

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELLA XAVIER MARETTO

**REMODELAMENTO VENTRICULAR DIREITO E ESQUERDO EM
FASE PRECOCE AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: UMA
VISÃO PROTEÔMICA**

VITÓRIA
2017

GABRIELLA XAVIER MARETTO

**REMODELAMENTO VENTRICULAR DIREITO E ESQUERDO EM
FASE PRECOCE AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: UMA
VISÃO PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo e Prof. Dr. José Geraldo Mill

VITÓRIA

2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES);
- Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo, alicerce da minha vida.

A toda minha família, por todo o incentivo e apoio, em especial meus pais, meu irmão, minha prima Mariana e minha tia Ana. Mari, se não fosse por você, meu período em BH não seria possível. Obrigada por ter me hospedado em sua casa e, mais do que isso, por todo apoio que você me deu.

Ao Kuster, pelo amor, companherismo e amizade. Obrigada por me incentivar em todos os meus projetos.

Os meus mais sinceros agradecimentos aos meus professores orientadores: Suely Gomes de Figueiredo e José Geraldo Mill, pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos passados. Dois gigantes, exemplos de dedicação incondicional à docência e à pesquisa, foi um privilégio poder ter sido aluna de vocês.

Aos companheiros de Laboratório, Pedrinho, Fabiana, Helena, Thiago, Alan, Gustavo, Juliana e aos que passaram pelo laboratório e seguiram outros caminhos profissionais, Tatá, Vinícius, Clarissa e Dani. Obrigada a todos pelo apoio, conhecimento, amizade e pelas ótimas risadas.

A todos do laboratório do professor José Geraldo Mill, em especial a Enildo Broetto pela amizade e por todo apoio nos experimentos cardiovasculares.

À Prof.^a Helida da UFMG por abrir as portas de seu laboratório e por todo apoio na execução das análises proteômicas. Obrigada por tudo.

À aluna Ivana Rocha, por todo suporte na realização do 2D-DIGE. Obrigada pela amizade e por todos os ensinamentos que me passou.

À Prof.^a Márcia Borges da FUNED por também disponibilizar o seu laboratório para os experimentos realizados nesse trabalho. Obrigada pela amizade e apoio.

À aluna Tatiane Barreto pela colaboração mútua nos experimentos realizados em Belo Horizonte. E mais do que isso, pela amizade que nasceu dessa parceria científica. Agradeço muito a Deus por ter te conhecido. Obrigada amiga por tudo.

Ao aluno Rodrigo Paralelogramo pelo apoio nas análises realizadas no programa STRING. Obrigada pela colaboração e pela amizade.

Ao Dr. Jonas Henrique A. Perales e Dr. André Ferreira pela realização das análises de espectrometria de massa (Fiocruz- RJ). Obrigada pela parceria e apoio.

À Prof.^a Elenice, em memória, pelo investimento financeiro que nos possibilitou a compra dos corantes fluorescentes DIGE.

Aos professores do Programa de Pós-graduação por todo o conhecimento adquirido durante esses anos, a todos colegas de pós-graduação e funcionários do Programa.

Às agências de fomento à pesquisa, CNPQ, CAPES e FAPES.

A todos os que participaram, não só desse trabalho, mas de minha trajetória de vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama das principais vias envolvidas no remodelamento cardíaco.....	18
Figura 2: Desenho experimental.....	28
Figura 3: Fluxograma das etapas experimentais utilizadas na análise proteômica.....	32
Figura 4: Perfil protéico de amostras de VD dos animais do grupo IM.....	44
Figura 5: Perfil protéico de amostras de VE dos animais do grupo IM.....	44
Figura 6: Perfil protéico de amostras de VD dos animais do grupo SHAM.....	45
Figura 7: Perfil protéico de amostras de VE dos animais do grupo SHAM.....	45
Figura 8: Imagem dos géis da análise proteômica comparativa 2D-DIGE dos ventrículos do grupo SHAM e o grupo IM (Géis 1,2,3).....	47
Figura 9: Imagem dos géis da análise proteômica comparativa 2D-DIGE dos ventrículos do grupo SHAM e o grupo IM (Géis 4,5,6).....	48
Figura 10: Gel representativo mostrando a localização dos <i>spots</i> que foram identificados no MALDI-TOF-TOF.....	53
Figura 11: Rede de interações das proteínas identificadas e agrupamento de acordo com suas classificações funcionais por meio do programa STRING....	54
Figura 12: Avaliação da expressão proteica da desmina no VE e VD 7 dias após o infarto.....	55
Figura 13: Representação esquemática dos filamentos intermediários da desmina.....	62
Figura 14: Imagens do citoesqueleto do tecido cardíaco de cães obtidas por microscopia confocal.....	65
Figura 15: Esquema de vias hipotéticas para a formação dos oligômeros de desmina.....	66
Figura 16: Controle da degradação das proteínas deformadas pelas <i>chaperonas</i> moleculares.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho experimental do 2D-DIGE.....	35
Tabela 2: Parâmetros morfométricos avaliados sete dias após a cirurgia.....	41
Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos avaliados sete dias após a cirurgia.....	42
Tabela 4: Parâmetros hemodinâmicos e ponderais dos animais infartados classificados como insuficientes utilizados na análise proteômica.....	43
Tabela 5: Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intra-grupos.....	46
Tabela 6: Identidade dos “spots” proteicos com intensidades diferentes ($p \leq 0,05$) entre os grupos IM e SHAM identificados por MS e MS/MS. Homologia com a taxonomia <i>Rattus norvegicus</i>	50
Tabela 7: Identidade das proteínas analisadas no programa STRING.....	54

RESUMO

O remodelamento ventricular pós-infarto é um processo dinâmico e complexo que ocorre em resposta ao dano no miocárdio. Entretanto, pouco se sabe sobre alterações no proteoma das câmaras cardíacas no remodelamento na fase precoce ao infarto e no desenvolvimento da insuficiência cardíaca. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações protéicas no remodelamento dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) de ratos Wistar com sinais de insuficiência cardíaca, 7 dias pós-infarto, utilizando análise proteômica – DIGE comparativa e espectrometria de massa. O infarto foi obtido por oclusão da artéria coronária esquerda e a insuficiência cardíaca confirmada pela análise da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo ≥ 15 mmHg; aumento da razão da massa do pulmão/massa corporal e presença de hipertrofia do VD, com concomitante redução dos índices de contratilidade e relaxamento do VE. A análise quantitativa revelou diferenças na intensidade/expressão de 20 proteínas no VD e 11 no VE dos animais infartados com sinais de insuficiência cardíaca ($p < 0.05$), 14 dessas proteínas foram identificadas por MALDI-TOF/TOF. Alterações foram detectadas em proteínas: do metabolismo energético (carboidratos, lipídeos, aminoácidos e fosforilação oxidativa), proteínas de choque térmico, proteínas estruturais e funções diversas. As alterações incluem modulações adaptativas e mal adaptativas e foram diferentes entre as câmaras. Foi observado aumento da expressão da desmina (proteína do filamento intermediário), e diminuição da expressão da creatina quinase e de proteínas envolvidas no metabolismo energético. Estas modulações foram mais expressivas no VE e podem ser associadas ao prejuízo na contratilidade e relaxamento observado somente nesta câmara. Por outro lado, um menor índice de aumento da desmina e aumento das proteínas de choque térmico, (alfa-b-cristalina e HSP-71) foram observados no VD, consideradas modulações adaptativas que podem ser associadas à preservação da maquinaria contrátil observadas no VD. Ainda mostraram, pela primeira vez, alterações no proteoma do VD de animais com insuficiência cardíaca. Os resultados mostraram que as câmaras cardíacas apresentam remodelamento protéico diferente sete dias pós-infarto, que pode refletir no comprometimento distinto das câmaras, e sugerem que o índice de aumento da desmina mostra uma correlação positiva com o grau de comprometimento da função ventricular.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, proteoma, remodelamento, ventrículo esquerdo, ventrículo direito.

ABSTRACT

Post-infarction ventricular remodeling is a dynamic and complex process that occurs in response to myocardial damage. However, little is known about changes in the proteome of the cardiac chambers in the early phase remodeling after infarction and in the development of heart failure (IM-CI). The objective of this study was to evaluate protein changes in right ventricular (RV) and left ventricular (LV) remodeling of rats with signs of heart failure, 7 days after infarction, using proteomic analysis - comparative DIGE and mass spectrometry. The infarction was obtained by occlusion of the left coronary artery and heart failure confirmed by the analysis of the left ventricular end-diastolic pressure ≥ 15 mmHg; increased lung mass / body mass ratio and presence of RV hypertrophy, with concomitant reduction in LV contractility and relaxation indexes. The quantitative analysis revealed differences in intensity / expression of 20 proteins in the RV and 11 in the LV of the infarcted animals with signs of heart failure ($p < 0.05$), 14 of these proteins were identified by MALDI-TOF / TOF. Changes were detected in proteins related to energy metabolism (carbohydrates, lipids, amino acids and oxidative phosphorylation), heat shock proteins, muscle contraction and structural proteins and diverse functions. The changes included adaptive and maladaptive modulations and were different between the chambers. It was observed increased expression of desmin (intermediate filament protein), and decreased expression of creatine kinase and proteins involved in energy metabolism. These modulations were more expressive in the LV and may be associated with impairment in contractility and relaxation observed only in this chamber. On the other hand, a lower index of increase of the desmin and increase of the heat shock proteins (α -b-crystalline and HSP-71) were observed in the RV, considered adaptive modulations that can be associated to the preservation of the contractile machinery of the RV. The results showed that cardiac chambers present different protein remodeling 7 days after infarction, which may reflect the distinct impairment of the chambers, and suggest that the increase in desmin shows a positive correlation with the dysfunction ventricular. They also showed, for the first time, alterations in the RV proteome of animals with heart failure.

