **1.5.3 A FUNÇÃO DO ANP E DO BNP**

Assim como os canais para cálcio do tipo T, o ANP é estritamente controlado durante o desenvolvimento. Durante os estágios fetais essa molécula é abundantemente encontrada em miócitos ventriculares (especialmente no ventrículo direito) e após o nascimento são raramente detectadas nestas células em indivíduos saudáveis (Bloch et al., 1986; Tsuchimochi et al., 1987; Wei et al., 1987). Acredita-se que a produção e estocagem de ANP no ventrículo direito durante os estágios fetais sejam desencadeadas devido ao maior estresse mecânico desenvolvido por esta câmara durante as primeiras etapas do desenvolvimento. Em pacientes adultos com cardiomiopatia dilatada grave as fibras ventriculares (em especial as do ventrículo esquerdo) sintetizam e estocam novamente o ANP (Ding et al., 1987; French et al., 1988). Sabe-se que esse processo patológico é caracterizado por dilatação das câmaras ventriculares e aumento da resistência dos vasos aferentes, corroborando, portanto com a hipótese de que a produção e liberação do ANP ocorrem em condições de estresse e estiramento das câmaras cardíacas.

A produção e secreção de BNP também podem estar alteradas em diversos quadros clínicos como durante a fibrilação atrial, doenças pulmonares, hipertensão, falência renal e sobrecarga de pressão ou volumétrica. A produção de BNP é desencadeada por estiramento mecânico e

pode ocorrer tanto nos átrios quanto nos ventrículos. O aumento na concentração deste peptídeo no plasma é associado com disfunção sistólica ventricular e é característico de diversas doenças cardíacas (Paelinck et al., 2006; Selvais et al., 1998). Apesar das evidências de que o BNP é secretado devido ao estiramento mecânico e à sobrecarga ventricular, há uma grande variação entre indivíduos tornando, portanto a interpretação dos níveis de BNP difíceis (Burke and Cotts, 2007).

### **1.6 O USO DE AGONISTAS DOS RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS E A INDUÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA**

No coração, a ativação de receptores beta adrenérgicos são responsáveis por modular a força e a frequência cardíaca (Kadambi et al., 1996). Diversos autores mostraram que a atividade simpática do sistema nervoso é importante para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Bristow, 2003; Cohn et al., 1984; Kaye et al., 1995). Este sistema é responsável por liberar altas concentrações de catecolaminas na circulação resultando, portanto na ativação crônica dos receptores beta adrenérgicos. É possível que este seja um mecanismo compensatório para aumentar a contratilidade do órgão (Ni et al., 2011).

Entretanto, a ativação sustentada destes receptores é nociva ao coração por induzir o crescimento patológico do órgão, disfunção ventricular, apoptose e insuficiência cardíaca (Port and Bristow, 2001). Desta forma, a ativação crônica dos receptores beta adrenérgicos contribui para a progressão de patologias cardíacas e aumenta a mortalidade tanto em modelo animal quanto em pacientes humanos.

As cascatas intracelulares ativadas após estimulação beta adrenérgica envolvem a ativação da proteína quinase A (PKA) e consequente regulação das proteínas SERCA, fosfolamban (PLB), receptores rianodina (RyR2) e canais para cálcio do tipo L presentes no sarcolema. A hiperatividade dos RyR2 induzida pela fosforilação da PKA, provoca o vazamento de cálcio

do RS durante a diástole e conseqüentemente causa a depleção dos estoques internos de cálcio. Este processo contribui para o 'estresse' do RS - um conhecido mecanismo indutor da insuficiência cardíaca, arterosclerose, isquemia e cardiomiopatia dilatada (Maier and Bers, 2007; Marx et al., 2000; Okada et al., 2004; Orrenius et al., 2003).

Os modelos animais de cardiomiopatias são importantes para o estudo dos processos bioquímicos e cascatas celulares envolvidas no desenvolvimento patológico do coração. O entendimento destas vias fornece os substratos necessários à manipulação do sistema e elaboração de estratégias terapêuticas visando a reversão do quadro patológico ou a melhora na qualidade de vida dos pacientes. Estes modelos, entretanto, podem não representar fielmente os cenários produzidos em um quadro de hipertrofia cardíaca desenvolvida espontaneamente em um paciente humano. Desta forma, é importante que estes modelos sejam testados para os diversos parâmetros característicos de um processo patológico específico para que os resultados obtidos destes estudos não se tornem mera especulação desprovida de qualquer sentido fisiopatológico.

O modelo de hipertrofia cardíaca induzida através da administração subcutânea de isoproterenol é confiável, reprodutível e utilizado por diversos grupos no mundo. A existência de informações abundantes acerca dos processos envolvidos na hipertrofia cardíaca estimulada por este agonista beta-adrenérgico foi essencial na determinação do tratamento a ser estudado.





## Objetivos

Os objetivos gerais deste trabalho foram I) avaliar as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e tratado de forma a entender os mecanismos responsáveis pelo processo hipertrófico patológico induzido pelo Isoproterenol; e II) verificar a participação de canais para cálcio do tipo T (Cav3.2) na cascata de sinalização da hipertrofia cardíaca.

Como objetivos específicos destacamos:

I) Induzir a hipertrofia cardíaca através da administração do agonista beta-adrenérgico isoproterenol na dose de 50mg/Kg/dia durante sete dias consecutivos em camundongos machos da linhagem C57BL6;

II) Verificar as alterações morfológicas induzidas pelo isoproterenol no coração dos animais do grupo tratado após uma semana de tratamento;

III) Obter o padrão protéico bidimensional do ventrículo esquerdo dos corações hipertróficos e identificar as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e tratado;

IV) Inferir a função biológica das proteínas identificadas e seu papel no processo hipertrófico patológico;

V) Investigar os mecanismos responsáveis pela hipertrofia cardíaca induzida pelo Isoproterenol e a função da sinalização de cálcio via canais para cálcio do tipo T neste processo.

# **Métodos**

---

## 3.0 Métodos

### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com o guia para utilização de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG sob o protocolo número 129/08.

### 3.2 INDUÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA

Camundongos C57BL6 (8-10 semanas de idade) foram cedidos pelo CEBIO/UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões de 27 x 18 x 13 cm. No máximo quatro animais foram alocados por gaiola, mantidos com água e ração (Nuvilab) *ad libitum* em ciclo claro / escuro de 12h. Ao completarem 12 semanas os animais foram selecionados aleatoriamente para compor os grupos experimentais (controle e tratado).

Os animais do grupo tratado receberam durante 7 dias consecutivos, 50mg/kg/dia de isoproterenol, a qual foi administrada via subcutânea em duas aplicações diárias com intervalo de 6 horas entre elas. O (-) isoproterenol (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina composta de NaCl 140mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,86mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,4mM e ácido ascórbico 0,02%. Os animais controle receberam duas aplicações diárias de solução salina proporcional à massa corporal aferida no dia.

No oitavo dia os animais foram heparinizados (Hemofol, Cristália 5000UI) por via intraperitoneal, sacrificados por decaptação e adequadamente preparados para os experimentos posteriores.

### 3.3 ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICAS

Para a obtenção dos parâmetros morfométricos, após o sacrifício o tórax dos animais foi aberto e o coração foi rapidamente dissecado e imediatamente transferido para uma placa “*Petri*” contendo solução salina fisiológica Tyrode gelada (Glicose 5mM, NaCl 135mM, KCl 5,4mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8mM, HEPES 10mM) a 4°C. Após remoção dos vasos da base por excisão e do sangue por seguidas lavagens em solução salina, o coração foi pesado rapidamente em béquer contendo Tyrode gelado. Posteriormente, o ventrículo esquerdo e os átrios foram separados e mensurados. Um dos membros posteriores foi dissecado e após a limpeza de todo o tecido em torno do osso, fez-se as medidas da tíbia.

### 3.4. PREPARO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

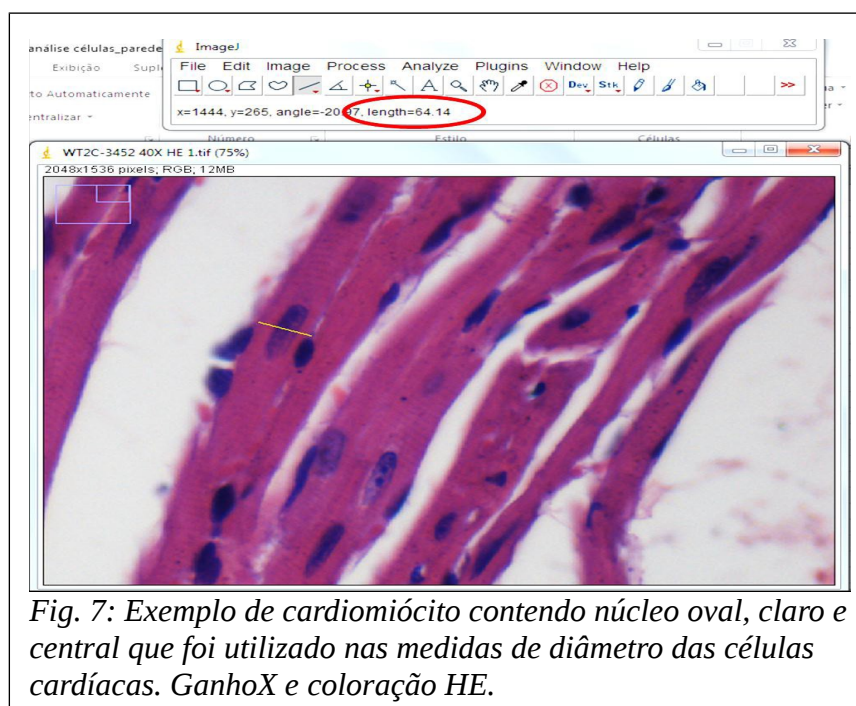
Para o preparo das lâminas para a avaliação morfológica da hipertrofia cardíaca, primeiramente os corações inteiros foram mantidos por 10 minutos em solução fixadora formalina neutra tamponada 10% por tempo suficiente para criar uma resistência superficial e permitir o corte e a separação das câmaras cardíacas em duas metades longitudinais. As partes obtidas foram mantidas por mais 24 horas em solução fixadora. Posteriormente foram lavados em água corrente (3 banhos rápidos), e transferidos para o álcool 70%. As peças foram posteriormente desidratadas em séries crescentes de álcool (70 %, 80%, 90% seguidos de mais 3 banhos de álcool absoluto) por meia hora cada, diafanizadas em xilol (3 banhos de 20min) e incluídas em parafina (3 banhos à 58 graus por 20 minutos cada).

Os blocos de parafina contendo os corações foram submetidos a microtomia sendo obtidos cortes de 6 µm de espessura para montagem das lâminas. Os tecidos aderidos às laminas foram corados pelo método HE (hematoxilina – eosina) e submetidos à análise morfométrica para medidas das câmaras e paredes musculares em ganho de 20X. Todos os parâmetros foram obtidos na região central do coração (metade do comprimento longitudinal do

órgão), considerando que a espessura da cavidade e parede cardíacas podem variar de acordo com a região escolhida. As análises ocorreram de maneira similar para átrios e ventrículos.

O diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foi mensurado, em ganho de 400X, em dois cortes representativos de cada amostra, tomando-se como referência a medida de 100 cardiomiócitos/animal. Somente cardiomiócitos bem definidos em secções longitudinais, com núcleos claros e em posição central nas fibras tiveram suas medidas aferidas.

As análises foram realizadas com a ajuda do programa *Image J*.



Para identificar áreas de lesões dos corações e o aparecimento de tecido fibroso, uma parte dos cortes obtidos foi corada com tricrômico de Gomori ou tricrômico de Masson, a qual permite visualização de fibras de colágeno (tecido corado em verde por Gomori ou em roxo por Masson). A identificação de regiões de lesão foi feita por imagens capturadas com ganho de 200X e analisadas também através do programa *Image J*. Todas as

imagens foram capturadas através de uma microcâmara Q-color 3 (Olympus) acoplada ao microscópio BX-41 (Olympus). As medidas foram calibradas a partir de uma régua micrométrica fotografada com cada uma das objetivas utilizadas nas morfometrias. Um único examinador foi responsável por todas as análises.

### 3.5 DOSAGEM DE ANP

O ANP foi quantificado no extrato protéico do átrio direito e esquerdo de animais do grupo controle e tratados, utilizando radioimunoensaio de duplo anticorpo (RIE) de acordo com método descrito por Gutkowska e colaboradores em 1987 (Gutkowska et al., 1987). Para esta análise o coração foi dissecado conforme item 3.3, e as câmaras atriais foram homogeneizadas com um politron automático (Euroturrax IKA Labortechnik) em solução de ácido acético (0,1N) contendo inibidores de proteases (PMSF 100mM, EDTA 100mM e pepstatina 1mM). O homogenato resultante foi centrifugado a 18000 rpm por 20 minutos a 4°C e uma alíquota do sobrenadante diluída 3000 vezes em tampão fosfato (NaCl 49 mM, albumina bovina 0,01mM, Triton X100 1%, NaNO<sub>3</sub> 1,17mM, pH 7,4) foi utilizada para a dosagem. Uma curva padrão foi empregada para determinar a concentração de ANP nas amostras em análise.

Para a obtenção da curva de calibração, realizamos a diluição seriada do ANP marcado com iodo radioativo (<sup>125</sup>I - 156pg/ml) em tampão fosfato. Uma parte desta diluição (100 µl) foi transferida para tubos de ensaio (identificados de B a L, **Tabela 1**) onde adicionamos também 100 µl do anticorpo primário (diluição 1:60.000). A solução foi incubada durante 24 horas em geladeira comum (~4°C).

Após este período adicionamos 100 µl do ANP marcado (a 10.000 cpm - contagens por minuto) e os tubos retornaram à geladeira por mais 24 horas. Ao terceiro dia de experimento, acrescentamos 100 µl do anticorpo secundário (diluição 1:10), seguidos de 100 µl de SNC (Soro Normal de Coelho) (diluição

1:30 em tampão fosfato) e deixamos por mais 2 horas de incubação a temperatura ambiente visando a formação dos imunocomplexos. Acrescentamos a cada tubo 0,5ml de polietilenoglicol (massa molecular 15000-2000 Da) a 6,25% em água. Após centrifugarmos esta mistura a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C, retiramos o sobrenadante para a contagem em contador gama (LKB Perkin Elmer). Cada diluição foi lida em triplicata para maior homogeneidade dos resultados.

Além da diluição seriada e dos tubos para a dosagem das amostras, também medimos a atividade (em CPM) de: duplicatas contendo apenas o ANP radioativo (tubo T); de um tubo branco (BK); e de duplicatas contendo todos os reagentes descritos exceto a amostra contendo ANP (**A**). A **tabela 1** apresenta a descrição dos reagentes encontrados em cada um dos tubos deste ensaio.

|                | Tampão | Curva ou Amostra | rANP   | Anticorpo 1° | Anticorpo 2° | SCN    | PEG    |
|----------------|--------|------------------|--------|--------------|--------------|--------|--------|
| <b>T</b>       | -      | -                | 100 µl | -            | -            | -      | -      |
| <b>BK</b>      | 200 µl | -                | 100 µl | -            | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |
| <b>A</b>       | 100 µl | -                | 100 µl | 100 µl       | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |
| <b>B</b>       | -      | 100 µl           | 100 µl | 100 µl       | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |
| <b>C</b>       | -      | 100 µl           | 100 µl | 100 µl       | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |
| ...            | -      | 100 µl           | 100 µl | 100 µl       | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |
| <b>L</b>       | -      | 100 µl           | 100 µl | 100 µl       | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |
| <b>Amostra</b> | -      | 100 µl           | 100 µl | 100 µl       | 100 µl       | 100 µl | 500 µl |

*Tabela 1: Composição dos tubos utilizados na dosagem de ANP por RIE. Os tubos numerados de B a L foram usados na diluição seriada para a quantificação das amostras.*

### 3.6 MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CANAIS PARA CÁLCIO

A expressão de canais para cálcio (tipo T e L) foi medida no ventrículo esquerdo de cinco animais de cada grupo através da técnica de Western Blot. Após lavagens consecutivas do ventrículo esquerdo em TBS (Tris-base 16mM, NaCl 136mM, pH 7,6) a 4°C amostras do tecido foram homogeneizadas com solução de lise (Trizima 65mM, NaCl 154mM, 0,25% de Na-deoxicolato a 10%, MP40 1%, 1% de EDTA 100mM e 0,1% de SDS a 10% contendo inibidores de protease (Sigma-Fast, Sigma) na concentração de 0,0016g/mL. O procedimento foi conduzido em banho de gelo com auxílio de um homogeneizador tipo Potter.

Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 3.600g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C para posterior utilização. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Lowry em 1951 (Lowry et al., 1951).

Amostras do extrato protéico dos tecidos, foram diluídas com o tampão da amostra (4X tris-HCl/SDS, pH 6.8, glicerol 3%, SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.6% e azul de bromofenol 1%) na proporção de 1:3 v/v. Alíquotas desta solução contendo 50 $\mu$ g de proteína foram aplicadas na eletroforese.

A eletroforese foi realizada conforme descrito por Laemmli em 1970 (Laemmli, 1970) utilizando um mini sistema de eletroforese (Bio-Rad) com placas de 10 cm de comprimento por 8,2 cm de largura.

O gel de separação (7%) foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bis-acrilamida em água (49,5% T e 3% C), contendo 0,1 % de SDS p/v, 0,033% de persulfato de amônio p/v, 0,033% de TEMED v/v e 1,0 M de Tris-HCl pH 8,45.

O gel de concentração foi preparado a 4 % a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo as mesmas proporções de SDS, TEMED e persulfato de amônio do gel de separação.