Key words: myocardial infarction, heart failure, proteome, remodeling, left ventricle, right ventricle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Aspectos Epidemiológicos das Doenças Cardiovasculares.....	13
1.2. Fisiopatologia do Infarto Agudo do Miocárdio e da Insuficiência Cardíaca	13
1.3. Proteômica.....	21
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral:	27
2.2. Objetivos específicos:.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Aspectos éticos	28
3.2. Animais de Experimentação.....	28
3.3. Desenho experimental:	28
3.3.1. Protocolo – 7 dias após o infarto do miocárdio.....	28
3.4. Indução do Infarto do Miocárdio e separação dos grupos experimentais	29
3.5. Medidas de Parâmetros Hemodinâmicos	30
3.6. Obtenção das amostras para avaliar a área de Infarto e análise proteômica.....	31
3.7. Obtenção do extrato proteico dos ventrículos e dosagem do conteúdo proteico. 32	
3.8. Eletroforese bidimensional (2DE).....	33
3.8.1. Focalização isoeletrica (1ª dimensão).....	33
3.8.2. Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas.....	33
3.8.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida - (2ª dimensão).....	33
3.8.4. Aquisição, processamento e análise das imagens.....	34
3.9. Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE).....	35
3.9.1. Marcação das amostras com os corantes fluorescentes	35
3.9.2. Primeira Dimensão - Focalização Isoeletrica	35
3.9.3. Segunda Dimensão - SDS-PAGE.....	36
3.9.4. Processamento de Imagens e Análise Estatística	36
3.10. Identificação das proteínas	37
3.10.1. Digestão das proteínas, extração dos peptídeos e análise por espectrometria de massa.....	37
3.10.2. Pesquisa em banco de dados.....	39
3.11. Análise das interações proteína-proteína (Banco de Dados – STRING).....	39
3.12. Validação da análise proteômica	39
3.13. Análise estatística	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Medidas Ponderais e Hemodinâmicas.....	41

4.2. Análise Proteômica:.....	43
4.2.1. Eletroferese Bidimensional (2D-Coomassie):.....	43
4.2.2. Eletroforese Diferencial em Gel Bidimensional (2D- DIGE):	46
4.3. Validação da intensidade da desmina.....	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7. REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Epidemiológicos das Doenças Cardiovasculares

A doença cardiovascular (DCV) é o principal motivo de morte no mundo: anualmente, morrem mais pessoas de doenças cardiovasculares do que de qualquer outra causa (OMS, 2015). Estima-se que 17,3 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2013, representando mais de 30% de todos os óbitos no mundo (OMS, 2013).

As manifestações clínicas mais comuns das DCV incluem: infarto agudo do miocárdio (IAM); insuficiência cardíaca (IC); acidente vascular cerebral (AVC); angina, morte súbita; cardiomiopatias e hipertensão. Entre elas, o infarto agudo do miocárdio é considerado uma das maiores causas de morbidade e mortalidade. As consequências econômicas e sociais das mortes por IM agravam-se quando se constata que os índices de mortalidade aumentam significativamente dentre as pessoas na fase economicamente ativa. Assim, muitos indivíduos de uma faixa etária onde é grande o retorno social pelo trabalho, vão a óbito, ou sobrevivem com graus variados de incapacidade física.

Outra DCV onerosa em termos econômicos e sociais é a insuficiência cardíaca. No Brasil, dados obtidos do DATASUS demonstram que apenas no ano de 2012 houve 26.694 óbitos por IC. Para o mesmo ano, das 1.137.572 internações por doenças do aparelho circulatório, em torno de 21% foram devidas à IC (DATASUS, 2013).

1.2. Fisiopatologia do Infarto Agudo do Miocárdio e da Insuficiência Cardíaca

O IAM corresponde a um quadro clínico de isquemia miocárdica, a qual é desencadeada quando o fluxo de sangue arterial é insuficiente para suprir as necessidades metabólicas do coração, principalmente as de oxigênio. Em outras palavras, resulta de um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de

oxigênio e nutrientes, que na grande maioria dos casos é resultado de uma obstrução das coronárias, em geral, causada por trombose e/ou vasoespasmo sobre uma placa aterosclerótica.

Para melhor compreensão da fisiopatologia do IAM e de outras doenças cardíacas, estudos em laboratórios com modelos animais, principalmente em ratos, têm sido utilizados para simular as doenças e as condições peculiares a cada processo patológico. Johns & Olson (1954) foram os primeiros a descrever o modelo experimental de infarto do miocárdio em ratos. A partir das décadas de 70 e 80, estudos científicos acrescentaram importantes dados referentes à disfunção ventricular e área de infarto após a lesão artificial do miocárdio. Pfeffer e colaboradores, 1979, observaram que o tamanho da área da lesão causada pelo infarto do miocárdio apresenta grande importância para as alterações hemodinâmicas ventriculares, sendo este um dos motivos para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Pfeffer *et al.*, 1979). Entretanto, estudos mais recentes mostraram que ratos infartados com áreas de cicatriz entre 30-50% no ventrículo esquerdo nem sempre desenvolvem sinais típicos de IC, como congestão pulmonar e aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (Stefanon *et al.*, 2013). De fato, as mudanças sofridas pelo coração após o evento isquêmico são complexas e dinâmicas, e que nem sempre irão evoluir para um quadro típico de IC. Essas modificações, também chamadas de remodelamento, afetam principalmente o ventrículo esquerdo (VE) e acarretam em perda da função contrátil do miocárdio (Pfeffer *et al.*, 1990).

Segundo Erlebacher *et al.* (1984) e Pfeffer *et al.* (1990), o remodelamento pós-infarto é caracterizado por hipertrofia dos miócitos, dilatação da câmara ventricular e acúmulo de colágeno em áreas remotas ao local do infarto, e pode ser dividido em duas fases: (i) a precoce que se inicia em algumas horas após o infarto, perdura por várias semanas e envolve a expansão da zona de infarto, incluindo dilatação e diminuição da espessura da zona de infarto; (ii) a fase tardia que pode durar meses ou até anos (Mitchell *et al.*, 1992). Esta última envolve globalmente o VE e está associada com uma dilatação tempo-dependente, distorção da forma ventricular, hipertrofia, bem como mudanças

estruturais no tecido. Inicialmente, a dilatação do VE poderia ser considerada como um mecanismo protetor para manutenção do fluxo sistólico e da função da bomba cardíaca. Entretanto, esse fenômeno acaba por conduzir alterações na função global do VE, que evolui para a insuficiência cardíaca.

O remodelamento ventricular pós-infarto envolve alterações estruturais e moleculares em áreas isquêmicas e remotas não-isquêmicas do miocárdio. Esse processo inicia-se com a morte celular tanto por necrose quanto por apoptose no miocárdio isquêmico, sendo a apoptose o fenômeno que interfere ativamente no processo de remodelamento após o infarto (Kajstura *et al.*, 1996; Palojoki *et al.*, 2001). Estudo recente realizado em animais experimentais mostrou que a redução da apoptose nas primeiras vinte e quatro horas que se seguem à oclusão da artéria coronária esquerda é capaz de reduzir a extensão da lesão, atenuando a dilatação ventricular e a progressão para a IC (Baldo *et al.*, 2011).

Além da apoptose, outro fenômeno importante que acontece no processo de remodelamento é a resposta inflamatória, a qual está intimamente associada a efeitos deletérios sobre a função e estrutura cardíaca (Jiang & Liao, 2010). Essa resposta acontece após a fase de injúria e morte celular através da mobilização e infiltração celular, com a degradação do colágeno seguido por sua síntese no intuito de reparar o tecido cardíaco lesionado (Frangogiannis, 2006). Esse processo envolve alterações fenotípicas em miócitos e na matriz extracelular que resultam em fibrose do miocárdio (Sutton e Sharpe, 2000). Stefanon e colaboradores (2013) observaram que o aumento da matriz extracelular pós-infarto traz sérias consequências sobre as propriedades de contratilidade e relaxamento do tecido cardíaco. Como o colágeno cobre aproximadamente 3% do volume miocárdio, sendo o principal componente responsável pela rigidez das câmaras cardíacas, alterações em seu conteúdo e distribuição culminam com grandes alterações nas propriedades passivas da parede miocárdica (Robinson *et al.*, 1988).

A parede do coração sofre também com o estresse gerado pela sobrecarga de volume decorrente da perda da massa ventricular infartada. O estresse gerado

sobre a câmara cardíaca favorece o aumento da área ventricular e a hipertrofia da massa ventricular remanescente acompanhada pela dilatação da câmara cardíaca (Opie *et al.*, 2006).

A hipertrofia cardíaca patológica é frequentemente descrita como sendo acompanhada de reativação de genes fetais, que incluem *upregulation* da cadeia pesada da beta miosina (MHC- β), alfa actina esquelética (SKA) e genes do fator natriurético atrial (ANF), genes que modificam o metabolismo energético, e finalmente, os que aumentam a expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina próprio do coração. Embora a reativação deste programa gênico fetal seja considerada uma resposta adaptativa ao estresse, está claro que a expressão destes genes leva a mudanças mal-adaptativas da função cardíaca (ver revisão: Samak *et al.*, 2016).

Tanto a hipertrofia como as demais alterações, como morte celular, dilatação ventricular, disfunção contrátil estão diretamente relacionadas com hiperatividade do sistema nervoso simpático (Marano *et al.*, 2002; Prabhu *et al.*, 2003; Machackova *et al.*, 2010). Esse aumento da atividade simpática pode ser evidenciado pelo aumento da frequência cardíaca durante a fase aguda do infarto (Mill *et al.*, 1991) e pelos níveis plasmáticos e teciduais de catecolaminas aumentadas após o infarto do miocárdio em ratos (Ganguly *et al.*, 1997). Além da vertente neural na resposta adaptativa existe também a participação humoral (sistema renina-angiotensina-aldosterona), os quais visam manter o débito cardíaco em valores normais. Após o infarto, a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) aumenta no plasma e no miocárdio, junto com a elevação nos níveis de angiotensina II (ANG II) no coração (Busatto *et al.*, 1997; Resende *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). É importante mencionar que ativação neurohumoral exacerbada e prolongada conduz progressivamente à falência miocárdica.

A ativação neural β -adrenérgica envolve a ativação da proteína quinase A (PKA) e consequente regulação das proteínas Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (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 retículo sarcoplasmático (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, isquemia e cardiomiopatia dilatada (Marx *et al.*, 2000; Bers, 2002).

Diversas vias de sinalização celular são responsáveis pelo remodelamento cardíaco. Os mecanismos de membrana, ativados por estímulos de natureza mecânica, hormonal ou parácrina/autócrina, ativam vias de crescimento celular que se constituem de uma ou mais enzimas com características de GTPases e/ou quinases, ativadas em cascatas que, por sua vez, ativam fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão gênica. A especificidade da relação estímulo resposta nesse processo é basicamente determinada pelos mecanismos transmembrana e pela interação entre fatores de transcrição e promotores gênicos.

As principais vias de sinalização responsáveis pelo remodelamento cardíaco envolvem a modulação da proteína G (G α q, G α s e da família Rho) resultando na ativação de fosfolipase C, adenilato e guanilil ciclasas e, conseqüentemente, modulação de quinases e fosfatases. Calcineurina é a peça-chave da transdução da fosfatase, enquanto quinases como: quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) e quinases ativadas por mitógenos (MAPK) parecem ter papel no crescimento celular, e proteína quinase G (PKG) no controle anti-hipertrófico. Adenilato ciclase e proteína quinase A (PKA) regulam a contratilidade do miócito juntamente com a proteína quinase C- α (PKC α). Esses sinais culminam em alteração da transcrição, que incluem indução de genes fetais e relacionados ao crescimento celular (Kehat e Molkenin, 2010) (Figura 1).

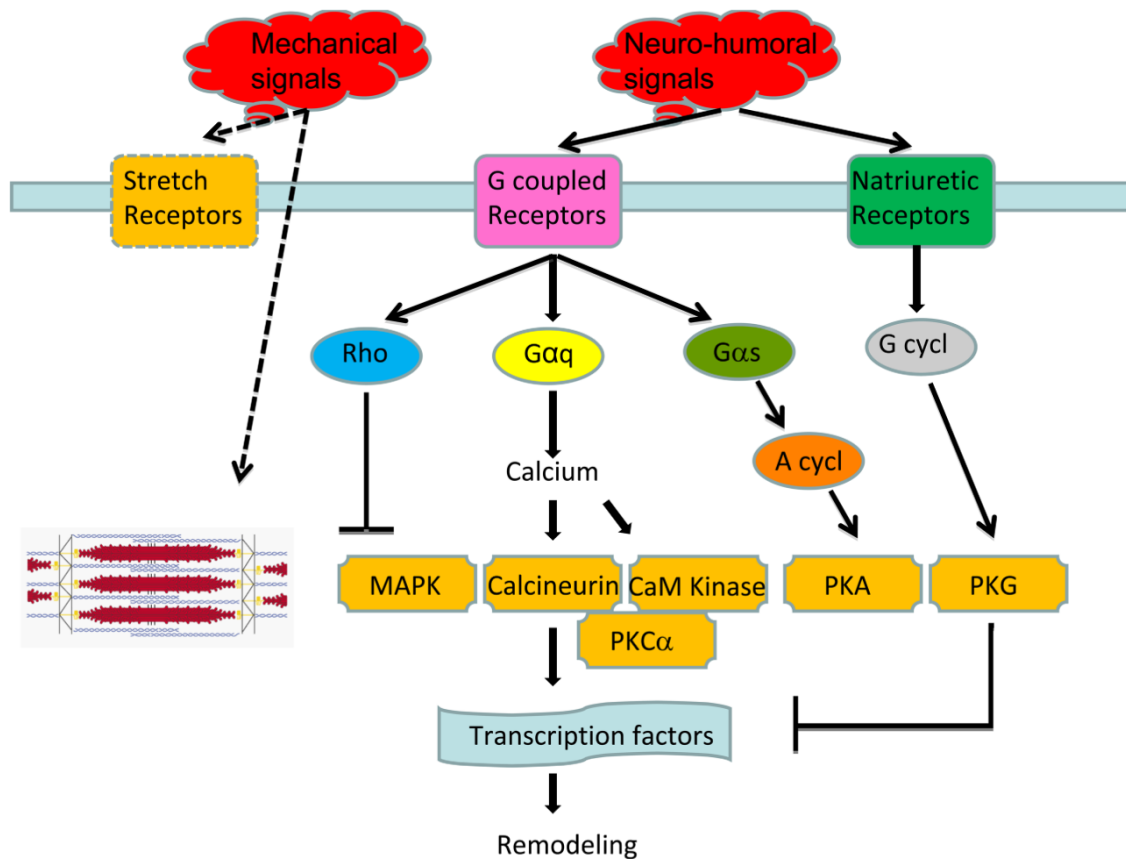


Figura 1: Diagrama das principais vias envolvidas no remodelamento cardíaco. (Kehat e Molkenin, 2010)

Esse processo de remodelamento está relacionado ao prejuízo no desempenho do músculo cardíaco, que é uma característica típica da insuficiência cardíaca (Dhalla *et al.*, 1993), a qual pode ser definida como sendo uma síndrome clínica decorrente da incapacidade de o coração manter suficiente volume de ejeção para manutenção das necessidades metabólicas do organismo (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009).

As alterações hemodinâmicas comumente encontradas na IC envolvem resposta inadequada do débito cardíaco e elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica. De início este comprometimento do débito cardíaco se manifesta durante o exercício, e com a progressão da doença ele diminui no esforço até ser observado sua redução no repouso. O mecanismo responsável pelos sintomas e sinais clínicos pode ser decorrente da disfunção sistólica, diastólica ou de ambas, acometendo um ou ambos os ventrículos (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009).

Muitas pesquisas enfatizam a insuficiência do ventrículo esquerdo (VE) e seu efeito sobre a morbidade e mortalidade dos pacientes. Pouca atenção tem sido dada a ventrículo direito (VD) e sua disfunção. Relatório de 2006 do *National Heart, Lung, and Blood Institute* identificou uma grande lacuna nos esforços de investigação do ventrículo direito e sua importância clínica comparada ao ventrículo esquerdo (Voelkel *et al.*, 2006). Recente mudança de paradigma é alimentada pelo valor de prognóstico atribuído à falência do VD na IC e morbidade / mortalidade após infarto do miocárdio e cirurgia.

A mortalidade em pacientes com IC com VD dilatado é quase o triplo comparada a pacientes sem dilatação do VD, e seu VE se deteriora mais rapidamente (Sun *et al.*, 1997). A disfunção ventricular direita agrava o quadro de insuficiência cardíaca nos casos de função sistólica reduzida do ventrículo esquerdo (Puwanant *et al.*, 2009). No desenvolvimento da IC após infarto do miocárdio, a diminuição da função sistólica do VD é um fator de risco para morte, morte súbita, IC e acidente vascular cerebral (Anavekar *et al.*, 2008; Samad *et al.*, 2002; Zornoff *et al.*, 2002).

Na IC, alguns mecanismos patogênicos são comuns na disfunção e insuficiência de ambos os ventrículos. Insuficiências do VD e VE ativam o sistema renina-angiotensina-aldosterona (Bolger *et al.*, 2002) e libera endotelina (Mulder *et al.*, 1997) e peptídeos natriuréticos (Bogaard *et al.*, 2009; Nagaya *et al.*, 2000). Isso resulta em consequências e efeitos fisiopatológicos semelhantes.

Ao mesmo tempo, a adaptação hemodinâmica do VD é diferente do VE, pois os dois são estruturalmente e funcionalmente diferentes. Anatomicamente, VD é mais fino do que VE, com uma espessura de parede de 3-5 mm. Essa característica faz com que o VD seja menos adequado para aumento da pós-carga do que o aumento da pré-carga. Essa característica também é responsável pela diferença na sua circulação arterial. O VE é perfundido principalmente na diástole, enquanto o VD é perfundido continuamente, tanto na sístole quanto na diástole. No entanto, quando a pressão do VD aumenta, a

perfusão torna-se em sua maior parte diastólica, o que provoca isquemia e contribui para a sua insuficiência. As paredes finas do VD também são responsáveis por uma maior complacência dessa câmara, permitindo acomodar uma variedade de volumes (Sarnoff e Berglund, 1954; Konstam *et al.*, 1984).

Clinicamente, a insuficiência do VD gera congestão e retenção de fluidos na circulação sistêmica, incluindo edema periférico, ascite, derrames pleural e pericárdico. Congestão hepática também tem sido associada à falência do VD. Nesse caso, os níveis de aminotransferase podem ser de duas a três vezes mais elevadas do que o valor normal em até um terço dos pacientes com IC (Cohen e Kaplan, 1978).

Pode-se observar que o remodelamento do VD é uma característica ubíqua tanto em doenças cardiovasculares quanto pulmonares. A HP é caracterizada pela alta resistência vascular pulmonar e remodelamento vascular, o que resulta em aumento marcante na pós-carga do VD e subsequente prejuízo na função contrátil (Galie *et al.*, 2009). Em pacientes com hipertensão pulmonar primária, a função do VD é melhor preditor de sobrevivência do que a pressão arterial pulmonar ou resistência vascular pulmonar (McLaughlin *et al.*, 2009). No entanto, na insuficiência ventricular esquerda, a função do VD é um preditor independente de sobrevivência (Ghio *et al.*, 2001).