A eletroforese foi conduzida a uma diferença de potencial de 90 V por 90 minutos e após a separação por massa molecular as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (Milipore, USA) com poro de 0.45 $\mu$ m (100 V por 120 min). Ao fim deste processo a membrana foi corada com solução de Ponceu (0.3%) para verificar a eficiência da transferência. Após a lavagem da membrana com TBS-tween (solução TBS adicionada de Tween-20 0.3%) até o desaparecimento de todo corante esta foi incubada em solução de bloqueio (TBS-Tween 0.1% e leite em pó Molico desnatado 2.5%) por uma hora. O excesso de solução de bloqueio foi lavado com TBS-Tween anteriormente à adição da solução contendo o anticorpo primário específico (diluído em TBS, leite 0,2% e albumina bovina 2%) para canal T ou para canal L (MiliPore). Após 3 horas de reação com o anticorpo primário, o excesso de anticorpo foi lavado com TBS-Tween e a membrana foi exposta à solução contendo o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por duas horas (anticorpo diluído em TBS adicionado de 1% leite) (Santa Cruz). O excesso de anticorpo foi novamente lavado em solução salina e a visualização das bandas protéicas de interesse foi feita através da sensibilização de um filme fotográfico por quimioluminescência após a exposição da membrana à solução Luminata Forte (Milipore). A análise das imagens foi realizada através do programa *ImageJ*.

### **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS**

Os resultados dos parâmetros morfométricos dos grupos controle e tratados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e comparados através *teste-T* de student através do programa Excel (Microsoft).

Para estas análises assumimos que a variância entre os grupos é homogênia (homocedástica) e a distribuição de probabilidade bicaudal. O nível de significância adotado foi  $\alpha=0,05$ .

### **3.8 ANÁLISE PROTEÔMICA**

Para a análise proteômica comparativa do ventrículo esquerdo de animais dos grupos dos experimentais, o coração dos animais foi rapidamente removido, e lavado com solução salina (4X) e posterior lavagem com água milli Q a 4°C. O excesso de solução de lavagem foi removido por contato com papel de filtro. Em seguida, os átrios e tecidos adjacentes foram removidos e a massa restante do coração (ventrículos) foi rapidamente mensurada. O ventrículo esquerdo (VE) foi separado do direito, pesado e alocado em criotubo, o qual foi imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80°C até o momento da análise.

#### **3.8.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO DOS VENTRÍCULOS ESQUERDOS**

Para a extração das proteínas do ventrículo esquerdo de animais dos grupos controle e tratado foi utilizada a metodologia descrita por Burniston em 2009 (Burniston, 2009), com algumas modificações. Alíquotas de aproximadamente 100mg de tecido do ventrículo esquerdo de três animais de cada grupo foram pulverizadas utilizando-se grau e pistilo de porcelana sob atmosfera de nitrogênio líquido. Ao pó resultante foi adicionado tampão de lise (8M de uréia, 2M de tiouréia, 40mM de Tris, 4% (p/v) de CHAPS 0,2% de anfólitos e 1% (v/v) de coquetel inibidor de proteases na proporção de 1:12 (p/v). Posteriormente, o material foi submetido à sonicação (3 ciclos de 15 segundos, 15 Hz, com intervalos de 1 minuto, em banho de gelo) usando um sonicador ultrassônico. Para remoção do material insolúvel do lisado celular, o homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 45 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram alíquotados e armazenados a -80°C para posterior análise. O conteúdo protéico das amostras foi determinado utilizando o kit de dosagem de proteína 2-D Quant Kit, conforme especificações do fabricante.

### **3.8.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)**

As amostras protéicas do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos controle e tratado foram submetidas à eletroforese bidimensional. Foram obtidos seis géis (3 para cada grupo experimental cada um correspondendo a um animal diferente).

### **3.8.3 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (PRIMEIRA DIMENSÃO)**

Amostras de 1000 µg de proteínas solúveis (obtidas conforme o item 3.8.1) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, para um volume final de 350 µL. As soluções resultantes foram transferidas para uma bandeja de reidratação, e sobre estas foram colocadas as IPG strips desidratadas (17 cm, pH 3-10 não linear) durante 30 minutos. Posteriormente as IPG strips carregadas com as amostras foram alocadas adequadamente no sistema IEFCell (Bio-Rad) a 20°C com corrente máxima de 50 mA/gel. A programação utilizada foi: reidratação ativa (50 V por 12 horas a 20°C) e focalização isoeletrica (1ª etapa: 300 V por 3 horas; 2ª etapa: aumento gradual da voltagem, por rampa rápida, até 10.000 V em 2 horas; 3ª etapa: acúmulo de 60.000 Vh; 4ª etapa: 500 V por 5 horas), seguindo especificação do fabricante para strips de 17 cm.

### **3.8.4 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DAS PROTEÍNAS ELETROFOCALIZADAS**

As proteínas eletrofocalizadas nas IPG strips foram reduzidas e alquiladas. Esse processo foi realizado pela incubação seqüenciada das strips com: DTT (10 mg/mL), e posteriormente iodoacetamida (25 mg/mL), em tampão de equilíbrio (50 mM Tris- HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) por 15 minutos cada à temperatura ambiente.

### **3.8.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SEGUNDA DIMENSÃO)**

A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE, utilizando o sistema Protean II XL (Bio-Rad) e seguindo o método descrito por Laemmli (1970). As IPG strips contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para a superfície do gel de poliacrilamida (12%), as quais foram seladas com solução de agarose 0,5% preparada no tampão de corrida (tampão Tris/Glicina/SDS, pH 8,8). A eletroforese foi conduzida a 16 mA/gel por 30 minutos e, em seguida, a 24 mA/gel até o término da corrida. Decorrido o tempo da eletroforese, o gel foi retirado da placa e submetido à coloração pelo método Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) de acordo com Neuhoff e colaboradores em 1988 (Neuhoff et al., 1988) com algumas modificações. Inicialmente o gel foi incubado três vezes (30 minutos cada) com solução 2% de ácido ortofosfórico em etanol 30%, em seguida lavado três vezes (10 minutos cada) com solução 2% de ácido ortofosfórico. Posteriormente o gel foi incubado por 30 minutos em solução ácido ortofosfórico/sulfato de amônio/etanol (2%:12%:18%), e em seguida corado durante 5 dias pela adição de Coomassie G-250 na solução acima para concentração final 0,01% do corante. O excesso do corante foi removido do gel com solução de etanol 20%.

### 3.8.6 AQUISIÇÃO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS IMAGENS

Para obtenção das imagens, os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando scanner ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) no modo de transmissão calibrado. Foram obtidos três géis bidimensionais para cada um dos grupos, perfazendo um total de seis imagens. As imagens foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05 (GE Healthcare Life Sciences). A autenticidade de cada spot foi validada por inspeção visual e editada quando necessário.

Após normalização da intensidade de cada spot em % do volume total dos spots, utilizando a equação descrita abaixo, foram realizadas as análises quantitativas para a identificação de spots com diferença de expressão protéica.

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100$$

- $Vol$  = área da base do pico do spot (a 75% do cume) x intensidade do spot
- $Vol_s$  é o volume do spot  $s$  em um gel contendo  $n$  spots

### **3.8.7 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE OS GRUPOS**

#### **3.8.7.1 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS, EXTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E ANÁLISE POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS**

As frações dos géis contendo os spots de interesse, selecionados conforme item acima, foram manualmente removidas do gel, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico, e descoradas por 3 lavagens de 15 minutos com 400  $\mu\text{L}$  de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0, sob agitação. Após a remoção da solução descorante, as frações dos géis foram tratadas com 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, até a opacificação do gel. Em seguida este solvente foi removido da amostra por concentrador a vácuo (Concentrador Plus, Eppendorf). As frações foram reidratadas com 10  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina (Golden) e mantidas por 30 minutos em banho de gelo para incorporação da solução. Para manter as frações úmidas durante a hidrólise triptica, 20  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados, e a mistura foi incubada por 14 horas a 37°C.

Em seguida, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e as frações do gel foram submetidas a duas lavagens sucessivas com 30  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (30 minutos cada, sob agitação), para completa remoção dos fragmentos tripticos. As soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido até aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ , por concentração a vácuo. Posteriormente, as amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Os fragmentos da hidrólise enzimática foram eluídos da resina com 6  $\mu\text{L}$  de solução 50% de acetonitrila, TFA contendo 0,1% de TFA (Vergote et al., 2005). Como controle negativo e positivo para as análises, foram utilizados, respectivamente, uma fração do gel destituída de spot protéico e o spot protéico correspondente à albumina bovina (BSA) do padrão de peso molecular. Alíquotas de 0,5 e 1,0  $\mu\text{L}$

de cada solução dos fragmentos trípticos dessalinizados foram aplicadas em placa anchorship 600 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e em seguida co-cristalizadas com 0,25  $\mu$ L de solução saturada da matriz 5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70%/TFA 0,1%) à temperatura ambiente. Os espectros de massas foram obtidos em sistema MALDI-TOF/TOF - Autoflex III TM, softwares FlexControlTM e FlexAnalysisTM (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA), operando no modo positivo/refletor. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de peptídeos Peptide Calibration Standard II (bradicinina  $m/z = 757,39$ ; angiotensina II  $m/z = 1046,54$ ; angiotensina I  $m/z = 1296,68$ ; substância P  $m/z = 1347,73$ ; bombesina  $m/z = 1619,82$ ; substrato da renina  $m/z = 1758,93$ ; ACTH (1-17)  $m/z = 2093,08$ ; ACTH (18- 39)  $m/z = 2465,19$ ; e somatostatina (28)  $m/z = 3147,47$ ) da Bruker Daltonics, Bilerica (EUA). Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS. As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Núcleo de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

### 3.8.7.2 PESQUISA EM BANCO DE DADOS

Os espectros de massas obtidos de cada spot protéico (MS e MS/MS) foram combinados pelo software BioTools (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) e posteriormente investigados nos bancos de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante (NCBI), por meio do software MASCOT® ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Os parâmetros de busca utilizados no MASCOT® foram: *Mus* como taxonomia; peptídeos trípticos com ausência de um único fragmento; ausência de restrições no peso molecular da proteína; oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente; valores de massa monoisotópica; carga do peptídeo 1<sup>+</sup>; e tolerância de 0,8 Da na massa do MS e do MS/MS. Score global do MASCOT® correspondente à significância estatística de  $\alpha < 0,05$  foi utilizado para validação da identificação das proteínas, quando estas apresentavam homologia com *Mus musculus*. A categorização funcional das proteínas identificadas foi realizada por meio das anotações dos processos biológicos e funções moleculares obtidas nos bancos de dados do “Gene Ontology” (GO) e PANTHER (Thomas et al., 2003) para *Mus musculus*.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS EXPERIMENTOS DE PROTEÔMICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise de fatores para determinação dos grupos foi realizada com auxílio do software Image Master 2D Platinum v 7.05, utilizando os seis géis como fatores. Os valores de volume normalizado dos spots dos grupos controle e tratado foram analisados por meio de teste t não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .



Resultados



## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 INDUÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA

#### 4.1.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

Para determinarmos se o protocolo experimental proposto (tratamento com isoproterenol) foi efetivo em induzir a hipertrofia, realizamos aferições de estruturas que poderiam ser influenciadas pelo tratamento. Foram medidas a massa do coração, massa do ventrículo esquerdo e a massa total dos átrios, nos dois grupos de animais (tratado e controle). Os dados foram sintetizados na **figura 8**.

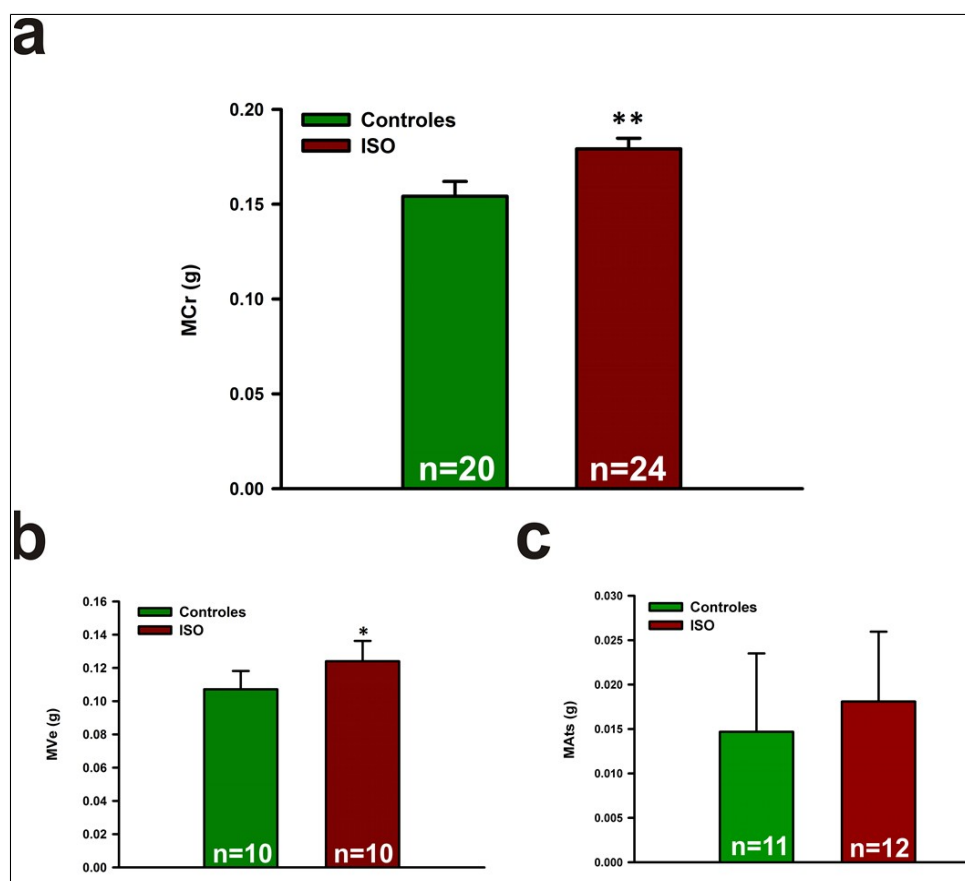
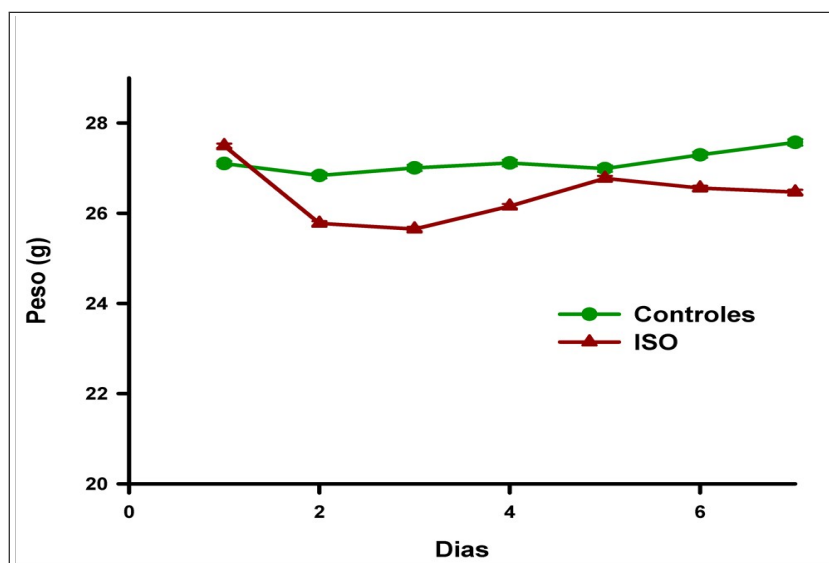


Fig. 8: Valores absolutos obtidos para (a) massa do coração; (b) ventrículo esquerdo; e (c) dos átrios de animais do grupo controle (verde) e tratado (vermelho). MCr = massa do coração(g); MVe = massa do ventrículo esquerdo(g); MAts = massa dos átrios(g). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$

Posteriormente, buscamos por correlações que nos permitissem comparar amplamente os indivíduos de cada grupo de forma a entender os parâmetros que são influenciados pela perturbação provocada no sistema. Para alcançarmos este objetivo, inicialmente correlacionamos os parâmetros de interesse com aqueles que sabidamente não são influenciados pelo tratamento. As aferições utilizadas nesta análise foram realizadas durante os sete dias de tratamento e também após o sacrifício. As estruturas de nosso interesse consistiram na massa do coração, massa do ventrículo esquerdo e a massa total dos átrios; enquanto as estruturas utilizadas como padrões foram massa corpórea e tamanho da tibia. A massa corpórea, como demonstrado pela **figura 9** não foi significativamente alterada pelo tratamento.



*Fig. 9: Variação da massa corporal dos animais ao longo do tratamento com isoproterenol (vermelho) e solução salina (verde). Não houveram diferenças significativas entre os dois grupos (n=30).*

A partir da comparação entre as estruturas de interesse e as estruturas invariáveis obtivemos as seguintes correlações que nos permitiram analisar o crescimento cardíaco relativo como demonstrado na **figura 10**:

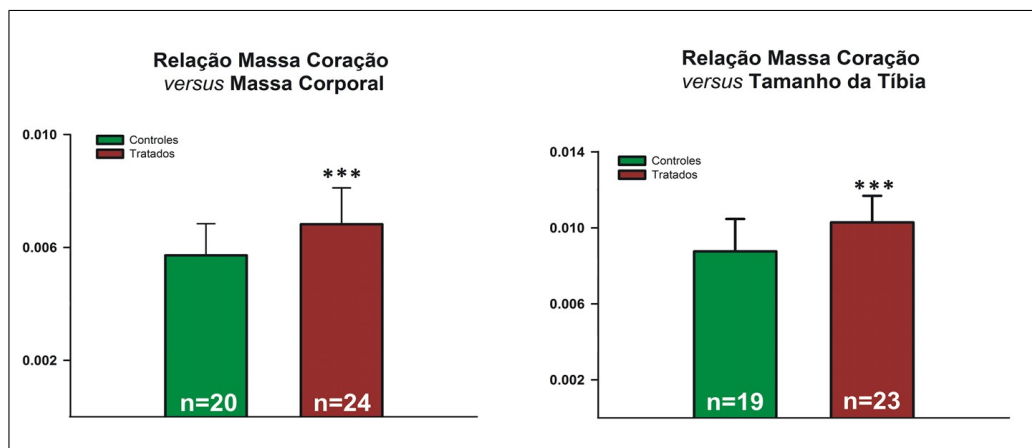


Fig. 10: Correlações obtidas para os grupos controle e tratado da massa do coração vs massa corporal (a) e da massa do coração vs tamanho da tíbia (b)

Além destes parâmetros, também verificamos o crescimento do ventrículo esquerdo a partir da correlação desta estrutura com a massa corporal, massa do coração e com o tamanho da tíbia (**Fig. 11**).