A disfunção ventricular direita decorrente de uma cardiomiopatia isquêmica é frequentemente associada à insuficiência do VE, a qual ocasiona hipertensão pulmonar (HP) e aumento da pós-carga do VD, culminando no remodelamento e disfunção dessa câmara. Além disso, infarto ou isquemia do VD e/ou o septo são comuns em pacientes com IAM e também pode contribuir para a disfunção sistólica do VD (Haddad *et al.*, 2008).

Diante da complexidade de todos esses eventos envolvidos no remodelamento ventricular, atualmente, as pesquisas científicas têm buscado compreender esses fenômenos sob a ótica molecular. Sobre o IAM, os estudos se voltam aos mecanismos envolvidos, por exemplo, no controle da apoptose cardíaca,

nas alterações metabólicas e de produção de energia celular, nas modificações na expressão de proteínas que controlam a atividade contrátil e de relaxamento na célula cardíaca (Dahlla *et al.*, 2006).

Uma importante ferramenta utilizada para compreensão desse mundo sub-celular é a proteômica. As técnicas envolvidas nessa abordagem possibilitam mapear vias metabólicas celulares e identificar moléculas que podem ser utilizadas no futuro como alvos de drogas específicas ou como marcadores biológicos.

1.3. Proteômica

Proteômica corresponde ao estudo do “proteoma”: proteínas complementares ao genoma. O termo proteoma foi criado por Marc Wilkins na década de 90 e refere-se ao conjunto de todas as proteínas presentes em uma célula ou em um organismo, num dado momento, tanto as traduzidas a partir das sequências genômicas, quanto das proteínas resultantes de processos pós-transcricionais (por exemplo, *splicing* alternativo) e processamentos pós-traducionais (por exemplo, fosforilação, glicosilação e oxidação) (Wasinger *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1996). Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e varia de acordo com o tipo e o estado funcional da célula (Apweiler *et al.*, 2009).

As proteínas estão diretamente envolvidas em praticamente todos os processos celulares, influenciando o fenótipo celular e, portanto, o tecido ou órgão. Este fenótipo varia sob condições fisiológicas normais (por exemplo, a fase do ciclo celular, diferenciação, função e idade) ou em resposta a *stress* fisiopatológico (Lam *et al.*, 2006).

Atualmente, com o surgimento de novas técnicas proteômicas, análise do proteoma tornou-se mais efetiva, culminando com a produção de novos conhecimentos. O recente progresso de metodologias nessa área tem aberto novas oportunidades para obtenção de informações relevantes sobre os processos fisiológicos e patológicos que ocorrem no organismo humano (Barbosa *et al.*, 2012), ao permitir o mapeamento de vias metabólicas celulares

e identificação de moléculas, que poderão ser utilizadas como alvos de drogas específicas ou como marcadores biológicos. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (Rocha *et al.*, 2005).

As técnicas proteômicas podem ser usadas como ferramentas para comparar distintos grupos experimentais (tratado/controle; doente/sadio) na identificação de proteínas diferencialmente expressas (proteômica comparativa) (Lam *et al.*, 2006), possibilitando sugerir mecanismos. Com isso a proteômica comparativa fornece informações valiosas que poderão ser usadas no diagnóstico, tratamento médico, e prognóstico (Juan *et al.*, 2012).

Uma abordagem proteômica básica, por gel de eletroforese bidimensional (2DE), é composta pelas seguintes etapas: preparo das amostras, separação das proteínas, aquisição de imagens e identificação das proteínas (Lam *et al.*, 2006).

A separação das proteínas por 2DE acontece na primeira etapa de acordo com o seu ponto isoelétrico e na segunda, de acordo com a sua massa molecular no gel de poliacrilamida.

Após a separação dessas biomoléculas, os spots proteicos são visualizados por meio de métodos específicos de coloração. Os métodos mais utilizados incluem coomassie, nitrato de prata e corantes fluorescentes. Posteriormente à coloração do gel bidimensional, é produzida uma imagem digital do perfil proteico e a sua análise é executada utilizando-se *softwares* especializados, capaz de quantificar o tamanho e a intensidade dos *spots* proteicos. Com a utilização de ferramentas de bioinformática, o material de fundo ou *background* é subtraído, os *spots* comparados e os dados normalizados e analisados estatisticamente para quantificação de volumes protéicos ou intensidades (Dowsey *et al.*, 2003). O fracionamento, resolução das proteínas, depende do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado. A continuidade do processo se dá pela identificação das proteínas de interesse, para isto, os spots proteicos são removidos e digeridos no gel com tripsina. Os fragmentos trípticos

resultantes são extraídos do gel e analisados por espectrometria de massas (MS). Uma das técnicas espectrométricas utilizadas no estudo de moléculas biológicas é a espectrometria de massa com base na dessorção e ionização das proteínas com laser, auxiliado por uma matriz (MALDI- *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (TOF- *Time of Flying*). Esse método analisa a massa de fragmentos peptídicos obtidos da digestão das proteínas com uma enzima proteolítica, como a tripsina. O padrão de massas obtido (*peptides mass fingerprint*) é comparado em banco de dados para a identificação das proteínas.

Uma inovação da técnica 2DE clássica, a qual foi usada neste trabalho, é a eletroforese diferencial em gel bidimensional (*Fluorescent 2-D Differential In-Gel Electrophoresis - 2-D DIGE*). Neste processo amostras de grupos experimentais são marcadas individualmente com um corante fluorescente de cianina reativos (Cy2, Cy3 e Cy5 – ligam-se covalentemente com a amina do radical da lisina). Esta marcação permite que as amostras experimentais possam ser submetidas às mesmas condições de corrida no mesmo gel, diminuindo a variabilidade experimental (Unlu *et al.*, 1997). Esta técnica é extremamente sensível (~125 pg de proteína) devido aos corantes fluorescentes empregados, permitindo a utilização de pequenas quantidades de proteínas para a análise dos spots.

Nos últimos anos, as metodologias e as tecnologias proteômicas têm progredido muito e alcançados níveis elevados de resolução e potencial de aplicação. A análise proteômica tem sido amplamente aplicada em várias áreas da ciência como: no estudo de tumores, envelhecimento, exercício físico e recentemente nas doenças cardiovasculares. Esta análise está na fronteira da ciência moderna e da tecnologia, fornecendo uma perspectiva global para a compreensão de muitos fenômenos fisiopatológicos importantes, uma vez que o conhecimento apenas do genoma não seria suficiente para inferir sobre o proteoma de um indivíduo.

Entretanto, quais são os benefícios dos estudos proteômicos para o controle de doenças humanas, em particular as cardiovasculares? A tecnologia proteômica permite a análise de uma forma global das alterações na expressão proteica na doença cardíaca, e pode fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos celulares envolvidos na disfunção cardíaca (Loscalzo, 2003). O uso dessa ferramenta para investigar a doença cardíaca pode resultar na descoberta de novos marcadores terapêuticos e de diagnósticos (McGregor e Dunn, 2006), os quais podem ser obtidos a partir de estudos realizados em uma gama de sistemas biológicos, que incluem pesquisa em humanos, modelos animais, e cultura de células (Lam *et al.*, 2006).

O primeiro estudo a utilizar uma abordagem proteômica para análise de tecido cardíaco data do fim da década de 90 (Arnott *et al.*, 1998). Desde então, houve um aumento contínuo do número de publicações (no *PubMed*) de estudos cardiovasculares que utilizaram essa abordagem (Van Eyk, 2011). Dentre essas pesquisas, as doenças cardíacas correspondem a um importante campo de estudo no que se refere à análise proteômica. Uma das doenças que tem sido abordada nesses estudos é o IAM e suas consequências, como o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Juan e colaboradores (2012) utilizaram uma abordagem proteômica para identificar diferenças no proteoma do VE de animais infartados, e demonstraram o envolvimento de proteínas relacionadas com o metabolismo energético, citoesqueleto, e proteínas antioxidantes neste processo fisiopatológico. Bernard e colaboradores (2008) utilizaram a eletroforese bidimensional para analisar o proteoma do VE de animais com insuficiência cardíaca crônica. Nesse estudo, os pesquisadores relacionaram as mudanças no proteoma do VE com os diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento da IC, especificamente metabolismo energético e estresse oxidativo. Nesse estudo, inclusive algumas proteínas identificadas (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, alfa B cristalina, peroxirredoxina-2 e isocitrato desidrogenase) foram apontadas como promissoras candidatas a novos marcadores ou novos mediadores no remodelamento do VE e na disfunção encontrada na insuficiência cardíaca.

A busca por marcadores de prognóstico também pode ser beneficiada pela abordagem proteômica. Haas e colaboradores, 2011, apontaram a haptoglobina como possível biomarcador de prognóstico quanto ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

De fato, diversos trabalhos proteômicos abrangendo IAM e insuficiência cardíaca têm sido publicados (Jacquet *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014, Mitra *et al.*, 2014; Zamilpa *et al.*, 2010), mas em grande parte desses estudos o foco é direcionado a análise proteômica do VE. Como já comentado, o IAM está relacionado a mecanismos compensatórios que envolvem não somente o VE, mas também o VD. Hipertrofia e apoptose são observadas no remodelamento biventricular de cardiomiócitos após o IAM (Patten *et al.*, 1998; Abbate *et al.*, 2008; Anversa *et al.*, 1991; Bussani *et al.*, 2003; Pfeffer e Braunwald; 1990).

Dados clínicos também evidenciam a relevância do VD frente ao IAM, por exemplo, em relação ao prognóstico de pacientes. Indivíduos com disfunção sistólica ventricular esquerda e insuficiência cardíaca com a presença de sinais e ou sintomas de insuficiência ventricular direita caracterizam subgrupo com um pior prognóstico (Anavekar *et al.*, 2008; Di Salvo *et al.*, 1995; Larose *et al.*, 2007; Oakley, 1998; Zornoff *et al.*, 2002).