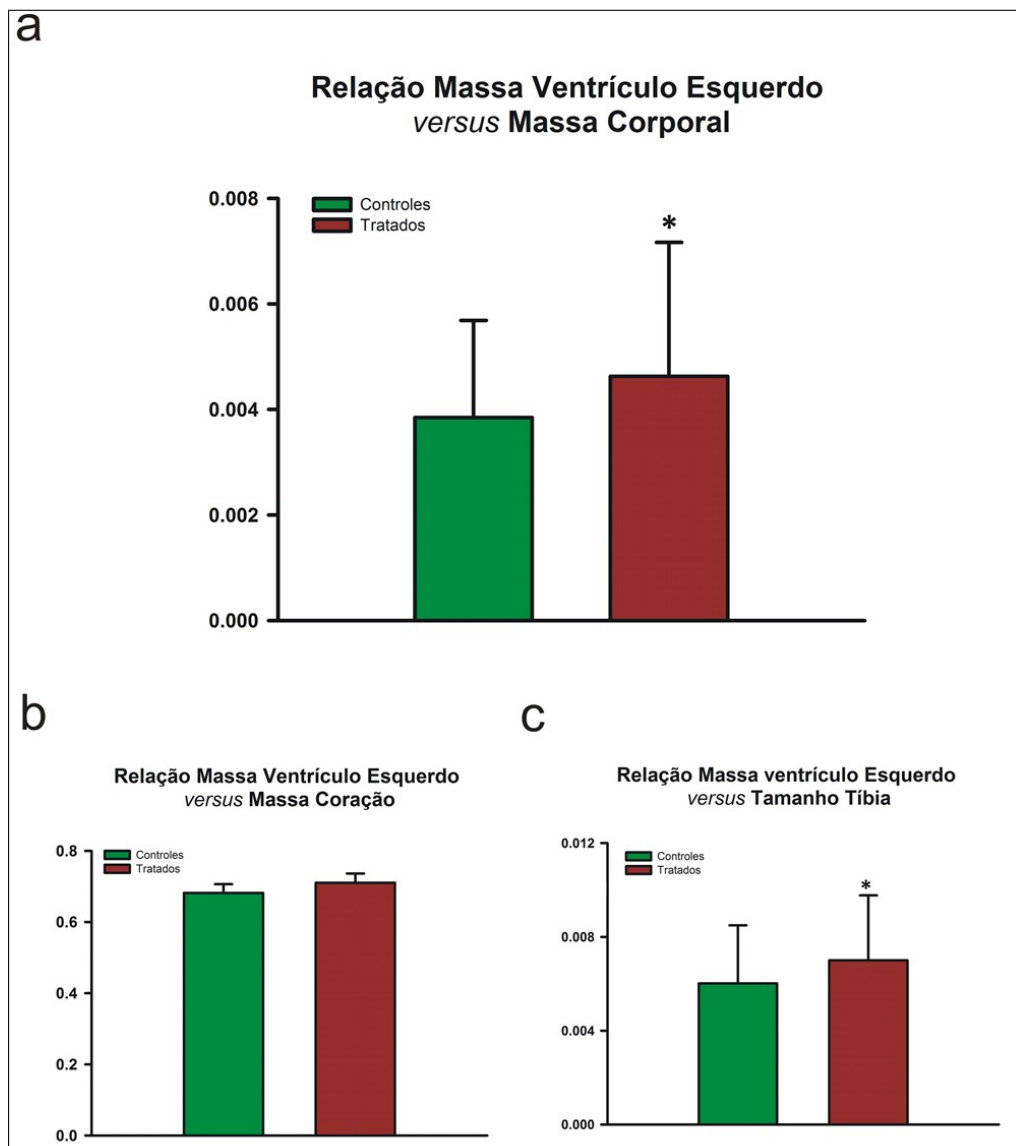


Fig. 11: Relação morfométrica entre a massa do ventrículo esquerdo e (a) massa do corporal; (b) massa do coração; e (c) tamanho da tibia. Os dados mostram que o aumento em massa do coração não é percebido quando comparado com a massa total do coração. \* $p < 0,05$

Visto que as células que compõem os átrios são responsáveis pela produção e armazenamento da maior parte do ANP (a **Fig. 12** apresenta o resultado da dosagem de ANP nos átrios, onde houve um aumento significativo na produção de ANP nos animais tratados com isoproterenol, corroborando com a literatura existente) e BNP durante os processos hipertróficos patológicos, nos questionamos também se estas

estruturas passariam por um remodelamento morfológico. Os dados foram sintetizados na **tabela 2** a seguir:

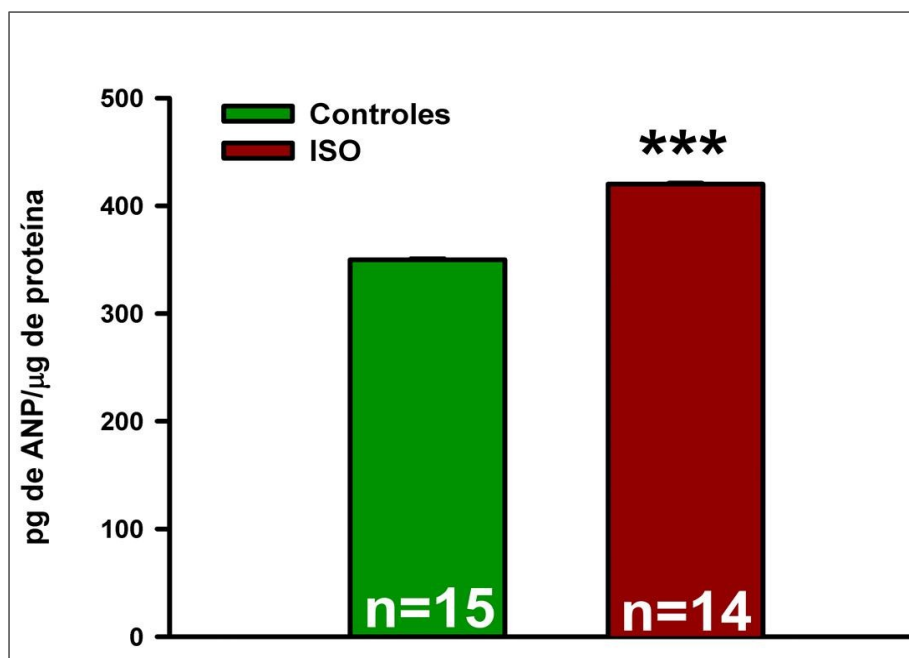


Fig. 12: Dosagem do ANP presente nos átrios de animais do grupo controle e tratado por RIE. \*\*\* $p < 0,00001$

|               | Controle          | Tratado          |
|---------------|-------------------|------------------|
| <b>Média</b>  | 0,00146 +- 0,0088 | 0,0180 +- 0,078  |
| <b>MA/Mcp</b> | 0,0005 +- 0,0018  | 0,0006 +- 0,0015 |
| <b>MA/MCr</b> | 0,0986 +- 0,0243  | 0,1053 +- 0,0192 |
| <b>MA/TTb</b> | 0,0008 +- 0,0021  | 0,0010 +- 0,0019 |

Tabela 2: Correlações obtivas a partir das massas dos átrios quando comparadas às massas corpóreas, do coração e ao tamanho da tíbia. MA = massa dos átrios(g); MCp = massa corpórea (g); MCr = massa do coração (g); TTb = tamanho da tíbia (mm).

Diversos autores argumentam que a hipertrofia cardíaca é dada unicamente pela proliferação do tecido fibroso intersticial e pelo crescimento em largura e diâmetro das células, uma vez que as células cardíacas, extremamente ativas, não poderiam se multiplicar. Entretanto, ao realizarmos uma busca mais cuidadosa da literatura, encontramos

autores que defendem que a hipertrofia cardíaca patológica é também uma consequência do aumento em número do miócitos cardíacos. Para verificar estas divergências, realizamos a mensuração do diâmetro das células em cada grupo (**Fig. 13**) e também a contagem manual das células cardíacas (**Figura 14**):

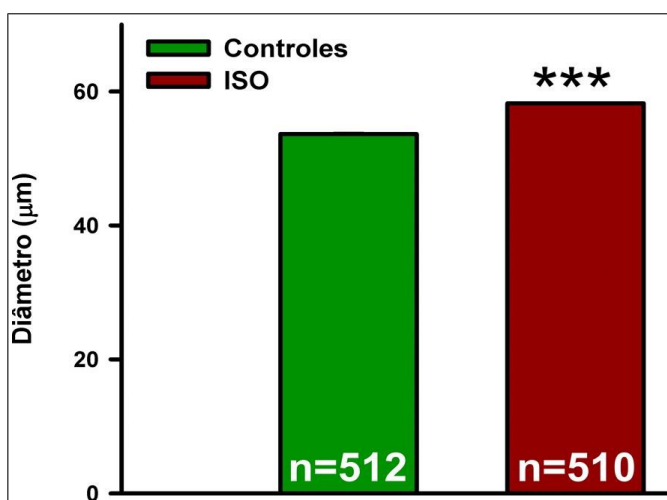


Fig. 13: Diâmetro aferido das células cardíacas em animais do grupo controle (verde) e em animais do grupo tratado (vermelho). \*\*\*\*p<0,00001

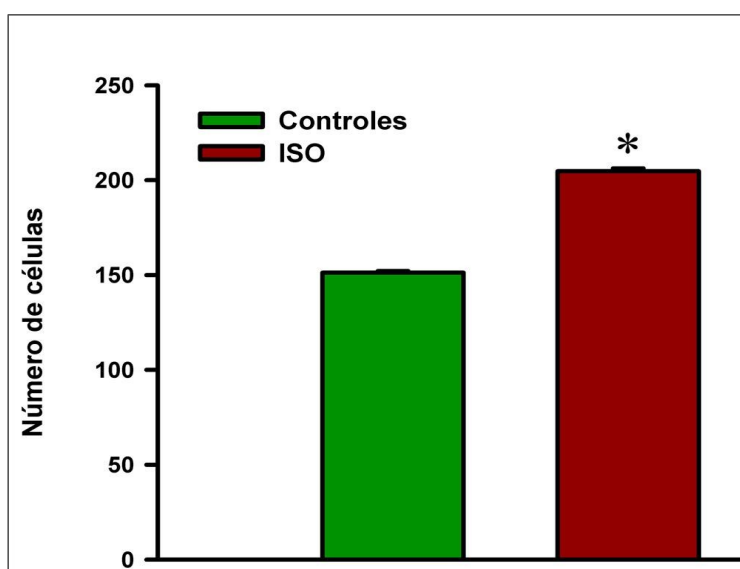
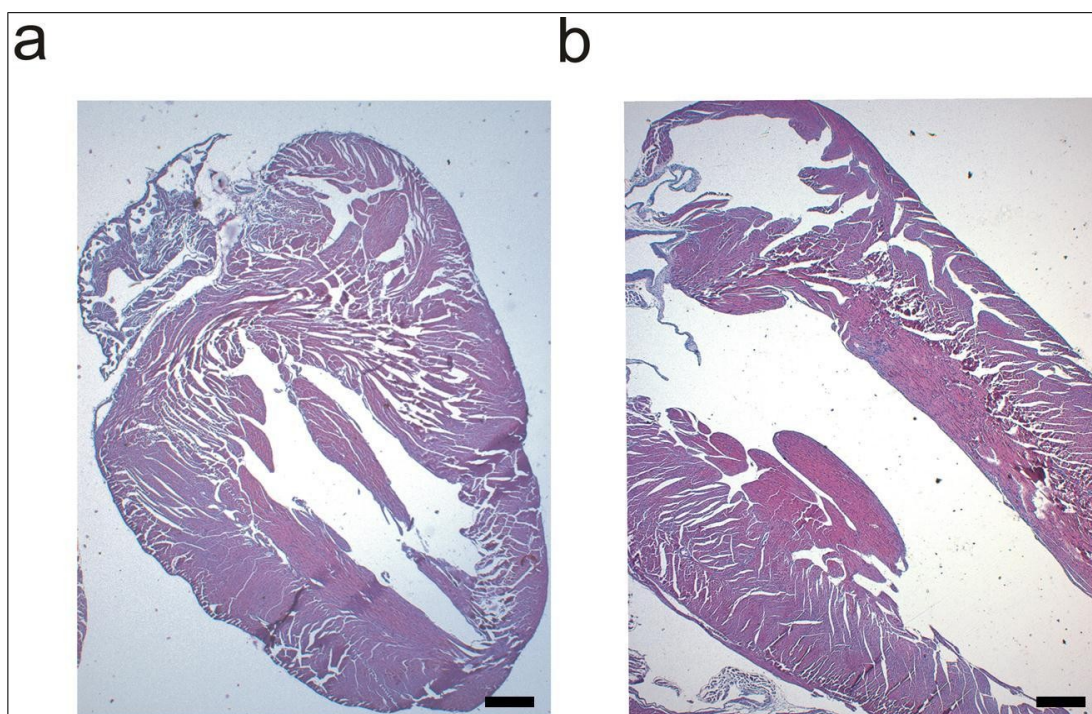


Fig. 14: Contagem dos miócitos cardíacos nos grupos controle e tratado em um total de 40 micrografias para cada grupo (ganho 400X). \*p<0,05

## 4.2 PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS

Diversos parâmetros foram avaliados a partir das lâminas histológicas dos tecidos de animais que integraram ambos os grupos deste estudo. Inicialmente, a observação do tecido cardíaco dos animais do grupo tratado poderia indicar que houve crescimento longitudinal deste órgão (**Fig. 15**). Entretanto, uma avaliação mais detalhada mostra que este parâmetro não diferiu significativamente dos animais do grupo controle (**Tabela 3**).



*Fig. 15: Micrografia representativa do tecido cardíaco de um animal controle (a) e de um animal tratado (b). Ganho 20X e coloração HE. A barra horizontal corresponde a 650  $\mu$ m.*



|      | Controle     | Tratado      |
|------|--------------|--------------|
| EPVE | 385 +- 2,47  | 575 +- 2,24* |
| DVE  | 429 +- 1,81  | 416 +- 1,1   |
| DA   | 236 +- 2,08  | 238 +- 2,02  |
| TC   | 1710 +- 2,86 | 1902 +- 2,44 |

Tabela 3: Análise do tamanho do coração (TC); da espessura do ventrículo esquerdo (VE); do diâmetro do ventrículo esquerdo (DVE); e do diâmetro dos átrios (DA) a partir das micrografias dos corações de indivíduos de ambos os grupos (tratado e controle). \* $p < 0,05$

Outro parâmetro morfométrico de grande importância para a constatação do processo hipertrófico patológico, a substituição do tecido cardíaco por tecido fibroso, também foi verificado por nós através do estudo das lâminas histológicas em coloração Tricrômico de Gomori. A **figura 16** apresenta uma lâmina representativa de cada grupo sendo que somente podemos visualizar regiões mais claras relativas ao tecido fibroso intersticial nos animais tratados com isoproterenol.

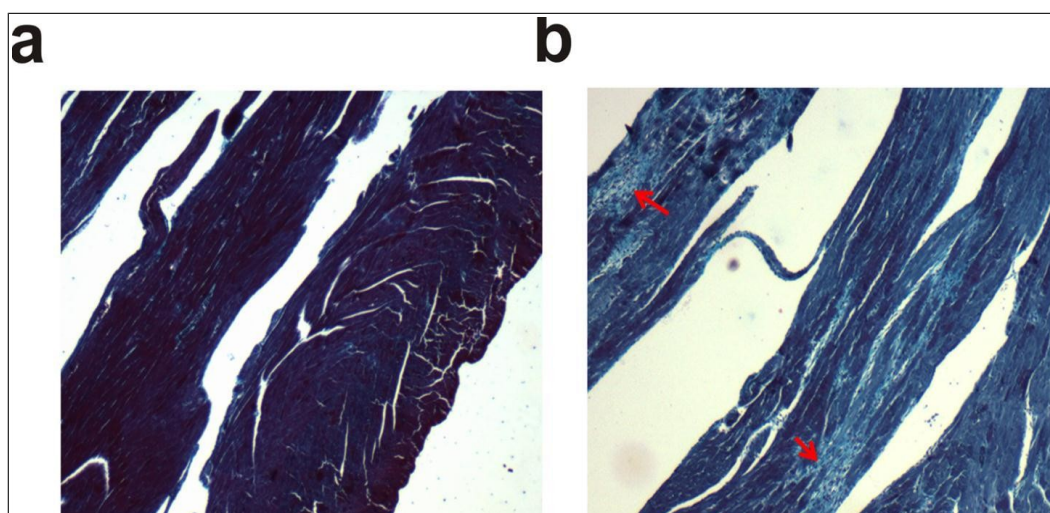
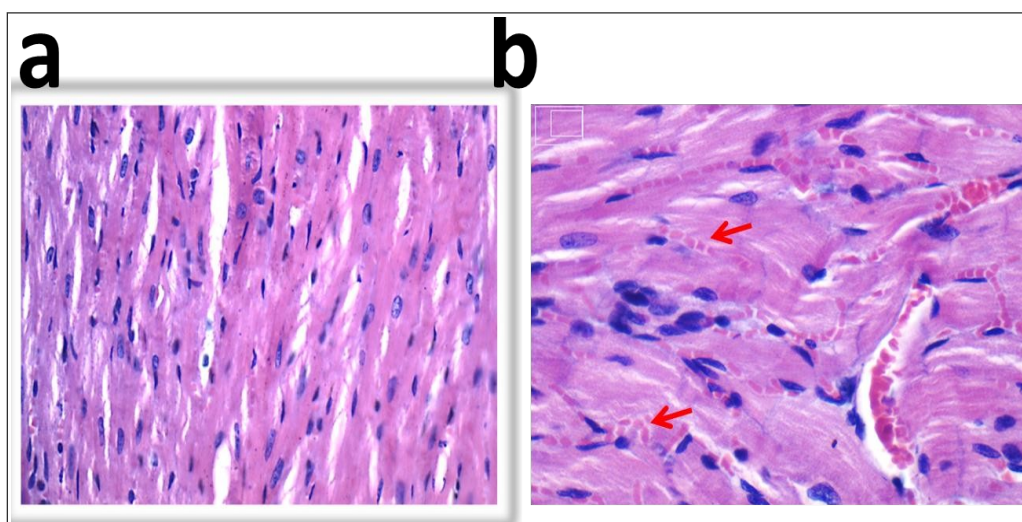


Fig. 16: Micrografias do tecido cardíaco de animais do grupo controle (a) e tratados com isoproterenol (b). As setas vermelhas indicam a presença de tecido fibroso entre as células musculares cardíacas. Ganho 200X e coloração com tricrômico de Gomori.

Além da fibrose no tecido cardíaco, também observamos que nos animais submetidos ao tratamento com isoproterenol células do sistema circulatório encontravam-se fora dos vasos sanguíneos permeando as fibras contráteis do coração (**Fig. 17**). Essa evidência nos instigou a investigar se as células sanguíneas encontradas faziam parte de um infiltrado inflamatório no tecido destes animais. Entretanto, até o presente momento não obtivemos os resultados definitivos para provar nossa hipótese.



*Fig. 17: Células sanguíneas (indicado pelas setas vermelhas) encontradas fora dos vasos e entre as fibras musculares cardíacas. Ganho 400X e coloração HE.*

#### **4.3 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DOS CANAIS PARA CÁLCIO DO TIPO T E L POR WESTERN BLOT**

Para averiguar nossa hipótese de que os canais para cálcio dependentes de voltagem são essenciais no processo hipertrófico patológico, também realizamos experimentos de Western Blot de forma a comparar os níveis protéicos deste canal existentes no tecido cardíaco dos animais de cada grupo. Nossos resultados demonstram que não houveram diferenças significativas (**Fig. 18**). Nosso grupo deu início a outros experimentos para investigar se o número de moléculas de mRNA

(RNA mensageiro) teria sido afetada pelo tratamento, entretanto os resultados ainda não haviam sido analisados até a presente data.

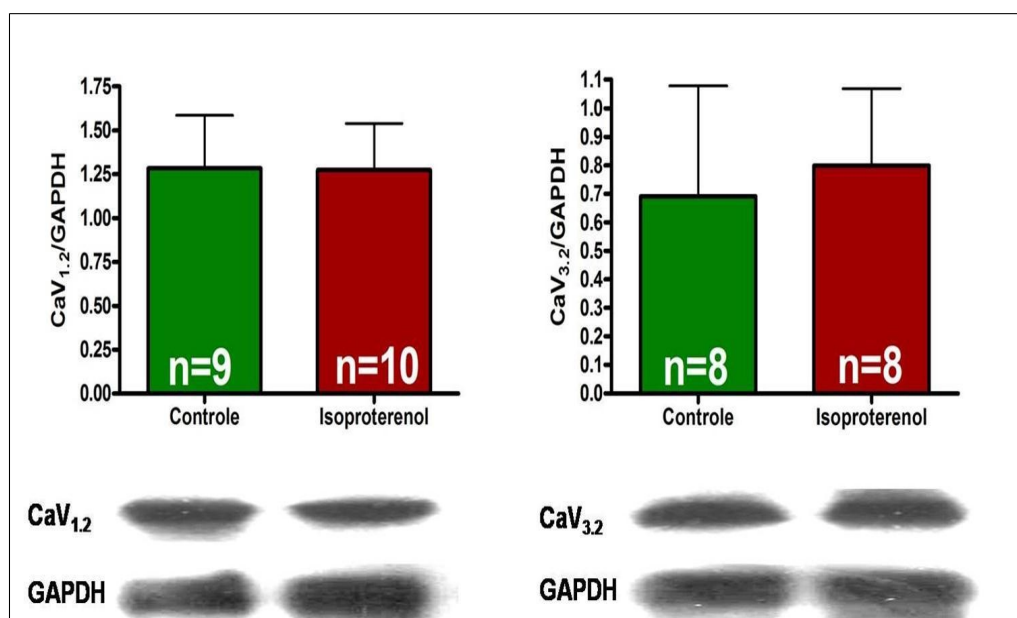


Fig. 18: Expressão protéica de canais para cálcio do tipo T e L em animais controle (verde) e tratados com isoproterenol (vermelho). n=5

#### 4.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

##### 4.4.1 ANÁLISE COMPARATIVA DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS DOS EXTRATOS PROTÉICOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Foram produzimos 6 géis bidimensionais para a análise proteômica comparativa do VE dos grupos analisados (**Figura 19**), sendo correspondente ao extrato obtido de três animais de cada grupo. Alíquotas de 1000 µg foram eletrofocalizadas e posteriormente resolvidas em gel SDS-PAGE 12%. A análise das imagens dos géis pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05, detectou aproximadamente 743 spots protéicos por gel no grupo controle e 512 spots no grupo tratado.

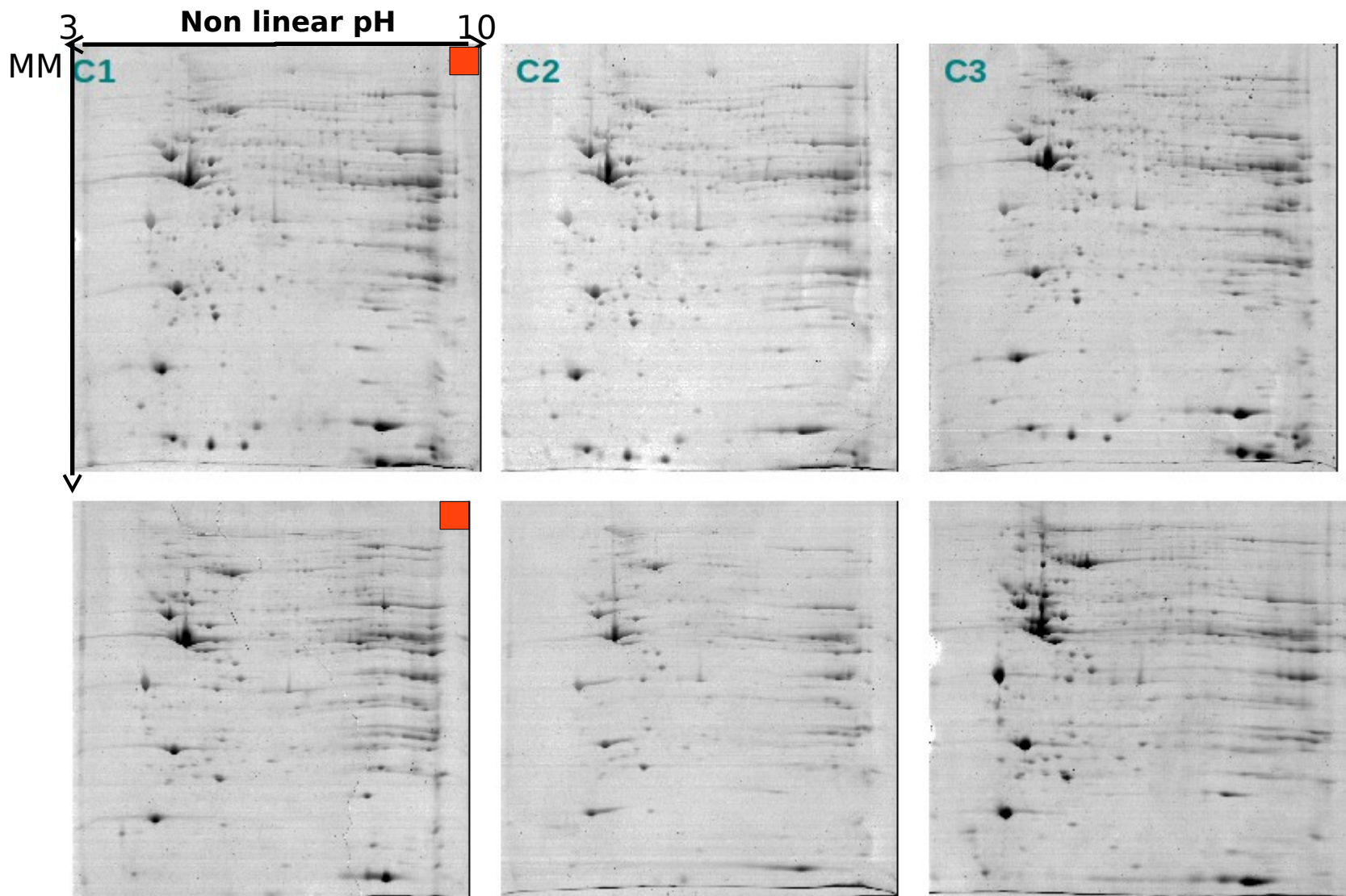


Fig. 19: Perfil protéico de amostras de ventrículos esquerdos dos animais dos grupos controle e tratado. Alíquotas de 1000  $\mu\text{g}$  de proteínas foram focalizadas em “IPG strip” pI 3-10 não linear (NL) de 17cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando-se SDS-PAGE 12%. À esquerda dos géis encontram-se os valores que representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão. (■) Imagens de referência.

A reprodutibilidade dos géis em relação ao número total, posição relativa e intensidade dos spots protéicos, dentro de cada grupo foi avaliada pela análise de correlação em teste de regressão linear. Os resultados desta análise (**Tabela 4**) mostram que os géis obtidos apresentam uma alta reprodutibilidade dentro de cada grupo.

| Relação entre os géis | Equação          | Coefficiente de correlação | Número de "Match" |
|-----------------------|------------------|----------------------------|-------------------|
| T6 e T7               | $1,09*x-0,0741$  | 0,983                      | 261               |
| T6 e T11              | $1,14*x-0,0412$  | 0,891                      | 355               |
| C1 e C2               | $0,863*x+0,0118$ | 0,937                      | 603               |
| C1 e C3               | $0,927*x+0,0186$ | 0,938                      | 592               |

*Tabela 4: Análise de reprodutibilidade dos géis (intragrupo). Cada gel foi relacionado com a imagem de referência do respectivo grupo. T6, T7 e T11 = animais do grupo tratado; C1, C2 e C3 = animais do grupo controle.*

A análise de fatores (**Figura 20**) foi utilizada como ferramenta para a delimitação dos grupos a partir das imagens obtidas dos géis. Nesta figura, os géis são representados pelos vetores em azul e os matchs são representados pelas cruces vermelhas. A proximidade entre os vetores indica que estes, provavelmente, pertencem ao mesmo grupo ou população. A distância entre vetores e, principalmente, seu posicionamento em quadrantes distintos, indica maior probabilidade de diferença entre esses vetores (géis). Como mostra a **figura 20**, as linhas representativas dos géis das amostras dos grupos controle e tratado agrupam-se em quadrantes diferentes, o que demonstra que há maior probabilidade de diferença no perfil protéico destas amostras.

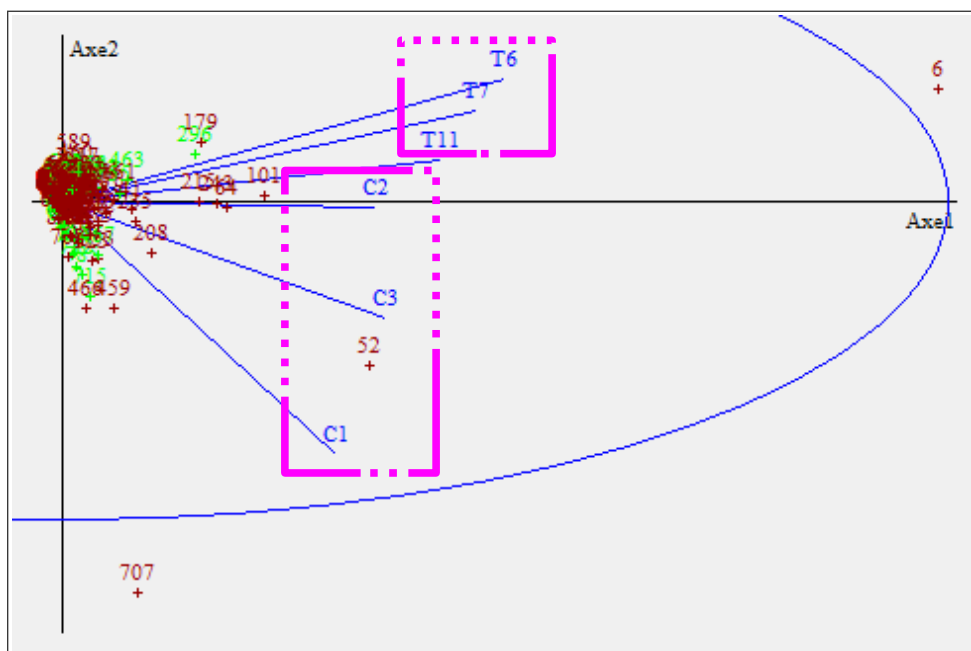


Fig. 20: Gráfico de análise de fatores onde há a projeção dos géis analisados para o delineamento dos grupos experimentais.

Após as análises pelo software, autenticação por inspeção visual, e normalização dos volumes dos spots, foi realizada a análise quantitativa comparativa. Obtivemos 131 spots que apresentaram diferença de volume significativa entre os grupos. Dentre eles, 24 estavam mais expressos e 15 menos expressos no grupo tratado quando comparados aos spots do grupo controle, 87 estavam presentes apenas no grupo controle e 5 apenas no grupo tratado. Dentre esses spots, 113 foram retirados dos géis e preparados para a identificação protéica.

#### 4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Dentre os 113 spots com diferença de expressão que foram obtidos dos géis, 25 foram identificados (22,12%) utilizando os espectros de massas MS e MS/MS. A **figura 21** mostra um esquema

representativo das análises para identificação de um spot protéico de interesse.

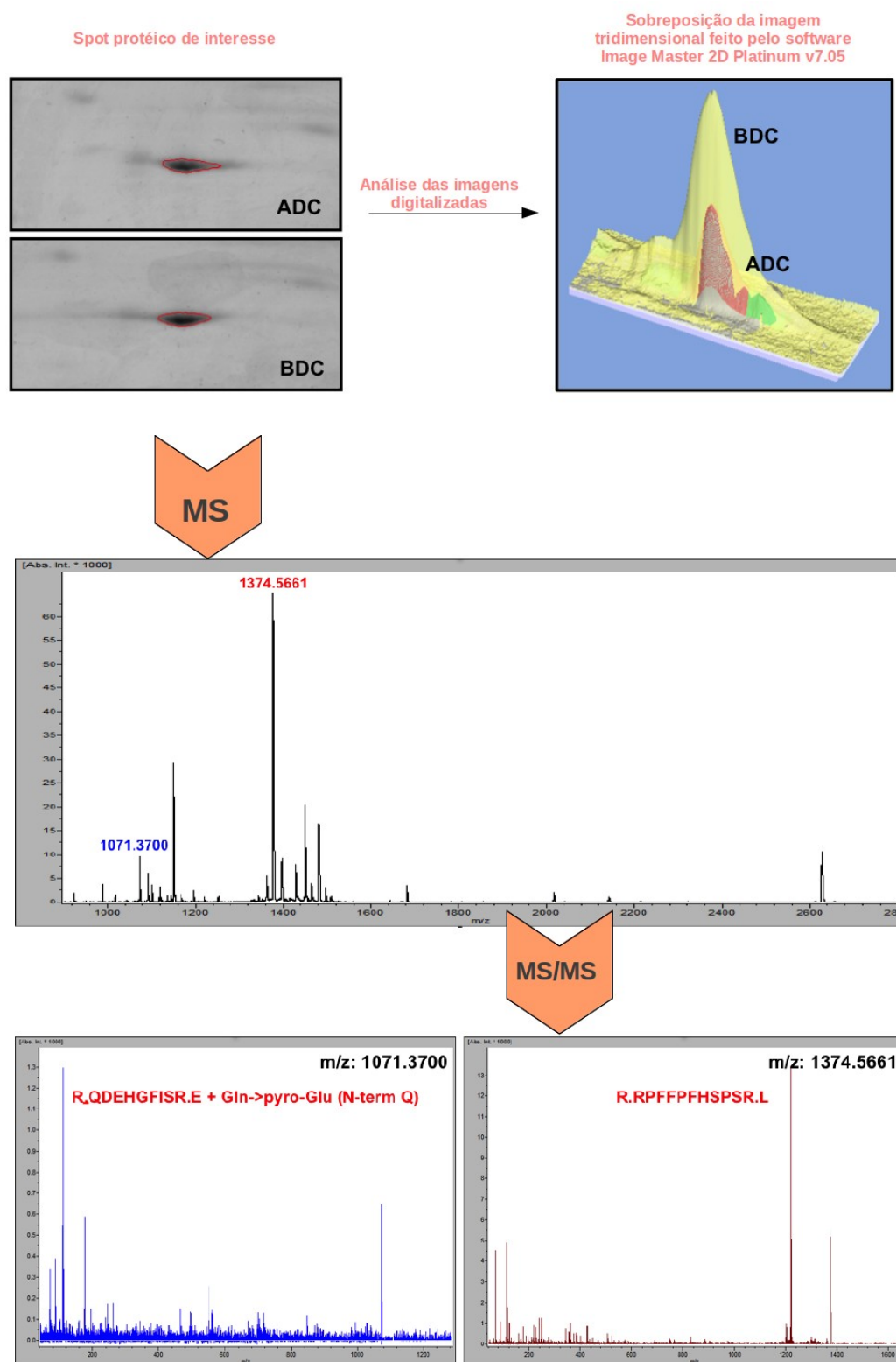


Fig. 21: Figura esquemática mostrando o processo de análise de um spot protéico ( $\alpha$ -B cristalina) entre dois grupos distintos. Imagem gentilmente cedida por Ms. Leonardo Perin do grupo de pesquisa da Prof. Suely Gomes de Figueiredo (UFES)