Apesar da importância do VD para a homeostase cardio-circulatória, surpreendentemente pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares e patológicos da disfunção e remodelamento dessa câmara cardíaca frente ao IAM envolvendo o VE. Estudos sobre remodelamento do VD são poucos e as causas para dilatação e disfunção do VD permanecem desconhecidas (Haddad *et al.*, 2008).

Os dados disponíveis sobre a variação da expressão gênica e do proteoma do ventrículo direito, é derivado, em grande parte de uma variedade de modelos animais de HP (Drake *et al.*, 2011; Gomez-Arroyo *et al.*, 2013; Urashima *et al.*, 2008; Gupte *et al.*, 2016). Poucos são os trabalhos sobre proteoma do VD nas doenças cardiovasculares. Em uma pesquisa recente publicada por Su e

colaboradores (2015), eles analisaram o perfil proteico do VD de humanos em estágio final de insuficiência cardíaca. Nesse trabalho eles observaram diferenças na expressão de 7 proteínas ao comparar o grupo com insuficiência cardíaca decorrente de uma isquemia do grupo também insuficiente, entretanto, não-isquêmico. Em 2012, Cadete e colaboradores realizaram análise proteômica do VD e VE de animais submetidos ao modelo de isquemia-reperfusão (I/R). Os dados desse trabalho forneceram evidências de que os ventrículos direito e esquerdo respondem de forma diferente a I/R. Ao analisar os efeitos da isquemia no VD, foram encontradas 10 proteínas com diferentes intensidades, dos quais 5 são do metabolismo energético.

Nesse sentido, com o escopo de gerar novas informações sobre o processo de remodelamento dos tecidos ventriculares pós-infarto e na insuficiência cardíaca, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações protéicas encontradas nas câmaras cardíacas (VD e VE) de animais em fase precoce do infarto do miocárdio por 2-D DIGE acoplado a espectrometria de massa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Identificar alterações no proteoma das câmaras cardíacas (VD e VE) de ratos com sinais de insuficiência cardíaca, 7 dias pós-infarto, por 2D-DIGE comparativa acoplado a espectrometria de massa e tentar correlacioná-las com as alterações patofisiológicas observadas nesta doença.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar os parâmetros hemodinâmicos e ponderais dos animais experimentais (infartados e SHAM).
- Selecionar os animais com sinais de insuficiência cardíaca.
- Analisar a homogeneidade intra-grupo (SHAM e insuficientes) dos animais quanto às características hemodinâmicas e ponderais e quanto ao proteoma dos ventrículos, por géis preparativos (2DE – coomassie).
- Obter o perfil proteico por 2D-DIGE dos ventrículos dos animais (SHAM e infartados-insuficientes).
- Realizar análise comparativa dos perfis proteicos do VD e VE e identificar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de animais, por espectrometria de massas.
- Validar os dados da análise proteômica por *Western blot*.
- Correlacionar as proteínas identificadas com os danos causados no coração pelo infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

A utilização dos animais para o desenvolvimento deste projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde, segundo protocolo nº 041/2015.

3.2. Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 180 e 240 g, fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso a água e ração e em ambientes com controle de temperatura e luminosidade.

3.3. Desenho experimental:

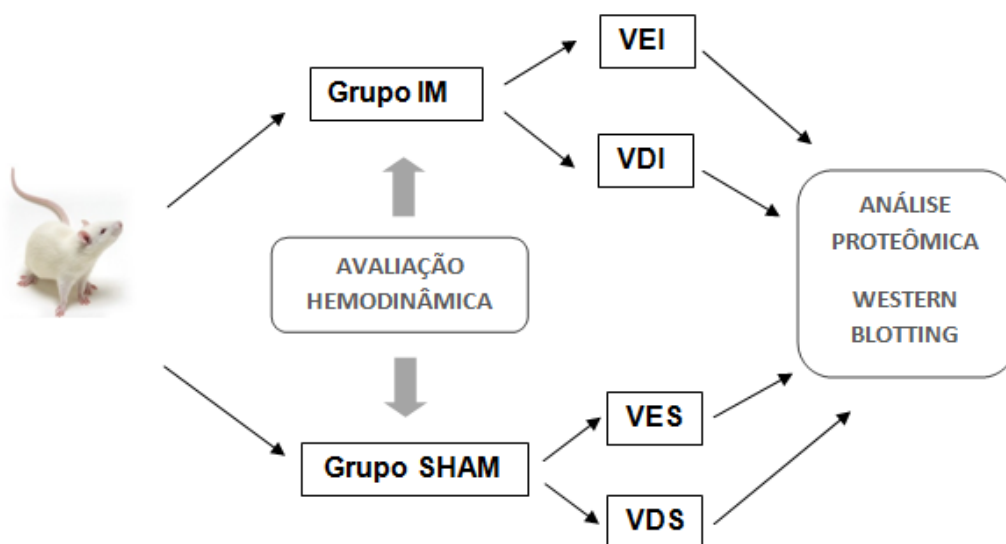


Figura 2: Desenho experimental.

3.3.1. Protocolo – 7 dias após o infarto do miocárdio

Os animais foram inicialmente separados em dois grupos, conforme o tipo de cirurgia realizada:

Grupo IM → animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão permanente da artéria coronária esquerda.

Grupo SHAM → animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não à oclusão da artéria coronária.

Após a realização da avaliação hemodinâmica, câmaras cardíacas foram separadas em VD e VE, obtendo-se os seguintes subgrupos:

VEI → VE dos animais pertencentes ao grupo IM.

VES → VE dos animais pertencentes ao grupo SHAM.

VDI → VD dos animais pertencentes ao grupo IM.

VDS → VD dos animais pertencentes ao grupo SHAM.

3.4. Indução do Infarto do Miocárdio e separação dos grupos experimentais

O infarto do miocárdio foi obtido pela oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda, seguindo a técnica padrão amplamente descrita na literatura (Pfeffer et al., 1979; Mill et al., 1990; Baldo et al., 2008).

O animal foi pesado e anestesiado com uma mistura contendo quetamina (50 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL) injetado por via intraperitoneal. Alcançado o plano anestésico desejável, o animal teve seus membros fixados a uma mesa cirúrgica, em posição supina. Com uma pequena depilação no lado esquerdo do tórax e adequada assepsia do local, foi realizada uma incisão na pele do animal para exposição e dissecação dos músculos intercostais. Uma sutura em forma de bolsa foi preparada

previamente para garantir o rápido fechamento da incisão cirúrgica após a ligadura coronariana. Vale ressaltar que o grupo controle (SHAM) foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligação da artéria coronariana. Após o procedimento, foi realizado o eletrocardiograma dos animais para a confirmação do infarto (presença de onda Q em D1, supra desnivelamento do segmento ST). A partir dessa avaliação, os animais foram separados dentro de 2 grupos: grupo SHAM, que sofreu cirurgia fictícia, e o grupo IM, que sofreu o infarto, conforme descrito no tópico 3.3 e confirmado com o eletrocardiograma. Esses animais foram acomodados em gaiolas com livre acesso a água e ração para recuperação da anestesia em uma sala com temperatura entre 20 e 23 °C.

3.5. Medidas de Parâmetros Hemodinâmicos

Após 7 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e anestesiados com uma injeção contendo quetamina (50 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL), via intraperitoneal. A artéria carótida direita e veia jugular direita foram dissecadas e canuladas com um cateter de polietileno (PE-50), o qual foi conectado a um transdutor de pressão (TSD104A-Biopac) acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP 36 Byopac System, Inc: CA-PC Pentium 4). O cateter introduzido na veia foi direcionado ao VD, e quando inserido na artéria, foi conduzido até o VE, a fim de se realizar os registros das pressões intraventriculares.

Foram registradas a pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS), pressão sistólica no ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDf VE), pressão sistólica do ventrículo direito (PSD), pressão diastólica final do ventrículo direito (PDf VD), frequência cardíaca (FC) e a primeira derivada de pressão positiva e negativa do ventrículo direito e do ventrículo esquerdo ($dP/dt+$ VE, $dP/dt-$ VE, $dP/dt+$ VD e $dP/dt-$ VD).

Após avaliação dos parâmetros hemodinâmicos os animais foram sacrificados por sobredose anestésica com solução de Barbitúricos intraperitoneal - 3 vezes o valor utilizado para dose anestésica Tiopental ou Pentobarbital (80-120

mg/animal), utilizando lidocaína (10 mg/ml) junto na mesma seringa no momento da aplicação. Em seguida o tórax foi aberto para a exposição e remoção dos seguintes órgãos: coração e pulmões. Todos esses órgãos foram pesados e corrigidos pelo peso corporal. Além disto, para calcular o percentual de água no pulmão e fígado, esses órgãos foram colocados em estufa a 96 °C por 48 horas e depois pesados novamente.

3.6. Obtenção das amostras para avaliar a área de Infarto e análise proteômica

O preparo da amostra (coração) para a análise proteômica consistiu nas seguintes etapas: lavagem com solução de Krebs à temperatura ambiente (3x), seguida com tampão fosfato-salina pH=7 a 4°C (2x) e por último água Milli-Q à 4°C (1x), para retirar completamente todo o sangue presente no coração. Em seguida, os átrios e tecidos adjacentes foram removidos e a massa restante do coração (ventrículos) foi separada em banho de gelo: ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD) (Figura 3).

A avaliação do tamanho do infarto foi realizada a partir da medida da área de cicatriz em papel milimetrado (mm²), sendo a cicatriz visualizada por transiluminação (Mill et al., 1990).