A **tabela 5** mostra as proteínas identificadas. A classificação funcional das proteínas identificadas foi feita a partir das anotações de dois bancos de dados: GENE Ontology (<http://www.geneontology.org/>) e PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). As proteínas identificadas (**Tabela 6**) pertencem a várias classes funcionais, incluindo metabolismo (carboidratos, lipídeos e fosforilação oxidativa), resposta ao estresse, contração muscular e estruturais. A **tabela 6** também mostra os dados da análise estatística e da alteração do volume normalizado dos spots protéicos que apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e tratado, além da localização celular, função molecular e os processos biológicos relacionados às proteínas identificadas.



| Spot ID | Protein name  | Access Number | Identified Peptides                                     | % coverage | Mascot score | PI   | MM (Kda) |
|---------|---|---------------|---|------------|--------------|------|----------|
| 258     | desmin  | gi 33563250   | TFGGAPGFSLGSPVFPFR<br>FLEQQNAALAAEVNR<br>INLPIQTFSALNFR | 10         | 96           | 5,21 | 53465    |
| 55      | myoglobin   | gi 21359820   | VEADLAGHGQEVLIQFLK                                      | 11         | 74           | 7,07 | 17059    |
| 715     | unnamed protein product   | gi 51267      | LILTLTHGSVVSTR  | 10         | 111          | 5,67 | 14797    |
| 785     | Chain E, Structure Of Bovine Heart<br>Cytochrome C Oxidase At The Fully<br>Oxidized State | gi 1942990    | SHGSHTDEEFDAR   | 12         | 78           | 5,01 | 12428    |
| 464     | mitochondrial aspartate aminotransferase  | gi 192050     | FVTVQTISGTGALR<br>ILIRPLYSNPPLNGARIAATILTSPDLR          | 9          | 117          | 9,05 | 47723    |
| 540     | alpha-crystallin B chain  | gi 6753530    | RPFPPFHSPSR   | 21         | 51           | 6,76 | 20056    |
| 193     | unnamed protein product   | gi 12834035   | TPYTDVNIIVTIR   | 7          | 134          | 5,7  | 31442    |
| 264     | unnamed protein product   | gi 55291      | ISLPLPTFSSLNLR  | 3          | 59           | 5,09 | 53597    |
| 166     | glyceraldehyde-3-phosphate<br>dehydrogenase   | gi 6679937    | LVINGKPITIFQERD<br>LISWYDNEYGYSNR                       | 8          | 113          | 8,44 | 35787    |
| 712     | cytochrome b-c1 complex subunit 7   | gi 13385726   | RLPEDLYNDR<br>YEEDKFYLEPYLK<br>ITPSYVAFTPEGER           | 20         | 140          | 9,1  | 13553    |
| 304     | 78 kDa glucose-regulated protein  | gi 1304157    | IEIESFFEGEDFSETLTR<br>DNHLLGTFDLTGIPPAPR                | 7          | 99           | 5,09 | 72412    |
| 603     | troponin C, slow skeletal and cardiac<br>muscles  | gi 6678369    | AAVEQLTEEQKNEFK<br>GKSEEELSDLFR                         | 16         | 57           | 4,04 | 18408    |
| 714     | unnamed protein product   | gi 51267      | NTEINFQLGIEFDEVTADDR<br>LILTLTHGSVVSTR                  | 25         | 85           | 5,67 | 14797    |

|     |  |              |   |    |     |      |       |
|-----|--|--------------|---|----|-----|------|-------|
| 292 | alpha-fetoprotein, partial   | gij191765    | VFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLR<br>VAPEEHPTLLTEAPLNPK  | 9  | 110 | 5,47 | 47195 |
| 620 | alpha-actin (aa 40-375)  | gij49864     | GYSFVTTAER<br>YELPDGQVITIGNER   | 13 | 129 | 5,45 | 37788 |
| 731 | Malate dehydrogenase, mitochondrial  | MDHM_MOUSE   | LTLYDIAHTPGVAADLSHIETR  | 6  | 38  | 8,93 | 35589 |
| 740 | Trypsin  | gij136429    | LGEHNIDVLEGNEQFINAAK<br>FHQVRRGMTILFLTMVISYFGCMK  | 8  | 50  | 7    | 24394 |
| 668 | brain-derived neurotrophic factor isoform X1   | gij512860768 | GPGSLAYPGVRTHGALDSVTGPK<br>VRPHEENAKDADLYTSR<br>GQLKQYFYETKCNPMGYTKEGC RGIDK<br>FASEIAGVDDLGTGR | 45 | 82  | 9,21 | 29195 |
| 679 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial                           | NDUS1_MOUSE  | VALIGSPVDLYR<br>ALSEIAGITLPYDTLDQVR   | 6  | 32  | 5,51 | 79726 |
| 649 | Fam171a2 protein   | gij39962952  | KLLELGVKPHPR  | 1  | 16  | 6,75 | 67766 |
| 781 | cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial                                  | gij13385168  | KGFSYLVTTATTTGVVYAAK  | 7  | 72  | 8,91 | 29349 |
| 150 | Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide                                  | gij13097375  | LLYDLADQLHAAVGASR   | 5  | 50  | 8,62 | 35018 |
| 635 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial precursor | gij13195624  | LLQYADALEHLLSTGQGVVLE R   | 6  | 45  | 7,63 | 40578 |
| 718 | acyl-coenzyme A thioesterase 13  | gij13385260  | TLAFASVDLTNK<br>FEQTQIQEFKEAFTIMDQNRDGFIDKNDLRDTFAALGR  | 8  | 45  | 8,95 | 15173 |
| 644 | myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform                    | gij505831661 | NEEIDEMIK<br>LKGADPEETILNAFKVFDPEGKGVLKADYVQEMLTQAER<br>NLVHIITHGEEKD                           | 68 | 77  | 4,49 | 16779 |

*Tabela 5: Identidade dos spots protéicos diferentemente expressos entre os grupos controle e tratado por MS e MS/MS. Homologia com a taxonomia Mus musculus e significância estatística ( $p < 0,05$ ) na homologia e identidade da proteína.*

| Spot ID | Protein name  | Control (%vol) | Treated (%vol) | Volume spot difference | Molecular Function  | Biological Process  | Cellular Component         |
|---------|---|----------------|----------------|------------------------|---|---|----------------------------|
| 258     | desmin  | 0,255093       | 0,598472       | 2,34                   | Structural Activity   | Cellular componet organization/morphogenesis  | Intracellular/cytoskeleton |
| 55      | myoglobin   | 0,6            | 1,02           | 1,71                   | Transport   | Blood circulation   | -                          |
| 715     | unnamed protein product   | 1,09           |                |                        | -   | -   | -                          |
| 785     | Chain E, Structure Of Bovine Heart Cytochrome C Oxidase At The Fully Oxidized State | 0,87           |                |                        | catalytic/oxiredutase activity  | Generation of precursor metabolites and energy/oxidative phosphorylation/respiratory electron transport chain | Mitochondria               |
| 464     | mitochondrial aspartate aminotransferase  | 0,35           | 0,11           | 0,33                   | energy production   | reponse to stress   |                            |
| 540     | alpha-crystallin B chain  | 0,11           | 0,03           | 0,31                   | Structural Activity   | Muscle contraction/protein folding/response to stress   | -                          |
| 193     | unnamed protein product   | 0,05           | 0,08           | 1,55                   | -   | -   | -                          |
| 264     | unnamed protein product   | 0,05           | 0,17           | 3,68                   | -   | -   | -                          |
| 166     | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  | 0,28           | 0,5            | 1,79                   | Catalytic/oxiredutase activity  | metabolic/glycolysis  | -                          |
| 712     | cytochrome b-c1 complex subunit 7   | 0,67           |                |                        | Catalytic/oxiredutase activity  | generation of precursor metabolites and energy/oxidative phosphorylation/respiratory electron transport chain | -                          |
| 304     | 78 kDa glucose-regulated protein  | 0,17           | 0,33           | 1,88                   | --  | -   | -                          |
| 603     | troponin C, slow skeletal and cardiac muscles                                       |                | 0,28           |                        | Structural constituent of cytoskeleton/calcium and calmodulin binding | muscle contraction/calcium-mediated signaling   | Intracellular/cytoskeleton |
| 714     | unnamed protein product   | 0,59           |                |                        | -   | -   | -                          |

|     |  |      |      |      |   |  |   |
|-----|--|------|------|------|---|--|---|
| 292 | alpha-fetoprotein, partial   | 0,39 | 0,76 | 1,93 | -   | Transport/development process  | -   |
| 620 | alpha-actin (aa 40-375)  |      | 0,22 |      | Structural<br>Activity/constituent of<br>cytoskeleton                       | Intracellular protein<br>transport/mitosis/cellular component<br>organization  | Intracellular/cytoskeleton  |
| 731 | Malate dehydrogenase, mitochondrial  | 0,08 |      |      | Catalytic/oxiredutase<br>activity   | generation of precursor metabolites and<br>energy/carbohydrate metabolic process                                       |   |
| 740 | Trypsin  | 0,01 |      |      | --  | -  | -   |
| 668 | brain-derived neurotrophic factor isoform<br>X1  | 0,03 |      |      | -   | Growth and diferenciation od neurons   | -   |
| 679 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 75<br>kDa subunit, mitochondrial                              | 0,02 |      |      | Catalytic/oxiredutase<br>activity   | Generation of precursor metabolites and<br>energy/oxidative<br>phosphorilation/respiratory electron<br>transport chain |   |
| 649 | Fam171a2 protein   | 0,03 |      |      | -   | -  | -   |
| 781 | cytochrome b-c1 complex subunit<br>Rieske, mitochondrial                                     | 0,19 |      |      | catalytic/oxiredutase<br>activity   | generation of precursor metabolites and<br>energy/oxidative<br>phosphorilation/respiratory electron<br>transport chain | Mitochondria  |
| 150 | Electron transferring flavoprotein, alpha<br>polypeptide                                     | 0,11 | 0,16 | 1,45 | catalytic/oxiredutase<br>activity/transferase<br>activity                   | generation of precursor metabolites and<br>energy/oxiredutase activity/transferase<br>activity                         | generation of precursor<br>metabolites and<br>energy/respiratory<br>transport chain |
| 635 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1<br>alpha subcomplex subunit 10,<br>mitochondrial precursor | 0,02 |      |      | catalytic/oxiredutase<br>activity/transferase<br>activity/kinase activity   | generation of precursor metabolites and<br>energy/oxidative<br>phosphorilation/respiratory electron<br>transport chain | -   |
| 718 | acyl-coenzyme A thioesterase 13  | 0,11 |      |      | -   | -  | -   |
| 644 | myosin regulatory light chain 2,<br>ventricular/cardiac muscle isoform                       | 0,39 |      |      | structural constituent of<br>cytoskeleton/calcium and<br>calmodulin binding | muscle contraction   | Intracellular/cytoskeleton  |

Tabela 6: Dados da proteínas diferencialmente expressas entre os grupos. (a) Média  $\pm$  erro padrão da média do volume normalizado de cada spot nos géis obtidos. Razão entre a média do volume normalizado dos spots com expressão protéica aumentada pela média do volumenormalizado dos spots com expressão protéica reduzida. (verde) indica maior expressão, enquanto (vermelho) indica menor expressão dos spots do grupo tratado em relação ao contole. (c) Foram utilizadas as anotações dos bancos de dados do Gene Ontology e PANTHER para a definição dos processos biológicos, das funções moleculares e das localizações celulares.

# Discussão

---

## 1.0 INDUÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA

Este trabalho foi conduzido de forma a caracterizar alterações morfológicas e bioquímicas da hipertrofia miocárdica e gerar conhecimentos sobre este processo que poderá conduzir a um melhor entendimento desta síndrome. Para alcançarmos este objetivo usamos o modelo animal de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

Os animais submetidos ao tratamento com isoproterenol apresentaram um claro crescimento em massa do coração, o que pôde ser comprovado diretamente através da mensuração do coração e comparação entre os grupos, mas também através das correlações propostas (**Fig. 8, 10 e 11**). A última correlação, entretanto, só foi igualmente significativa e fidedigna ao crescimento do órgão porque a massa corporal dos animais tratados com isoproterenol não foi alterada ao longo do tratamento. Apesar de nosso modelo ser baseado em um agonista beta-adrenérgico, ativador metabólico e portanto capaz de estimular o consumo de reservas energéticas, a dose ministrada e o tempo de tratamento não foram suficientes para provocar alterações na massa corporal destes animais. Podemos entender também, que durante o período de tratamento, houve um remodelamento metabólico compensatório nos animais tratados que permitiu a manutenção da massa corpórea.

A partir da observação dos ventrículos esquerdos dos animais do grupo tratado verificamos que estas câmaras passaram por um remodelamento hipertrófico patológico, comprovado por correlações entre a massa do ventrículo vs massa corporal; massa dos ventrículos vs tamanho da tíbia e por lâminas histológicas onde pode-se observar claramente que fibras cardíacas foram substituídas por tecido fibroso, especialmente na parte interna (voltada para o lúmem da câmara) (**Fig.**

**16).** Uma vez que o ventrículo esquerdo é responsável pelo bombeamento de sangue através da artéria aorta, vaso calibroso e elástico que oferece, porém, maior resistência ao fluxo de sangue que as veias, estas câmaras devem desenvolver maior força e suportar maiores pressões para bombear o sangue eficientemente através do corpo. Acreditamos que a administração de isoproterenol, estimulador do metabolismo e da frequência respiratória e cardíaca, danifique em maior proporção as paredes internas da cavidade ventricular esquerda por estas camadas de células estarem sujeitas também aos danos físicos provocados pela exposição direta ao fluxo aumentado de sangue/aumento da pressão sanguínea que pode agir de forma a acelerar os danos celulares assim como a substituição tecidual (fibrose). A correlação entre a massa do ventrículo esquerdo vs a massa do coração não foi eficiente para demonstrar o crescimento do órgão uma vez que o coração como um todo apresentou um significativo aumento de massa. Dessa forma, ao relacionarmos estes parâmetros vemos que o crescimento do ventrículo é mascarado pelo crescimento do órgão.

Uma das principais características do processo hipertrófico patológico é o remodelamento molecular que o acompanha (Chien et al., 1997; Swynghedauw, 1999). Diversos processos como a expressão gênica, a atividade de enzimas, o grau de fosforilação de proteínas e a sinalização intracelular são alterados de forma a permitir que a hipertrofia cardíaca ocorra (Marx et al., 2000). Além de ajudar a caracterizar e a entender melhor o processo, estes estudos tentam encontrar moléculas que possam servir como marcadores moleculares para o diagnóstico da doença (Diez and Arrazola, 1991; Drouin et al., 1988). Diversas moléculas já foram sugeridas como marcadores da hipertrofia cardíaca, entretanto, considerando todos os modelos conhecidos atualmente poucos são realmente fidedígnos. Um desses marcadores, conhecido e utilizado mundialmente, é o nível de expressão de ANP nos átrios (Bloch et al., 1986; de Bold, 1985; Kotby et al., 2013). Nosso trabalho, está de

acordo com a literatura de que o modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol induz ao aumento da expressão de ANP nos átrios e desta forma este marcador nos ajuda a comprovar também que nosso modelo foi eficaz na indução da hipertrofia cardíaca.

Algumas estruturas corporais podem sofrer um remodelamento morfológico e bioquímico quando expostas a um estresse biomecânico, como redução da camada de células que a compõem a parede vascular, aumento ou redução na síntese de algumas proteínas, diferenciação de células, hipertrofia do órgão ou celular e apoptose (Bahr, 1957; Xu, 2000). Nosso estudo mostra que, apesar de aumentar significativamente a síntese de ANP nos átrios, o modelo de indução de hipertrofia cardíaca ministrado por nós não tem efeito sobre a morfologia de nenhuma das câmaras atriais. Descartamos a possibilidade de diferenças na coleta de tecido atrial bem como da insuficiência de nossos equipamentos para a mensuração da massa destas cavidades uma vez que a coleta de material foi feita por apenas um experimentador, especialista em biologia cardíaca e dispo de todo aparato necessário para excisão precisa dos átrios, além de contarmos com material eficiente, calibrado e de precisão constatadas anteriormente aos experimentos. Este dado pode indicar que apesar de aumentar a produção de ANP pelos miócitos atriais, a hipertrofia induzida não altera significativamente a síntese de outras proteínas, e os níveis de produção de ANP não são significantes quando comparados com a produção protéica total desta célula.

Um tema polêmico, é o entendimento de se células componentes de órgãos extremamente ativos como o cérebro e o coração seriam capazes de realizar mitose (Zang, SC, 2001.). A explicação para este fenômeno seria que devido à alta atividade metabólica do órgão e da importância desmedida de cada célula em particular para o processo como um todo seria improvável que estas células entrassem em processo de divisão. Este raciocínio é considerado por muitos como válido e extremamente lógico. Entretanto, contrariando os preceitos



acima dispostos, foi publicado no ano 1999 que células encontradas no cérebro teriam a capacidade de se multiplicar (Altman, 1962; Seifried, 1931; Wuestefeld et al., 2012). Em seu estudo, eles mostraram que células da glia e neurônios encontrados no lobo temporal teriam a capacidade de se reproduzir e que a neurogênese estaria envolvida em várias condições patológicas e fisiológicas. Em nosso trabalho, decidimos por caracterizar fielmente o processo hipertrófico que havíamos induzido e portanto, realizamos a contagem das células cardíacas presentes em diversas lâminas de cada grupo bem como mensuramos seu diâmetro. Surpreendentemente, nosso resultado mostrou que além do aumento no diâmetro celular, estávamos diante também de um aumento no número de células. Nas diversas lâminas que analisamos, está claro que há uma maior densidade de fibras contráteis nos animais tratados se comparados com os animais controle. Esta informação corrobora com a contagem de células, que seguiu um rigoroso método e amplamente utilizado por especialistas da área de morfologia. Ainda não temos explicação de qual seria a origem destas novas células, mas podemos especular que além da diferenciação de células tronco e células nervosas encontradas no tecido cardíaco, esse aumento no número de células também poderia ser uma resposta de cardiomiócitos que passaram por um processo de desdiferenciação, divisão e novamente diferenciação. Estamos certos que estudos mais aprofundados visando o entendimento deste processo são necessários.

O estudo de nossas micrografias mostrou que apesar do aparente aumento em tamanho (longitudinal) do coração, a diferença entre os dois grupos não foi significativa. Enganos desse tipo são comuns no meio científico e reforçam de forma veemente a importância da realização de testes estatísticos acurados.

Já as paredes do ventrículo esquerdo, como esperado devido à sobrecarga hemodinâmica a que foram submetidas, apresentaram um claro aumento em espessura. Não houve, entretanto, alteração relativa

ao diâmetro desta cavidade. Este fato é interessante e nos ajuda a caracterizar esse processo como hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica, em acordo com a literatura para estímulos induzidos por agonista beta-adrenérgico (Bristow, 2003; Port and Bristow, 2001, 2001). Não nos preocupamos em estudar ainda os distúrbios provocados pelo tratamento com isoproterenol na cavidade ventricular direita. Escolhemos essa abordagem excludente do ventrículo direito em primeiro lugar porque a literatura relata amplamente que as alterações mais significativas acontecem no ventrículo esquerdo e também porque a completa separação do ventrículo direito, uma fina camada de tecido muscular que se mistura com o ventrículo esquerdo, poderia facilmente ser questionada. É possível que existam alterações referentes a esta estrutura e não descartamos sua importância, apenas mantemos o foco deste trabalho na cavidade ventricular esquerda.

Uma característica marcante que chamou nossa atenção foi a presença em praticamente todas as lâminas dos animais tratados com isoproterenol de células do sistema sanguíneo entre as fibras musculares cardíacas e fora dos vasos. A princípio acreditamos que a presença destas células teria a função de limpar o coração dos debris de células mortas para a posterior proliferação do tecido fibrótico (tecido de preenchimento). Entretanto, mais experimentos são necessários para garantir que as células que visualizamos não representam apenas uma contaminação com resquícios de sangue que ficaram dentro dos vasos mais internos do coração.

Para que uma célula sobreviva, diversas moléculas e estruturas são importantes (aminoácidos, DNA, proteínas, sais e etc) mas para controlar a atividade de todas estas moléculas e transmitir informação de maneira rápida e eficiente do ambiente do exterior da célula (ou entre células) macro-moléculas conhecidas como canais iônicos são essenciais. Essas proteínas que formam poros na parede das células e controlam a passagem de íons específicos para dentro ou fora da célula

sofreram poucas modificações desde os seres mais simples como o paramécio, até os seres humanos (Hille, 2001). Por tais estruturas terem se mantido conservados durante tanto tempo e em organismos diferentes, é possível especular a importância da atividade correta e precisa destes canais. Após encontrarmos diversos artigos indicando que canais para cálcio voltagem-dependentes do tipo T estariam envolvidos no processo hipertrófico patológico, direcionamos nosso estudo de maneira a entender o papel destes canais na hipertrofia cardíaca. Diversos autores estudaram em animais knockout para os canais para cálcio voltagem-dependentes do tipo T e para o tipo L como seria o desenvolvimento hipertrófico em cada um desses animais. De maneira simplificada, nossos estudos nos fizeram interpretar, como essencial a presença dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo T para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica.

A idéia de que os canais Cav3.2 seriam cruciais no processo hipertrófico reside no fato de que animais knockouts para estes canais não desenvolverem hipertrofia cardíaca apesar dos diferentes estímulos aplicados (Dirkx et al., 2013; Kuwahara, 2013). O mesmo não acontece em animais knockouts para o canal para cálcio dependente de voltagem do tipo L ou outras isoformas. Assim, fomos levados a imaginar que uma possível resposta para os efeitos danosos da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol e talvez um ponto essencial para o controle desse processo residiria na reativação do programa gênico fetal em especial a re-expressão dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo T, em animais adultos. Nossa primeira abordagem para verificar se esses canais estavam mais expressos no tecido cardíaco dos animais do grupo tratado foi através da técnica de western blot. Entretanto, nossos resultados indicam que não há diferença significativa entre esses grupos experimentais. Uma possibilidade levantada por nosso grupo para explicar esse resultado seria que o normalizador escolhido para estes experimentos, o NADH, poderia mascarar as reais alterações na

expressão desses canais uma vez que esta molécula pode ser alterada durante processos que interfiram no metabolismo energético e de radicais livres da célula. Infelizmente não foi possível repetir os experimentos de western blot a tempo de anexar seus resultados a esta dissertação, mas além de repetir esta técnica, iniciamos novos experimentos como o RT-PCR para avaliar os níveis de mRNA para os canais para cálcio dependentes de voltagem de forma a entender melhor as interferências intracelulares provocadas pela exposição ao isoproterenol.

## **2.0 ANÁLISE PROTEÔMICA**

A análise proteômica tem sido fundamental para o entendimento de diversos processos patológicos. Este ramo da pesquisa científica lida com a análise da expressão gênica e avalia interferências ambientais na composição protéica da célula. Pode-se dizer então que o proteoma representa o status funcional de um compartimento biológico.

Diversos pesquisadores têm utilizado a análise proteômica como forma de compreender melhor os processos intracelulares, identificando proteínas diferencialmente expressas entre animais saudáveis e acometidos por uma determinada patologia, definindo potenciais marcadores moleculares, bem como determinando alvos para um possível tratamento (Rohini et al., 2010). Em nosso estudo, utilizamos a abordagem proteômica para identificar as proteínas diferencialmente expressas entre o tecido cardíaco de animais saudáveis e o de animais que foram submetidos ao tratamento com isoproterenol. Quando iniciamos nossos estudos em 2012, não existia na literatura nenhum grupo que estudasse o processo hipertrófico patológico do coração utilizando técnicas de proteômica, entretanto, em Março deste ano foi publicado no *Journal of Translational Medicine* um trabalho discutindo a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol em ratos através de uma visão proteômica (Chowdhury et al., 2013). Adicionamos esse trabalho à

lista dos que serão utilizados por nós para ajudar a entender e discutir nossos resultados.

Como descrito anteriormente, dentre os 131 spots apontados como diferencialmente expressos entre os grupos controle e tratado, 113 foram retirados de cada gé. Diversos artefatos de técnica como spots muito próximos um do outro ou sua ausência em algum dos géis analisados são responsáveis pela diferença, em número de spots, entre o grupo de spots que foram excisados e aqueles diferencialmente expressos.

A partir dos 113 spots obtidos apenas 25 foram identificados. Atribuímos a nossa baixa taxa de identificação (22,12%) ao fato de que vários dos spots recolhidos eram proteínas de baixa expressão, sendo representadas por pequenos pontos localizados na parte superior (maior massa molecular) do gel. A pequena concentração de proteína “spotada” de cada gel pode ter sido responsável pela baixa intensidade dos picos obtidos para tais proteínas no espectômetro de massa, o que inviabilizou a identificação das mesmas. Apesar de termos sido alertados pelo grupo da Dra. Suely Figueiredo (que gentilmente nos orientou em todos os experimentos de proteômica) de que estes spots dificilmente seriam identificados, resolvemos adicioná-los às nossas amostras por acreditarmos que algumas proteínas de grande interesse nosso, como canais para cálcio dependentes de voltagem, estariam localizados naquela região baseado em seu ponto isoelétrico (PI) e massa molecular (MM).

Nossos dados revelaram que o tratamento com isoproterenol tem efeito modulador sobre as proteínas envolvidas na organização estrutural e na contração do músculo cardíaco, efeito este já esperado uma vez que o processo hipertrófico é a resposta celular a um estímulo que induz ao aumento em número e força da maquinaria contrátil (Wang et al., 2012). Entre essas proteínas está a desmina, que teve seus níveis protéicos aumentados nos animais tratados. Apesar de sua função não

ter sido totalmente elucidada em cardiomiócitos, essa proteína desempenha funções mecânicas, estruturais e regulatórias sendo, portanto, essencial para a manutenção da arquitetura do músculo . O acúmulo anormal de desmina no músculo cardíaco, porém, pode perturbar a função das miofibrilas, levando à tensão incomum do sarcolema e à uma distribuição atípica das organelas celulares (Bhuiyan et al., 2013; Brodehl et al., 2013). Esse fenômeno poderia explicar os relatos de outros grupos de pesquisa sobre a disfunção e falência cardíacas de animais submetidos ao tratamento com isoproterenol.

A proteína estrutural alpha-cristalina é conhecida por ser uma proteína de choque térmico atuando, portanto, em resposta ao estresse celular. Além disso, sabe-se que a alpha-cristalina tem função protetora em cardiomiócitos por manter a elasticidade sarcomérica, a integridade mitocondrial e a homeostase redox por se ligar a diferentes moléculas (Mitra et al., 2013; Roselló-Lletí et al., 2012). Após ser fosforilada na serina 59, por exemplo, a alpha-cristalina é translocada para a mitocôndria onde exerce seu efeito anti-apoptótico por se ligar ao canal VDAC1 e inibir a liberação de citocromo C no citossol. De acordo com o grupo de Roselló, entretanto, a alpha-cristalina apresentaria essa função apenas durante o infarto do miocárdio, sendo que o mesmo não aconteceria durante o processo hipertrófico patológico. Além disso, o grupo apresenta dados que indicam que a atividade apoptótica durante o processo hipertrófico é uma função mitocondrial sendo que no infarto é um função do retículo endoplasmático. É possível, portanto, que nossos animais tratados com isoproterenol apresentaram uma menor concentração de alpha-cristalina justamente por essa molécula não apresentar uma função protetora neste modelo de dano cardíaco (hipertrofia) e, portanto, estar menos expressa neste tecido.

Uma das propriedades mais importantes do miocárdio de mamíferos é a capacidade de se adaptar ao aumento da atividade hemodinâmica, sendo que diante de estímulos crônicos como o da

hipertrofia há alterações na expressão de genes estruturais incluindo a expressão de isoformas de três famílias multigênicas de proteínas localizadas no filamento grosso do sarcômero assim como das miosinas de cadeia leve e pesada e da actina (Bishopric et al., 1987; Eppenberger-Eberhardt et al., 1990; Schwartz et al., 1986). No caso da actina, existem duas formas sarcoméricas distintas, a cardíaca e a esquelética sendo ambas similares e de difícil distinção ao nível de proteína. Esse fato poderia explicar o motivo de nossos dados não distinguirem entre as duas isoformas. Diversos estudos têm demonstrado que durante a hipertrofia cardíaca ocorre a re-expressão de genes da maquinaria contrátil que são normalmente encontrados nos primeiros estágios de vida (embrionário) (Dirkx et al., 2013). Em animais de pequeno porte, a isoforma cardíaca se acumula no coração de animais adultos enquanto que em mamíferos de grande porte a isoforma esquelética predomina. Existem estudos, entretanto, que demonstram que uma semana após a constricção da aorta, os níveis de mRNA para a actina esquelética em animais de pequeno porte representam 4-5% do total dos transcritos do músculo cardíaco para actina do tipo estriada (Bishopric et al., 1987). Em nosso modelo, os animais tratados com isoproterenol apresentaram maior expressão de  $\alpha$ -actina, como o esperado para compensar as demandas de força e contração do coração sob estímulo beta-adrenérgico.

A troponina C, que atua como sensor de cálcio durante a contração muscular é também um importante agente tamponante dos níveis de cálcio intracelular e atua na manutenção da homeostase deste íon no interior do miócito cardíaco (Parvatiyar et al., 2012; Pinto et al., 2011). Mutações no gene para esta molécula são responsáveis por causar a cardiomiopatia dilatada que se manifesta como: redução na contratilidade do ventrículo esquerdo, diminuição da espessura da parede ventricular e consequente redução na fração de ejeção do coração . Além disso, animais knockouts para troponina C apresentam

fenótipo consistente com o da cardiomiopatia dilatada (Pinto et al., 2011). O estudo morfométrico dos corações de nossos animais tratados com isoproterenol demonstrou que o processo hipertrófico induzido por este agente é do tipo concêntrica e portanto, difere significativamente da cardiomiopatia dilatada na qual há uma importante participação da troponina C. Entretanto, em ambos processos a troponina C apresenta papel importante visto que em nossos animais tratados houve um aumento nos níveis de troponina C. Sabe-se ainda, que a estimulação beta-adrenérgica (isoproterenol) ativa a PKA nos miócitos cardíacos e que a fosforilação consequente de seus alvos leva a uma diminuição na sensibilidade ao cálcio (Marx et al., 2000; Yang et al., 2013). Acreditamos que essa sensibilidade reduzida ao cálcio deva ser compensada também utilizando-se de maiores níveis de troponina C nas células cardíacas.

A miosina de cadeia leve consiste em subunidades que se ligam próximas à 'cabeça' dos grupos de miosina de cadeia pesada. Usualmente existem dois pares de subunidades ligadas à miosina de cadeia pesada: um essencial e outro regulatório (Warren et al., 2012). Identificamos proteínas relativas ao par regulatório mas entendemos que o tratamento imposto por nós influencia de forma similar ambas as subunidades regulatória e essencial, por existir pouco sentido na existência solo da miosina de cadeia leve regulatória sem a subunidade essencial. Em condições fisiológicas, os níveis de fosforilação da miosina de cadeia leve são mantidos relativamente constantes devido a atividade da miosina de cadeia leve quinase e à fosfatase 1-beta . Além disso há relatos de que os níveis de fosforilação da miosina de cadeia leve variam de acordo com a espessura da parede ventricular sendo baixa na parede interna e alta na parede externa (Warren et al., 2012). Esse gradiente seria importante para manter as propriedades contráteis não uniformes do tecido cardíaco. Na verdade, doenças cardíacas têm sido relacionadas à miosina especialmente quando há uma deficiência em sua fosforilação o que leva a uma redução na contratilidade muscular. A



super-expressão da quinase da miosina de cadeia leve, inclusive, traz efeitos benéficos para os animais TAC incluindo manutenção da contratilidade celular, ausência de fibrose e células apoptóticas. Assim, entendemos que o papel benéfico desempenhado pela miosina de cadeia leve em processos hipertróficos patológicos podem ser desempenhados sem haver um aumento nos níveis desta proteína, necessitando apenas que ela seja fosforilada. Entretanto, os benefícios trazidos por esta molécula são exatamente o oposto do fenótipo apresentado por nossos animais mostrando que seria plausível esperar que em nossos animais houvesse um menor nível de fosforilação desta proteína ou até mesmo, uma redução no nível da mesma, sendo este último fenômeno o observado por nós.

Observamos que no tecido dos animais tratados com isoproterenol houve um aumento nos níveis de mioglobina. A mioglobina é o pigmento presente nos músculos responsável pelo transporte de oxigênio. Só é encontrado no sangue circulante quando há dano tecidual e uma vez filtrada pelos rins causa danos ao epitélio tubular por ser tóxica (Molajavi et al., 2010). É portanto, considerada como um marcador de dano tecidual. A importância dessa molécula para o transporte de  $O_2$  no tecido cardíaco é tão grande que animais knockout para mioglobina apresentam um aumento na densidade capilar, maior fluxo sanguíneo nas coronárias e maior difusão de oxigênio dos eritrócitos para as mitocôndrias de forma a sustentar as demandas de oxigênio do coração. Uma vez que esta molécula está presente em nossos animais e há uma aumento na demanda de oxigênio no tecido cardíaco desses devido ao tratamento com isoproterenol, é possível que o caminho menos custoso energeticamente seja o aumento na produção de mioglobinas para suprir as demandas de oxigênio do tecido (como mostra nossos dados) em vez de aumentar a densidade capilar e o fluxo nas coronárias como acontece em animais knockouts para mioglobina.