Em seguida, VE remanescente e VD foram pesados e alocados em criotubos, os quais foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Posteriormente, armazenados a – 80°C até o momento da extração proteica.

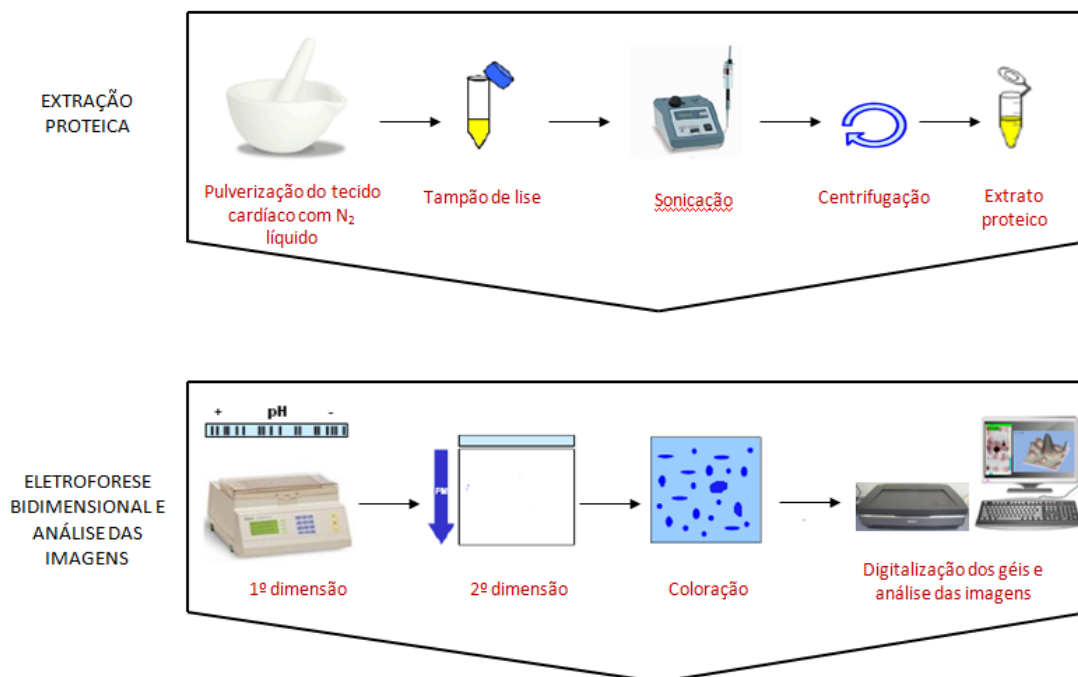


Figura 3: Fluxograma das etapas experimentais utilizadas na análise proteômica.

3.7. Obtenção do extrato proteico dos ventrículos e dosagem do conteúdo proteico

Para extração das proteínas das amostras (VD e VE), utilizou-se a metodologia descrita por Burniston (2009), com algumas modificações. As amostras de VE e VD foram maceradas sob atmosfera de nitrogênio líquido em gral de porcelana e posteriormente homogeneizada em tampão de lise (8M de uréia, 2M de tiouréia, 40 mM de Tris base, 4% (p/v) de CHAPS e cocktail inibidor de proteases), na proporção de 1:10 (p/v). A mistura obtida foi submetida à sonicação (3 ciclos de 20 segundos, 15 Hz, com intervalos de 20s entre eles), em banho de gelo a 4°C. Para remoção do material insolúvel do lisado celular, o homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram aliqüotados e armazenados a -80°C para posterior análise (Figura 3).

O conteúdo proteico das amostras foi determinado utilizando o kit de dosagem de proteína 2-D Quant Kit, conforme especificações do fabricante.

3.8. Eletroforese bidimensional (2DE)

Antes da análise proteômica por eletroforese bidimensional em gel diferencial (2D-DIGE), foi realizado um estudo prévio usando a técnica 2DE corado com comassie (figura 3). O objetivo dessa etapa foi avaliar a viabilidade de realização do 2D-DIGE com o *pool* das amostras dos grupos experimentais.

3.8.1. Focalização isoeétrica (1ª dimensão)

Amostras de 100 µg de proteínas solúveis foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak-GE) contendo 0,2% de anfólitos, para um volume final de 125µL. As soluções resultantes foram transferidas para uma bandeja de reidratação, e sobre estas foram colocadas as IPG *strips* desidratadas (7 cm, pH 3-10 NL) durante 12 horas (reidratação passiva).

Para a eletrofocalização foi utilizado sistema IEFCell (Bio-Rad). As etapas da focalização isoeétrica foram: 1ª etapa: 300V por 3horas; 2ª etapa: 4000V por 2horas; 3ª etapa: acúmulo de 10.000Vh; 4ª etapa: 500V por 2horas.

3.8.2. Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas

As proteínas eletrofocalizadas nas IPG *strips* foram reduzidas e alquiladas. Esse processo foi realizado pela incubação sequenciada 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 ureia; 30% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) por 15 minutos cada em temperatura ambiente.

3.8.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida - (2ª dimensão)

A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE, utilizando o sistema *Mini Protean* (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 30 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 (1988) com algumas modificações. Inicialmente o gel foi incubado três vezes (30 minutos cada) com solução a 2% de ácido ortofosfórico em etanol 30%. Em seguida, foi lavado três vezes (10 minutos cada) com solução a 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%.

3.8.4. 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 géis bidimensionais do VE e VD de quatro animais de cada grupo, perfazendo um total de 16 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 reeditada 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 diferentes intensidades de expressão proteica.

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

Onde:

Vol = área da base do pico do *spot* (a 75% do cume) x intensidade do *spot*.

Vol_S é o volume do *spot* em um gel contendo n *spots*.

3.9. Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)

3.9.1. Marcação das amostras com os corantes fluorescentes

Os extratos proteicos obtidos de amostras de VE e VD dos animais foram agrupados formando um *pool* para cada grupo. Amostras de cada *pool* foram marcadas com os corantes fluoróforos (CyDye) de acordo com as indicações do fabricante (GE Healthcare), mostradas na tabela 1. As amostras (50 μ g) foram alternativamente marcadas com 400 pmol de corantes fluorescentes cianínicos (Cy3 ou Cy5). Uma mistura com quantidades iguais das amostras analisadas, perfazendo um total de 50 μ g, foi marcada com 400 pmol de Cy2, utilizada como normalizador (marcação das amostras foi combinada de acordo com o desenho experimental apresentado na tabela 1). Após 30 minutos de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 1 μ L de solução de lisina 10 mM por 10 minutos. Essas etapas foram realizadas no escuro e em banho de gelo.

Tabela 1: Desenho experimental do 2D-DIGE

Gel	Fluoróforo / amostra		
	Cy3	Cy5	Cy2
1	VDS	VES	VDS +VES+VEI +VDI
2	VES	VDI	VDS +VES+VEI +VDI
3	VEI	VDS	VDS +VES+VEI +VDI
4	VDI	VES	VDS +VES+VEI +VDI
5	VDS	VEI	VDS +VES+VEI +VDI
6	VDI	VEI	VDS +VES+VEI +VDI

VDS: VD dos animais pertencentes ao grupo SHAM; VES: VE dos animais pertencentes ao grupo SHAM; VDI: VD dos animais pertencentes ao grupo IM; VEI: VE dos animais pertencentes ao grupo IM.

3.9.2. Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica

Alíquotas das amostras marcadas (conforme o item anterior) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 1,5% de anfólitos e 800 μ g de

extrato protéico não marcado (carregamento da amostra) para posterior coloração com Coomassie, perfazendo um volume final de 340 μ L. Em seguida, foram transferidas para bandeja de reidratação e as “IPG strip” desidratadas (18 cm, pH 3-10 NL) foram colocadas em contato com essa solução, permanecendo sobre estas durante 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas as etapas de reidratação passiva (12 horas a 20°C) e focalização isoeétrica (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) no sistema Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare life sciences) à 20°C, com corrente máxima de 50 mA/IPG strip.

3.9.3. Segunda Dimensão - SDS-PAGE

Após a primeira dimensão, as proteínas eletrofocalizadas no gel foram submetidas à redução e alquilação. O processo consistiu de incubação sequenciada com: (i) tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL de DTT, durante 15 minutos; e (ii) tampão de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodoacetamida durante 15 minutos. Em seguida, foi realizada a segunda dimensão em sistema SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970), utilizando o sistema *Ettan DaltSix* com placas de vidro de baixa fluorescência (GE Healthcare). As IPG strips contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para superfície do gel de poliácridamida (12%) e seladas com solução de agarose 0,5% preparada em tampão Tris/Glicina/SDS (TGS). A migração das proteínas ocorreu a 30mA/gel por 1 hora e, em seguida, a 75mA/gel até o término da corrida.

3.9.4. Processamento de Imagens e Análise Estatística

Após a 2ª dimensão, os géis foram digitalizados no scanner *Typhoon FLA 9000* (GE Healthcare) nos comprimentos de ondas de 488/520 nm (excitação e emissão) para o Cy2, 532/580 nm (excitação e emissão) para o Cy3 e 633/670

nm (excitação e emissão) para o Cy5. Essa etapa foi realizada no Laboratório Multiusuário do Departamento de Bioquímica da UFMG.

As imagens dos géis foram analisadas pelo software *DeCyder 7.0* (GE Healthcare Life Sciences). A autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual e editada quando necessário. A diferença quantitativa na intensidade dos *spots* foi determinada pelo teste estatístico t-student, assumindo significância estatística $\alpha \leq 0,05$. Essa análise foi realizada via acesso remoto ao computador do laboratório da Prof^a. Dr^a. Hélida Monteiro de Andrade (Departamento de Parasitologia da UFMG).