Alterações nas demandas energéticas como aquelas que

ocorrem durante intensa atividade física são também supridas de maneira eficiente por alterações ao nível mitocondrial que levam ao ajuste na síntese de ATP e preservam a capacidade do miocárdio em responder a alterações de pressão e volume. De acordo com Julig M. et al., 2008 e Chu et al., alterações em enzimas que governam processos oxidativos refletem em alterações em subunidades dos complexos transportadores de elétrons, o que foi observado pela nossa análise. Entretanto, há divergências na literatura quanto a síntese e degradação de proteínas diante do estímulo hipertrófico. Estudos utilizando microscopia eletrônica e métodos bioquímicos demonstraram que há um acúmulo de componentes mitocondriais preferencialmente nos primeiros estágios da hipertrofia cardíaca (Atlante et al., 1998; Bobba et al., 1995). Em aproximadamente 24 horas após o estímulo hipertrófico, há um aumento no conteúdo de citocromo por grama de proteína do tecido cardíaco devido a um aumento na produção desta molécula e redução das taxas de degradação da mesma. Entretanto, entre 3-10 dias pós estímulo, o conteúdo de citocromo e o volume ocupado por mitocôndrias no tecido cardíaco diminuem enquanto o número de miofibrilas aumenta. As diferenças observadas por vários grupos de pesquisa sobre a síntese e degradação de proteínas diante do estímulo hipertrófico podem ser melhor compreendidas se entendermos que existem variações experimentais como: 1) tipo de estímulo utilizado para induzir a hipertrofia cardíaca; 2) a rapidez com que o crescimento do órgão acontece; 3) o estágio da hipertrofia cardíaca no qual os experimentos são realizados e 4) magnitude de hipertrofia obtida. Como exemplo, os já referidos autores não encontraram redução no volume mitocondrial ou no conteúdo de citocromo da célula em estudos que utilizaram estímulo hipertrófico sustentado ou atividade física forçada por um longo período de tempo (14 dias ou mais) (Atlante et al., 1998; Bobba et al., 1995). O modelo elaborado por nós, injeções de isoproterenol 50mg/kg/dia divididas em duas doses diárias durante 7 dias, induziu a uma redução no conteúdo de citocromo B e da citocromo C oxidase do tecido cardíaco em

concordância como aqueles autores que realizaram a coleta de dados entre 3-10 dias após o tratamento. Para estes grupos que analisaram por métodos bioquímicos a relação entre a concentração de citocromo por grama de tecido, uma provável explicação para esse fenômeno seria o estímulo hipertrófico induz a um pequeno aumento na taxa de produção dessa proteína e é acompanhado de grande aumento em massa do tecido cardíaco e de outras proteínas mitocondriais e cardíacas, aumento esse suficiente para mascarar a produção do citocromo (relação entre a concentração de citocromo por grama de tecido). Entretanto, pouco se sabe sobre os fatores que controlam as taxas de síntese e degradação dos constituintes mitocondriais e, para os resultados observados por nosso grupo, entendemos que ainda faltam dados na literatura que permitam uma melhor compreensão dos mecanismos que o determinam.

Nosso estudo apresentou ainda que há uma redução dos níveis de NADH ubiquinona oxireductase nos animais tratados com isoproterenol. Nossos dados estão em acordo com outros autores como Maulik e Young Park que ao estudarem o tecido cardíaco acometido por miocardites, como a hipertrofia cardíaca, também observaram redução significativa desta molécula (Maulik and Kumar, 2012; Park et al., 2004). Esta enzima está presente na membrana interna da mitocôndria, faz parte da cadeia respiratória de diversos organismos e catalisa a transferência de elétrons do NADH à co-enzima Q10. Esse processo gera o gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial que é utilizado para a produção de ATP. Além disso, NADH oxidase é uma fonte importante de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na parede vascular, no endotélio e em fibroblastos (Lin et al., 2011; Piccoli et al., 2005). Tratamentos utilizando chá verde têm sido efetivos para reduzir a produção de ROS e prevenir os danos causados pela hipertrofia cardíaca assim como o uso de inibidores da NADH oxidase (Lin et al., 2011). Ainda assim, pouco se sabe a respeito dos mecanismos ativados durante o estímulo hipertrófico patológico

responsáveis por danificar o tecido cardíaco, mas acredita-se que esses distúrbios mitocondriais sejam responsáveis por diversas cardiomiopatias e que a sinalização via ROS seja essencial para o remodelamento cardíaco mal-adaptativo.

Outra alteração importante ocorrida em nível mitocondrial se refere a flavoproteínas, moléculas envolvidas em diversos processos biológicos como remoção de radicais que contribuem para o estresse oxidativo, bioluminescência, reparo de DNA, apoptose e etc (Genova and Lenaz, 2013; Jensen et al., 2013). Recentemente, Stähle e colaboradores demonstraram que anticorpos contra flavoproteínas mitocondriais estavam presentes no soro de pacientes com miocardites e cardiomiopatia dilatada (Stähle et al., 1999). De maneira interessante, identificamos que a flavoproteína, um aceptor de elétrons que atua juntamente com diferentes desidrogenases na cadeia respiratória, foi positivamente regulada em animais tratados com isoproterenol quando comparados com animais do grupo controle. Baseado na atividade dessa proteína, nossa hipótese é a de que o aumento na expressão dessa flavoproteína seja uma tentativa das células do tecido cardíaco em reduzir os danos provocados pelo estímulo hipertrófico, tamponando as ROS produzidas e reduzindo os danos ao DNA.

Continuando o estudo das proteínas mitocondriais, identificamos a malato desidrogenase, enzima do ciclo de Krebs que cataliza a oxidação do malato a oxalacetato levando a redução do NAD<sup>+</sup> e à produção de energia. Essa proteína, tem ainda função especial no coração por catalisar o processo de liberação de fosfatos de alta energia da creatina fosfato para a contração muscular (Lin et al., 2011; Park et al., 2004). Foi demonstrado previamente que além dos padrões de expressão de malato desidrogenase variarem entre diferentes tecidos musculares, como o cardíaco e o esquelético, há também alterações em sua expressão em cardiomiopatias como a esclerose das coronárias e também em animais com corações hipertróficos. Semelhante aos nossos dados Lin e

colaboradores observaram uma pequena diminuição desta enzima durante o processo hipertrófico e esse fenômeno poderia ser explicado devido a longos períodos de hipóxia a que o tecido cardíaco poderia ser submetido neste tratamento. Além disso, existem evidências de que durante a hipertrofia cardíaca há depleção dos níveis de glicose, evento este responsável por ativar a transcrição de P53, um já conhecido mediador da apoptose em células cardíacas. Desta forma, é possível que essa molécula seja menos expressa no tecido de animais tratados com isoproterenol como forma de tentar reduzir as taxas de apoptose entre os cardiomiócitos, apesar de nenhum mecanismo ainda ter sido proposto para explicar esse fenômeno.

Outra proteína que chamou nossa atenção foi a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, que é uma enzima da via glicolítica ubiquamente expressa, essencial para a produção de energia e que está envolvida em processos como a hipóxia celular, estresse oxidativo, apoptose e organização de microtúbulos (Roselló-Lletí et al., 2012). Um aumento nos níveis dessa proteína como observado por nós, foi relatado em cães com cardiomiopatia dilatada (DCM) e em outros modelos de falência cardíaca inclusive em humanos. Estudos de imunofluorescência demonstraram que há um acúmulo maior de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase no núcleo que no citoplasma em modelos de isquemia cardíaca e DCM (Buse et al., 2008). A evidência de que esta proteína se acumula no núcleo pode ser devido à atividade enzimática de reparo de DNA de forma a tentar proteger a célula do processo de morte, mas também encontramos autores que citavam também a função de carreador nuclear de proteínas pró-apoptóticas (Rodacka, 2013). Infelizmente, não é possível saber a qual dessas funções a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase está servindo além da produção de energia.

Como resultado também obtivemos níveis reduzidos de aspartato aminotransferase mitocondrial, enzima que cataliza a

conversão de L-aspartato e alfa-cetoglutarato a oxalacetato e L-glutamina. Nosso resultado é contraditório ao do grupo de Juárez que estudou a hipertrofia cardíaca através da técnica de coarctação da aorta e obteve um aumento de 24% desta enzima sendo que as proporções mitocondrial e citoplasmática se mantiveram inalteradas (um terço sob a forma mitocondrial e dois terços citoplasmática) (Juárez et al., 1998; Zamora et al., 1996). Outros estudos indicaram que os níveis de aspartato aminotransferase são elevados durante pancreatite aguda, infarto do miocárdio, anemia hemolítica aguda, queimaduras graves, doença renal aguda e trauma. As diferenças encontradas entre nossos dados e a literatura podem ocorrer devido ao método de indução de hipertrofia cardíaca escolhido, mas os dados disponíveis não são insuficientes para compreendê-las.

Ainda em nível mitocondrial, identificamos a Acil coenzima A (Acil-CoA), tioesterase responsável pela biossíntese e oxidação de ácidos graxos de cadeias longas, sendo essencial portanto para o metabolismo de carboidratos. A utilização de glicose e ácidos graxos pelo coração estão fortemente ligadas e co-reguladas. O uso de um substrato inibe diretamente o uso do outro e a seleção de qual substrato é utilizado é considerado uma das causas da indução de diversas doenças cardíacas. O uso desses substratos é modulado por hormônios como insulina, glucagon e catecolaminas. Assim como nosso modelo, outras formas de falência cardíaca (animais TAC e animais hipertensos) têm baixa utilização de ácidos graxos, e conseqüentemente baixos níveis de Acil-CoA, além de redução dos níveis de mRNA e de expressão de proteínas relacionadas com transportadores de ácidos graxos. A utilização de glicose, ao contrário, é mais complexa, sendo modestamente aumentada inicialmente na fase compensada da hipertrofia mas diminuindo quando ocorre a disfunção sistólica (Doenst et al., 2013)

A alfa-fetoproteína é encontrada em mamíferos desde os

estágios fetais de desenvolvimento (a partir da sétima semana de gestação) e é produzida durante toda a vida do embrião (Gitlin and Boesman, 1967; Holmes, 1967). Assim como outras proteínas determinantes para o desenvolvimento embrionário, os níveis de alfa-fetoproteína diminuem em aproximadamente três dias após o nascimento. Essa molécula, efetiva na indução do crescimento e espalhamento de células humanas e de ratos em cultura, teve sua expressão aumentada após o tratamento com isoproterenol. A atividade da alfa-fetoproteína é dada através de sua ligação à parede externa das células alvo (inclusive do tecido conjuntivo), mas o mecanismo desencadeado por essa ligação ainda não é conhecido. Dado que o estímulo hipertrófico induz ao crescimento celular (também apresentado por nós através das medidas do diâmetro celular) o aumento na expressão dessa molécula pode ser facilmente compreendido baseado em sua atividade demonstrada *in vitro* de induzir ao crescimento e espalhamento celular.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor - BDNF) faz parte da família de fatores de crescimento e apresenta função trófica em neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e em neurônios da retina. BDNF localiza-se principalmente em células endoteliais onde sua expressão é dependente da atividade que esta camada de células apresenta. Variações nos níveis dessa molécula foram encontradas em pacientes acometidos por doenças vasculares associadas à disfunção endotelial, entretanto, pouco ainda se sabe sobre a função do fator neurotrófico neuronal localizado no sistema cardiovascular (Pikula et al., 2013, 2013; Prigent-Tessier et al., 2013). Apesar de nossos dados não permitirem a compreensão do papel do BDNF em nossos animais tratados, outros grupos também observaram uma redução no nível de expressão dessa proteína em doenças relacionadas ao sistema cardiovascular como a hipertensão (Fukushima et al., 2013). Por outro lado, treinamento físico tem efeito positivo sobre

os níveis de BDNF.

Nossa análise proteômica diferencial do ventrículo esquerdo de animais tratados com isoproterenol e controles, gerou dados sobre esta síndrome, que excedem investigações prévias que utilizaram técnicas bioquímicas tradicionais para a análise de proteínas. Entretanto esta análise apresentou limitações, tais como: (i) processo de extração utilizado e de detecção não é adequado para proteínas de membranas ou de baixa expressão protéica; (ii) corante utilizado apresenta baixa sensibilidade; e (iii) pequena quantidade das amostras protéicas obtidas, para análise MS-MS apesar de termos utilizado de um pool de três animais.

Temos como meta melhorar a resolução da técnica, com a alterações no processo de extração, uso do DIGE (difference gel electrophoresis), análise do fosfoproteoma, validação das proteínas identificadas por western blot e utilização de técnicas como PCR para complementação de nossos estudos.



**Conclusão**



## 6.0 CONCLUSÃO

Nosso trabalho induziu eficientemente o processo hipertrófico patológico em animais C57BL6 utilizando a administração de isoproterenol na dose 50mg/kg/dia divididas em duas doses diárias. Houve aumento em massa do coração, com alterações predominantemente no ventrículo esquerdo, fibrose e aumento na expressão do marcador molecular para hipertrofia cardíaca ANP.

A análise proteômica revelou que o tratamento imposto por nós induziu alterações na estrutura contrátil do coração, no balanço redox, em moléculas envolvidas no transporte e na produção de energia. Todas elas são importantes para o remodelamento morfológico e molecular do coração sob estímulo beta-adrenérgico intermitente. Entretanto, outros estudos são necessários para complementar e entender parte das informações fornecidas por nós como o papel de algumas proteínas no processo hipertrófico patológico.

Este trabalho contribui de forma significativa para os dados da literatura atual a respeito da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

## REFERÊNCIAS

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

ALTMAN, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* *135*, 1127–1128.

Anversa, P., Melissari, M., Beghi, C., and Olivetti, G. (1984). Structural compensatory mechanisms in rat heart in early spontaneous hypertension. *Am. J. Physiol.* *246*, H739–746.

Arber, S., Hunter, J.J., Ross, J., Jr, Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J.C., Chien, K.R., and Caroni, P. (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* *88*, 393–403.

Atlante, A., Seccia, T.M., Pierro, P., Vulpis, V., Marra, E., Pirrelli, A., and Passarella, S. (1998). ATP synthesis and export in heart left ventricle mitochondria from spontaneously hypertensive rat. *Int. J. Mol. Med.* *1*, 709–716.

BAHR, G.F. (1957). Changes in liver cell elements during stimulated protein synthesis; a cytochemical study. *Acta Radiol. Suppl.* 1–111.

Bergman, A.B., and Neiman, H.L. (1978). Computed tomography in the detection of retroperitoneal hemorrhage after translumbar aortography. *AJR Am. J. Roentgenol.* *131*, 831–833.

Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac

hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* *128*, 191–227.

Berridge, M.J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 933–940.

Bhuiyan, M.S., Pattison, J.S., Osinska, H., James, J., Gulick, J., McLendon, P.M., Hill, J.A., Sadoshima, J., and Robbins, J. (2013). Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J. Clin. Invest.* *123*, 5284–5297.

Bi, Q. (2012). Outline of proteins and signaling pathways involved in heart failure. *Curr. Protein Pept. Sci.* *13*, 682–686.

Bishopric, N.H., Simpson, P.C., and Ordahl, C.P. (1987). Induction of the skeletal alpha-actin gene in alpha 1-adrenoceptor-mediated hypertrophy of rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* *80*, 1194–1199.

Bjørnstad, J.L., Skrbic, B., Sjaastad, I., Bjørnstad, S., Christensen, G., and Tønnessen, T. (2012). A mouse model of reverse cardiac remodelling following banding-debanding of the ascending aorta. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* *205*, 92–102.

Bloch, K.D., Seidman, J.G., Naftilan, J.D., Fallon, J.T., and Seidman, C.E. (1986). Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secretory pathways. *Cell* *47*, 695–702.

Bobba, A., Giannattasio, S., Pucci, A., Lippolis, R., Camaschella, C., and Marra, E. (1995). Characterization of mitochondrial DNA in primary cardiomyopathies. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *243*, 181–189.

De Bold, A.J. (1985). Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* *230*, 767–770.

Boyden, P.A., Hirose, M., and Dun, W. (2010). Cardiac Purkinje cells. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* *7*, 127–135.

Bristow, M. (2003). Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation* *107*, 1100–1102.

Brodehl, A., Dieding, M., Klauke, B., Dec, E., Madaan, S., Huang, T., Gargus, J., Fatima, A., Saric, T., Cakar, H., et al. (2013). The Novel Desmin Mutant p.A120D Impairs Filament Formation, Prevents Intercalated Disk Localization and Causes Sudden Cardiac Death. *Circ. Cardiovasc. Genet.*

Burgoyne, J.R., Mongue-Din, H., Eaton, P., and Shah, A.M. (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ. Res.* *111*, 1091–1106.

Burke, M.A., and Cotts, W.G. (2007). Interpretation of B-type natriuretic peptide in cardiac disease and other comorbid conditions. *Heart Fail. Rev.* *12*, 23–36.

Burniston, J.G. (2009). Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics* *9*, 106–115.

Buse, C., Altmann, F., Amann, B., Hauck, S.M., Poulsen Nautrup, C., Ueffing, M., Stangassinger, M., and Deeg, C.A. (2008). Discovering novel targets for autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* *29*, 1325–1332.

Cantin, M., and Genest, J. (1987). The heart as an endocrine gland. *Hypertension* *10*, 118–121.

CARMELIET, E., and LACQUET, L. (1956). [Influence of temperature and of potassium and sodium ions on the duration of the cardiac action potential in relation to frequency]. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* *64*, 513–514.

Chiang, C.-S., Huang, C.-H., Chieng, H., Chang, Y.-T., Chang, D., Chen, J.-J., Chen, Y.-C., Chen, Y.-H., Shin, H.-S., Campbell, K.P., et al. (2009). The Ca(v)3.2 T-type Ca(2+) channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ. Res.* *104*, 522–530.

Chien, K.R., Shimizu, M., Hoshijima, M., Minamisawa, S., and Grace, A.A. (1997). Toward molecular strategies for heart disease--past, present, future. *Jpn. Circ. J.* *61*, 91–118.

Chowdhury, D., Tangutur, A.D., Khatua, T.N., Saxena, P., Banerjee, S.K., and Bhadra, M.P. (2013). A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats. *J. Transl.*

Med. 11, 130.

Clemo, H.F., Stambler, B.S., and Baumgarten, C.M. (1998). Persistent activation of a swelling-activated cation current in ventricular myocytes from dogs with tachycardia-induced congestive heart failure. *Circ. Res.* 83, 147–157.

Cohn, J.N., Levine, T.B., Olivari, M.T., Garberg, V., Lura, D., Francis, G.S., Simon, A.B., and Rector, T. (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 311, 819–823.

Cooper, G., 4th (1987). Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu. Rev. Physiol.* 49, 501–518.

Cribbs, L. (2010). T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels Austin Tex* 4, 447–452.

David, L.S., Garcia, E., Cain, S.M., Thau, E., Tyson, J.R., and Snutch, T.P. (2010). Splice-variant changes of the Ca<sub>v</sub>3.2 T-type calcium channel mediate voltage-dependent facilitation and associate with cardiac hypertrophy and development. *Channels Austin Tex* 4, 375–389.

Diez, J., and Arrazola, A. (1991). Is the erythrocyte sodium-lithium countertransport a molecular marker of cardiac risk in hypertension? *Cardioscience* 2, 87–92.

Ding, J., Thibault, G., Gutkowska, J., Garcia, R., Karabatsos, T., Jasmin, G., Genest, J., and Cantin, M. (1987). Cardiac and plasma atrial natriuretic factor in experimental congestive heart failure. *Endocrinology* 121, 248–257.

Dirkx, E., da Costa Martins, P.A., and De Windt, L.J. (2013). Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 2414–2424.

Doenst, T., Nguyen, T.D., and Abel, E.D. (2013). Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 113, 709–724.

Draper, M.H., And Weidmann, S. (1951). Cardiac resting and action potentials

recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* 115, 74–94.

Drouin, J., Lavigne, J.P., and Nemer, M. (1988). [Expression of the gene for the atrial natriuretic factor: a marker for ventricular hypertrophy]. *Unión Médica Can.* 117, 64–67.

Du, Y., Plante, E., Janicki, J.S., and Brower, G.L. (2010). Temporal evaluation of cardiac myocyte hypertrophy and hyperplasia in male rats secondary to chronic volume overload. *Am. J. Pathol.* 177, 1155–1163.

Eppenberger-Eberhardt, M., Flamme, I., Kurer, V., and Eppenberger, H.M. (1990). Reexpression of alpha-smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Dev. Biol.* 139, 269–278.

Fabiato, A., and Fabiato, F. (1972). Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ. Res.* 31, 293–307.

French, A.P., Tonge, C.M., Peake, J.C., and Horton, P.W. (1988). Variability of ejection fraction results using commercial cardiac phantoms. *Nucl. Med. Commun.* 9, 527–532.

Fukushima, A., Kinugawa, S., Homma, T., Masaki, Y., Furihata, T., Yokota, T., Matsushima, S., Abe, T., Suga, T., Takada, S., et al. (2013). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* 168, e142–144.

Genova, M.L., and Lenaz, G. (2013). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta.*

Gitlin, D., and Boesman, M. (1967). Sites of serum alpha-fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J. Clin. Invest.* 46, 1010–1016.

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

Guilbault, P., and Coraboeuf, E. (1965). [Action of calcium ions on the duration of the action potential of the ventricular fiber of the rat and guinea pig]. *J.*

Physiol. (Paris) 57, 618–619.

Gutkowska, J., Genest, J., Thibault, G., Garcia, R., Larochelle, P., Cusson, J.R., Kichel, O., Hamet, P., De Léan, A., and Cantin, M. (1987). Circulating forms and radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 16, 183–198.

Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 10, 32–42.

Holmes, R. (1967). Preparation from human serum of an alpha-one protein which induces the immediate growth of unadapted cells in vitro. *J. Cell Biol.* 32, 297–308.

Houser, S.R. (2009). Ca<sup>2+</sup> signaling domains responsible for cardiac hypertrophy and arrhythmias. *Circ. Res.* 104, 413–415.

Ieda, M., and Fukuda, K. (2009). Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Curr. Cardiol. Rev.* 5, 289–295.

Jensen, C.N., Ali, S.T., Allen, M.J., and Grogan, G. (2013). Mutations of an NAD(P)H-dependent flavoprotein monooxygenase that influence cofactor promiscuity and enantioselectivity. *FEBS Open Bio* 3, 473–478.

Juárez, U., Trejo, W., Whente, M., Contreras, G., Cárdenas, M., and Reyes, P.A. (1998). [The usefulness of determining myoglobin, creatine phosphokinase MB isoenzyme, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of acute myocardial infarct]. *Arch. Inst. Cardiol. México* 68, 214–217.

Kadambi, V.J., Ponniah, S., Harrer, J.M., Hoit, B.D., Dorn, G.W., 2nd, Walsh, R.A., and Kranias, E.G. (1996). Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97, 533–539.

Katz, A. M. (1992). *Physiology of the Heart* (Raven Press).



Kaye, D.M., Lefkovits, J., Jennings, G.L., Bergin, P., Broughton, A., and Esler, M.D. (1995). Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* *26*, 1257–1263.

Koga, K., Kenessey, A., and Ojamaa, K. (2013). Macrophage migration inhibitory factor antagonizes pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *304*, H282–293.

Komuro, I., Katoh, Y., Kaida, T., Shibazaki, Y., Kurabayashi, M., Hoh, E., Takaku, F., and Yazaki, Y. (1991). Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* *266*, 1265–1268.

Kotby, A.A., Taman, K.H., Sedky, H.T.A., Habeeb, N.M.M., El-Hadidi, E.S., and Yosseif, H.S. (2013). Atrial natriuretic peptide as a marker of heart failure in children with left ventricular volume overload. *J. Paediatr. Child Health* *49*, 43–47.

Kuwahara, K. (2013). Role of NRSF/REST in the Regulation of Cardiac Gene Expression and Function. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *77*, 2682–2686.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Laragh, J.H. (1985). Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. *N. Engl. J. Med.* *313*, 1330–1340.

Lattion, A.L., Michel, J.B., Arnauld, E., Corvol, P., and Soubrier, F. (1986). Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am. J. Physiol.* *251*, H890–896.

Ligeti, I. (1960). [Physiological cardiac enlargement]. *Orv. Hetil.* *101*, 598–601.

Lin, R.-Z., Wang, T.-P., Hung, R.-J., Chuang, Y.-J., Chien, C.-C.M., and Chang, H.-Y. (2011). Tumor-induced endothelial cell apoptosis: roles of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* *226*, 1750–1762.

Lindgren, I., and Altimiras, J. (2013a). Prenatal hypoxia programs changes in

$\beta$ -adrenergic signaling and postnatal cardiac contractile dysfunction. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *305*, R1093–1101.

Lompré, A.M., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.* *259*, 6437–6446.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., And Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.

Luethy, E., Scheu, H., Alsleben, U., Rothlin, M., Krayenbuehl, H.P., And Kako, K. (1964). [STROKE Volume And Pressure Loads In Compensated And Decompensated Hearts]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* *94*, 692–697.

Maier, L.S., and Bers, D.M. (2007). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.* *73*, 631–640.

Marber, M.S., Rose, B., and Wang, Y. (2011). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway--a potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *51*, 485–490.

Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblit, N., and Marks, A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* *101*, 365–376.

Maulik, S.K., and Kumar, S. (2012). Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicol. Mech. Methods* *22*, 359–366.

MEERSON, F.Z., and P OGOSOVA, A.V. (1962). [Incorporation of labelled amino acids into the total proteins and proteins of myocardial nuclei in compensated hyperfunction and hypertrophy of the heart]. *Vopr. Meditsinskoj Khimii* *8*, 621–624.

Mill, J.G., Novaes, M.A., Galon, M., Nogueira, J.B., and Vassallo, D.V. (1998). Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium

from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *76*, 387–394.

Mitra, A., Basak, T., Datta, K., Naskar, S., Sengupta, S., and Sarkar, S. (2013a). Role of  $\alpha$ -crystallin B as a regulatory switch in modulating cardiomyocyte apoptosis by mitochondria or endoplasmic reticulum during cardiac hypertrophy and myocardial infarction. *Cell Death Dis.* *4*, e582.

Molkentin, J.D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* *63*, 467–475.

Molkentin, J.D. (2006). Dichotomy of  $\text{Ca}^{2+}$  in the heart: contraction versus intracellular signaling. *J. Clin. Invest.* *116*, 623–626.

Molodtsov, A., Lindecker, A., Raupach, A., Moellendorf, S., Köhrer, K., and Gödecke, A. (2010). Myoglobin-deficient mice activate a distinct cardiac gene expression program in response to isoproterenol-induced hypertrophy. *Physiol. Genomics* *41*, 137–145.

Mudd, J.O., and Kass, D.A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* *451*, 919–928.

Naito, H., Melnychenko, I., Didié, M., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Rosenkranz, S., Eschenhagen, T., and Zimmermann, W.-H. (2006). Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* *114*, 172–78.

Nakao, K., Noguchi, T., Kim, J., Fukushima, K., Kiso, K., Ohara, T., Kanzaki, H., Hashimura, K., Yamada, N., Ishida, Y., et al. (2009). Transient constrictive pericarditis diagnosed by cardiac magnetic resonance,  $^{67}\text{Ga}$  scintigraphy, and positron emission tomography. *Int. J. Cardiol.* *137*, e70–72.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* *9*, 255–262.

Ni, L., Zhou, C., Duan, Q., Lv, J., Fu, X., Xia, Y., and Wang, D.W. (2011).  $\beta$ -AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure. *PLoS One* 6, e27294.

Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., et al. (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110, 705–712.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 552–565.

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

Park, Y.M., Park, M.Y., Suh, Y.-L., and Park, J.B. (2004). NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 812–817.

Parvatiyar, M.S., Landstrom, A.P., Figueiredo-Freitas, C., Potter, J.D., Ackerman, M.J., and Pinto, J.R. (2012). A mutation in TNNC1-encoded cardiac troponin C, TNNC1-A31S, predisposes to hypertrophic cardiomyopathy and ventricular fibrillation. *J. Biol. Chem.* 287, 31845–31855.

Piccoli, C., Ria, R., Scrima, R., Cela, O., D'Aprile, A., Boffoli, D., Falzetti, F., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2005). Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 26467–26476.

Pikula, A., Beiser, A.S., Chen, T.C., Preis, S.R., Vorgias, D., DeCarli, C., Au, R., Kelly-Hayes, M., Kase, C.S., Wolf, P.A., et al. (2013). Serum brain-derived

neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke J. Cereb. Circ.* *44*, 2768–2775.

Pinto, J.R., Siegfried, J.D., Parvatiyar, M.S., Li, D., Norton, N., Jones, M.A., Liang, J., Potter, J.D., and Hershberger, R.E. (2011a). Functional characterization of TNNC1 rare variants identified in dilated cardiomyopathy. *J. Biol. Chem.* *286*, 34404–34412.

Poggioli, J., Sulpice, J.C., and Vassort, G. (1986). Inositol phosphate production following alpha 1-adrenergic, muscarinic or electrical stimulation in isolated rat heart. *FEBS Lett.* *206*, 292–298.

Port, J.D., and Bristow, M.R. (2001). Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *33*, 887–905.

Prasad, A.M., and Inesi, G. (2011). Silencing calcineurin A subunit reduces SERCA2 expression in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *300*, H173–180.

Prigent-Tessier, A., Quirié, A., Maguin-Gaté, K., Szostak, J., Mossiat, C., Nappey, M., Devaux, S., Marie, C., and Demougeot, C. (2013). Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovasc. Res.* *100*, 374–382.

Rapp, J.P. (2000). Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol. Rev.* *80*, 135–172.

Rodacka, A. (2013a). [Properties and functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase]. *Postępy Hig. Med. Dośw. Online* *67*, 775–789.

Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C.N., and Singh, R. (2010). Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *61*, 269–280.

Roselló-Lletí, E., Alonso, J., Cortés, R., Almenar, L., Martínez-Dolz, L., Sánchez-Lázaro, I., Lago, F., Azorín, I., Juanatey, J.R.G., Portolés, M., et al. (2012a). Cardiac protein changes in ischaemic and dilated cardiomyopathy: a proteomic study of human left ventricular tissue. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 2471–2486.

Sadoshima, J., Jahn, L., Takahashi, T., Kulik, T.J., and Izumo, S. (1992). Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* *267*, 10551–10560.

Santacruz, L., Hernandez, A., Nienaber, J., Mishra, R., Pinilla, M., Burchette, J., Mao, L., Rockman, H.A., and Jacobs, D.O. (2013). NORMAL CARDIAC FUNCTION IN MICE WITH SUPRA-PHYSIOLOGICAL CARDIAC CREATINE LEVELS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*

Schwartz, K., de la Bastie, D., Bouveret, P., Oliviero, P., Alonso, S., and Buckingham, M. (1986). Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ. Res.* *59*, 551–555.

Seifried, O. (1931). HISTOLOGICAL STUDIES ON HOG CHOLERA: I. LESIONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *J. Exp. Med.* *53*, 277–287.

Selvais, P.L., Donckier, J.E., Robert, A., Laloux, O., van Linden, F., Ahn, S., Ketelslegers, J.M., and Rousseau, M.F. (1998). Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure: influences of left ventricular dysfunction and coronary artery disease on cardiac hormonal activation. *Eur. J. Clin. Invest.* *28*, 636–642.

Silverman, M.E., Grove, D., and Upshaw, C.B., Jr (2006). Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. *Circulation* *113*, 2775–2781.

Srivastava, P.M., Calafiore, P., Macisaac, R.J., Patel, S.K., Thomas, M.C., Jerums, G., and Burrell, L.M. (2008). Prevalence and predictors of cardiac hypertrophy and dysfunction in patients with Type 2 diabetes. *Clin. Sci. Lond.*

Engl. 1979 *114*, 313–320.

Stähle, I., Brizzio, C., Barile, M., and Brandsch, R. (1999). Anti-mitochondrial flavoprotein autoantibodies of patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy (anti-M7): interaction with flavin-carrying proteins, effect of vitamin B2 and epitope mapping. *Clin. Exp. Immunol.* *115*, 404–408.

Stenger, R.J., and Spiro, D. (1961). THE ULTRASTRUCTURE OF MAMMALIAN CARDIAC MUSCLE. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *9*, 325–351.

Sugden, P.H., Fuller, S.J., Weiss, S.C., and Clerk, A. (2008). Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br. J. Pharmacol.* *153 Suppl 1*, S137–153.

Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* *79*, 215–262.

Swynghedauw, B., Delcayre, C., Samuel, J.-L., Mebazaa, A., and Cohen-Solal, A. (2010). Molecular mechanisms in evolutionary cardiology failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1188*, 58–67.

Tsuchimochi, H., Yazaki, Y., Ohno, H., Takanashi, R., and Takaku, F. (1987). Ventricular expression of atrial natriuretic peptide. *Lancet* *2*, 336–337.

Wang, X., Liu, X., Wang, S., and Luan, K. (2012). Myofibrillogenesis regulator 1 induces hypertrophy by promoting sarcomere organization in neonatal rat cardiomyocytes. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* *35*, 597–603.

Warren, S.A., Briggs, L.E., Zeng, H., Chuang, J., Chang, E.I., Terada, R., Li, M., Swanson, M.S., Lecker, S.H., Willis, M.S., et al. (2012). Myosin light chain phosphorylation is critical for adaptation to cardiac stress. *Circulation* *126*, 2575–2588.

Wei, Y.F., Rodi, C.P., Day, M.L., Wiegand, R.C., Needleman, L.D., Cole, B.R., and Needleman, P. (1987). Developmental changes in the rat atriopeptin hormonal system. *J. Clin. Invest.* *79*, 1325–1329.

- Weikert, C., Eppenberger-Eberhardt, M., and Eppenberger, H.M. (2003). Cellular engineering of ventricular adult rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *59*, 874–882.
- Widgren, B.R., Persson, B., and Wikstrand, J. (1993). Reduced left ventricular distensibility in normotensive men with a positive family history of hypertension. *Am. J. Hypertens.* *6*, 750–757.
- Wilkins, B.J., and Molkentin, J.D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *322*, 1178–1191.
- Wuestefeld, R., Chen, J., Meller, K., Brand-Saberi, B., and Theiss, C. (2012). Impact of vegf on astrocytes: analysis of gap junctional intercellular communication, proliferation, and motility. *Glia* *60*, 936–947.
- Xu, Q. (2000). Biomechanical-stress-induced signaling and gene expression in the development of arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* *10*, 35–41.
- Yamaguchi, N., Chakraborty, A., Pasek, D.A., Molkentin, J.D., and Meissner, G. (2011). Dysfunctional ryanodine receptor and cardiac hypertrophy: role of signaling molecules. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *300*, H2187–2195.
- Yang, J.H., Polanowska-Grabowska, R.K., Smith, J.S., Shields, C.W., 4th, and Saucerman, J.J. (2013). PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to  $\beta$ -adrenergic signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Yasui, K., Niwa, N., Takemura, H., Opthof, T., Muto, T., Horiba, M., Shimizu, A., Lee, J.-K., Honjo, H., Kamiya, K., et al. (2005a). Pathophysiological significance of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: expression of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in fetal and diseased heart. *J. Pharmacol. Sci.* *99*, 205–210.
- Zamora, S., Adams, C., Butzner, J.D., Machida, H., and Scott, R.B. (1996). Elevated aminotransferase activity as an indication of muscular dystrophy: case reports and review of the literature. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* *10*, 389–393.



Zang, SC. 18 February 2012 Issue Contents - New Scientist. Something Nothing.

Zarain-Herzberg, A., Fragoso-Medina, J., and Estrada-Avilés, R. (2011). Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life* 63, 847-855.

Bertil Hille (2001). *Ion Channel of Excitable Membranes* (Sinauer Press).

Katz (1992). *Physiology of the Heart* (Raven Press).