Posteriormente, os géis DIGE foram corados com Coomassie coloidal (*Brilliant Blue G-250*) segundo a metodologia proposta por Neuhoff e colaboradores (1988) para permitir a detecção visual dos *spots*.

3.10. Identificação das proteínas

Os *spots* proteicos com diferentes intensidades entre os grupos analisados foram selecionados para identificação por espectrometria de massa.

3.10.1. Digestão das proteínas, extração dos peptídeos e análise por espectrometria de massa

Os *spots* protéicos selecionados foram manualmente removidos do gel, fragmentados e, posteriormente descorados com 400 μL de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 (três etapas de 15 minutos cada, sob agitação). Após a remoção do descorante, os *spots* foram tratados com 200 μL de acetonitrila P.A. até o gel se tornar opaco. Este solvente foi removido da amostra por concentração a vácuo (concentrador plus, Eppendorff). Posteriormente, os fragmentos dos géis foram reidratados com 10 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ μL de tripsina. Após 30 minutos em banho de gelo, 20 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados para manter os pedaços de gel úmido durante a digestão trípica (37°C por 16 horas). Em seguida, a solução não

incorporada ao gel foi recolhida e os pedaços do gel foram submetidos a lavagens sucessivas com 30 μ L de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (duas etapas de 30 minutos cada, sob agitação) para completa remoção dos fragmentos trípticos. As três soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido por concentrador a vácuo, até aproximadamente 10 μ L. Posteriormente as amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, *Millipore Corporation, Bedford, MA*) equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Os fragmentos da hidrólise tríptica foram eluídos da resina em 6 μ L de solução de acetonitrila 50%, contendo 0,1% de TFA (Vergote, Bouchut *et al.*, 2005). Um fragmento do gel em uma região sem *spot* protéico e um fragmento do gel correspondente a albumina bovina (BSA) do padrão de peso molecular foram utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo para as análises.

Alíquotas de 0,5 μ L de amostras dessalinizadas foram aplicadas na placa do sistema MALDI-TOF-TOF AB Sciex 5800 (AB Sciex, Foster City, CA) e co-cristalizada com 0,25 μ L de solução saturada da matrix (5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70% / TFA 0,1%) a temperatura ambiente.

Os espectros de MS e MS/MS foram obtidos no sistema MALDI-ToF-ToF AB Sciex 5800 (AB Sciex, Foster City, CA), operando no modo positivo/refletor para assegurar uma melhor acurácia e resolução. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de cinco peptídeos: des-Arg1-Bradycinina ($m/z = 904,468$), angiotensina I ($m/z = 1296,685$), Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1570,677$), ACTH (18–39) ($m/z = 2465,199$) e ACTH (7–38 clip) ($m/z = 3657,929$). Similarmente, a calibração externa do modo MS/MS foi realizada *in tandem*, utilizando os fragmentos ionizados com massas conhecidas gerados a partir do Glu1-fibrinopeptídeo B. Os 15 íons com sinais mais intensos no MS, e com razão sinal/ruído acima de 2, foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS. Durante a análise de MS e MS/MS foi aplicado uma lista de exclusão referente às massas oriundas dos fragmentos trípticos de tripsina e queratina. Para gerar a lista de massas (peaklist) detectadas pelo aparelho foi utilizado a ferramenta “peaks to mascot” presente no software Explore do sistema ABSciex 5800. Para esta análise

foram estabelecidos os seguintes critérios: razão sinal/ruído ≥ 2 ; e área mínima do pico de 10.

3.10.2. 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®. Score global do MASCOT® correspondente à significância estatística de $p < 0,05$ foi utilizado para validação da identificação das proteínas, quando estas apresentavam homologia com *Rattus norvegicus*. 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* para *Rattus norvegicus*.

3.11. Análise das interações proteína-proteína (Banco de Dados – STRING)

STRING é um banco de dados de interações proteína-proteína conhecidas e previstas. As proteínas identificadas foram carregadas nessa base de dados (<http://string-db.org/>) para identificar essas possíveis interações. Nessa verificação, foram utilizados os códigos das proteínas identificadas fornecidas pelo banco de dados do Uniprot (www.uniprot.org), referentes ao *Rattus norvegicus*, e foi considerado o score de interação mínimo considerado foi 0.900 de confiança. As proteínas que apresentaram interações entre si foram agrupadas de acordo com a classificação funcional das mesmas e as que não apresentaram nenhuma interação foram excluídas da análise.

3.12. Validação da análise proteômica

Os resultados obtidos por espectrometria de massa foram validados pela verificação da expressão protéica da desmina por meio de *Western blotting*.

Amostras (25 µg de proteína) foram aplicadas em gel SDS-PAGE de concentração 12% para análise da desmina, de acordo Laemmli (1970). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) sob uma tensão de 24V a 4 °C *overnight*. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 4-6 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (PBS-Tween 0,1% acrescido de 5% de leite em pó desnatado) sob constante agitação mecânica.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-Desmina (Santa Cruz, EUA) a diluições de 1:500, *overnight* a 4°C. Após lavagem com TBS-Tween 0,1% durante 5 min (3 vezes), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluição 1:5000) em solução de bloqueio. Foi utilizada substância quimioluminescente (ECL Plus, Amersham™, GE Healthcare, UK) para revelação das bandas imunorreativas pelo *ChemiDoc* (Bio-Rad).

A intensidade dos sinais de desmina foi processada pelo programa *Image Lab Software* (Bio-Rad) e quantificadas em áreas delimitadas de igual tamanho e expressas como unidades arbitrárias.

O carregamento das proteínas foi confirmado pela coloração das membranas por Ponceau vermelho (0,1% Ponceau vermelho, 5% ácido acético (v/v) - Sigma-Aldrich).

3.13. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). A análise da reprodutibilidade dos géis foi realizada com auxílio do software *Image Master 2D Platinun v 7.05*. As demais análises foram feitas com o auxílio do software *GraphPad Prism 5.0*. Comparações entre duas médias independentes foram realizadas usando o teste *t* de Student. A diferença quantitativa na intensidade dos spots foi determinada pelo teste estatístico *t*-student, assumindo significância estatística $\alpha \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Medidas Ponderais e Hemodinâmicas

Os parâmetros ponderais dos animais 7 dias após a cirurgia estão apresentados na Tabela 2. O peso corporal foi semelhante entre os dois grupos analisados. A relação VD/PC e VE/PC foi significativamente maior no grupo IM em relação ao grupo SHAM, da mesma forma que o peso do pulmão e a sua relação pulmão/PC. A área de infarto média do grupo IM foi de 46% ± 2%.

Tabela 2: Parâmetros morfométricos avaliados sete dias após a cirurgia

	SHAM (n=8)	IM (n=8)
PC (g)	286 ± 5	255 ± 13
VD (mg)	261 ± 18	299 ± 18
VD/PC (mg/g)	0,91 ± 0,05	1,20 ± 0,11*
VE (mg)	680 ± 21	697 ± 38
VE /PC (mg/g)	2,38 ± 0,07	2,75± 0,13
Pulmão (g)	1,35 ± 0,06	2,12 ± 0,19**
Pulmão/PC (mg/g)	4,75 ± 0,25	8,46 ± 0,79**
% Água no Pulmão	80,17± 0,98	80,23 ± 0,67
Cicatriz (mg)	-	182 ± 18
Cicatriz (%)	-	46 ± 2

PC, peso corporal final; Valores expressos como a média ± EPM. * $P < 0,05$ vs SHAM. ** $P < 0,01$ vs SHAM.

A tabela 3 resume os resultados obtidos por meio de registro pressórico por cateterismo arterial “*in vivo*” (medidas hemodinâmicas), para avaliação da função ventricular esquerda e direita.

Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação à frequência cardíaca e pressão arterial diastólica. A pressão arterial sistólica, pressão sistólica ventricular esquerda, $dP/dt+$ e $dP/dt-$ foram significativamente reduzidas após o infarto no VE. Enquanto que a $PDfVE$ foi maior nos grupos

infartados em relação ao grupo SHAM. Sobre a pressão no VD, tanto a PSVD quanto a PDfVD foram significativamente maiores no grupo IM comparado ao SHAM. Enquanto que $dP/dt+$ e $dP/dt-$ do VD não tiveram diferenças significativas entre os grupos avaliados (tabela 3).

A tabela 4 mostra os parâmetros hemodinâmicos e ponderais dos animais infartados classificados como insuficientes utilizados na análise proteômica, os quais apresentaram no mínimo dois dos critérios descritos a seguir: PDfVE \geq 15 mmHg; aumento de + 2 desvios padrão da razão do peso do pulmão e o peso corporal em relação ao grupo SHAM ($PP/PC_{IC} \geq PP/PC_{sham} + 2 DS$) e a presença de hipertrofia do VD calculada pelo aumento de + 2 desvios padrão da razão do peso do VD e peso corporal ($VD/PC_{IC} \geq VD/PC_{sham} + 2 DS$), juntamente com uma redução nos índices de contratilidade e relaxamento do VE (Pereira *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2011).

Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos avaliados sete dias após a cirurgia:

	SHAM (n=8)	IM (n=8)
FC (bpm)	213 \pm 6	231 \pm 7
PAM (mmHg)	100 \pm 3	91 \pm 3*
PAS (mmHg)	118 \pm 4	101 \pm 3**
PAD (mmHg)	85 \pm 3	81 \pm 3
PSVE (mmHg)	122 \pm 3	106 \pm 3**
PDfVE (mmHg)	6 \pm 1	16 \pm 2**
dP/dt + VE (mmHg/seg)	3938 \pm 277	2907 \pm 136**
dP/dt -VE (mmHg/seg)	-3017 \pm 174	-2172 \pm 106**
PSVD (mmHg)	31 \pm 1	42 \pm 2**
PDfVD (mmHg)	4 \pm 1	9 \pm 1**
dP/dt +VD (mmHg/seg)	981 \pm 115	927 \pm 44
dP/dt -VD (mmHg/seg)	-740 \pm 46	-898 \pm 68

FC, frequência cardíaca; PAM, pressão arterial média; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; dP/dt derivada máxima de pressão; PSVE, pressão sistólica do ventrículo direito; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo direito; Valores expressos como a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs SHAM. ** $P < 0,01$ vs SHAM.

Tabela 4: Parâmetros hemodinâmicos e ponderais dos animais infartados classificados como insuficientes utilizados na análise proteômica:

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4
Pulmão/PC (mg/g)	11,0	10,0	7,0	10,0
VD/PC (mg/g)	2,0	1,0	1,0	1,0
PDfVE (mmHg)	17	20	15	22
dP/dt + VE(mmHg/seg)	2501	3168	2388	3146
dP/dt -VE (mmHg/seg)	-1881	-2498	-2041	-2561

PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; dP/dt derivada máxima de pressão; PSVE, pressão sistólica do ventrículo direito; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo direito.

4.2. Análise Proteômica:

4.2.1. Eletroferese Bidimensional (2D-Coomassie):

Os animais infartados selecionados para a análise proteômica foram os que tiveram sinais de IC, os quais seguiram os critérios acima descritos.

Para esta análise preliminar, 14 géis bidimensionais foram analisados: 7 géis do grupo IM, sendo 3 géis do VD e 4 do VE e 7 géis do grupo SHAM, 4 géis do VD e 3 géis do VE, para a análise proteômica (Figuras 4,5,6 e 7).

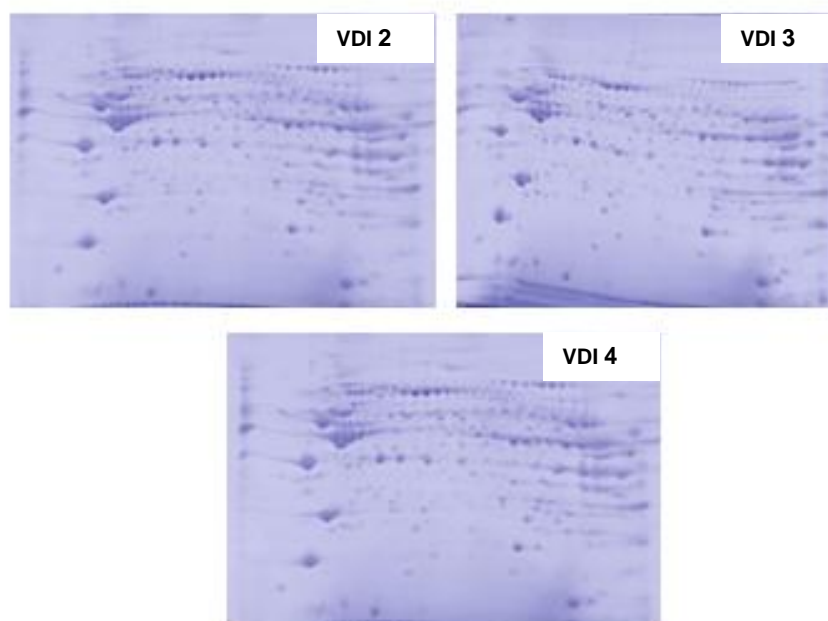


Figura 4: Perfil protéico de amostras de VD dos animais do grupo IM. Amostras de 100 μ g de proteínas solúveis foram focalizadas em "IPG strip" pH 3-10 NL de 7 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%.

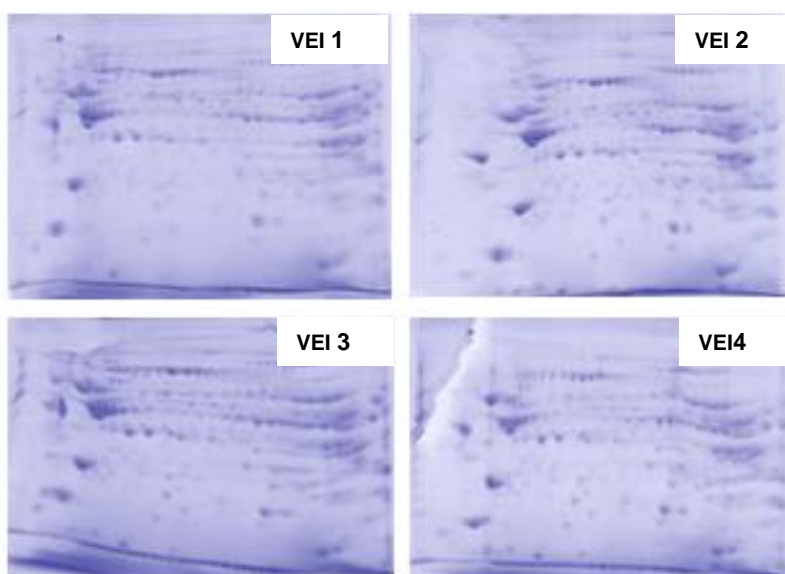


Figura 5: Perfil protéico de amostras de VE dos animais do grupo IM. Amostras de 100 μ g de proteínas solúveis foram focalizadas em "IPG strip" pH 3-10 NL de 7 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%.

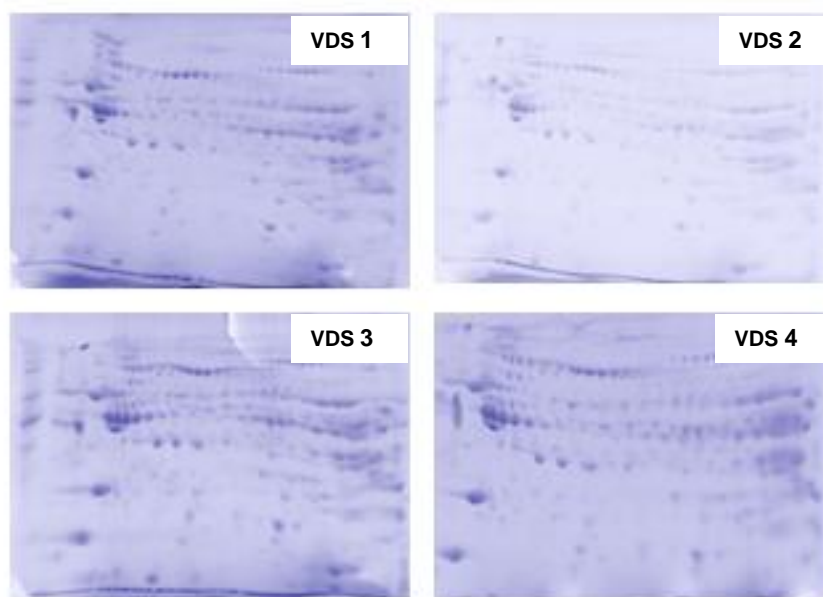


Figura 6: Perfil protéico de amostras de VD dos animais do grupo SHAM . Amostras de 100µg de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 7 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%.

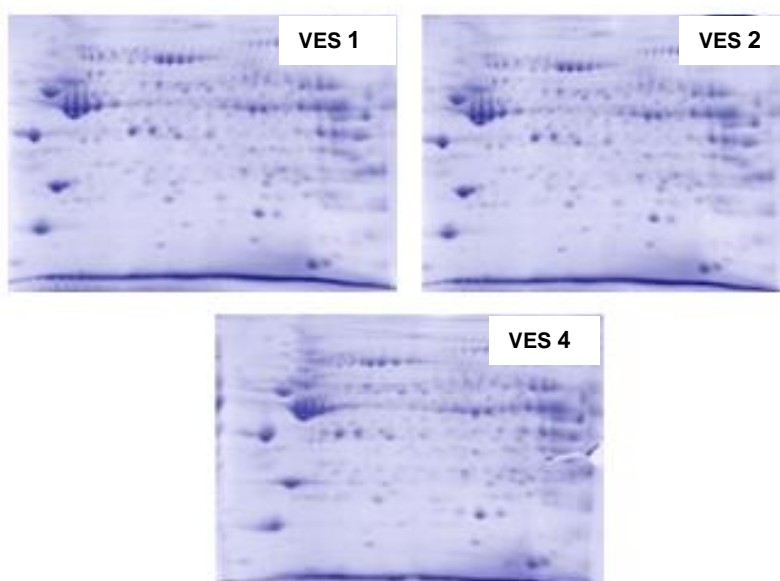


Figura 7: Perfil protéico de amostras de VE dos animais do grupo SHAM. Amostras de 100µg de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 7 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%.

As imagens dos géis foram analisadas pelo software *Image Master 2D Platinun v 7.05* (GE Healthcare Life Sciences). Nesta análise foram utilizados 14 géis.

O gel que apresentou o maior número de spots de cada subgrupo foi escolhido como o gel de referência (VDS2, VES1, VDI4 e VEI1). O coeficiente de correlação entre o gel referência com os demais de cada grupo variou entre 0,91-0,96. A equação da regressão linear correlacionando os *spots* está na Tabela 5.

Na equação $y = \text{slope} * x + \text{offset}$, o primeiro membro da equação indica o quanto em média os volumes dos *spots* são maiores (>1) ou menores (<1) que o volume do respectivo *spot* no gel de referência. O segundo membro da equação representa, por meio de uma unidade relativa, o deslocamento médio dos *spots* em relação aos respectivos *spots* no gel de referência.

Tabela 5: Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intra-grupos. As imagens foram relacionadas com a imagem do gel de referência de cada grupo.

Relação entre os géis	Equação	Coefficiente de correlação
VDS2 x VDS1	$y = 1.14x - 0,0828$	0,92
VDS2 x VDS3	$y = 1,03x - 0,0465$	0,93
VDS2 x VDS4	$y = 0,962x - 0,0161$	0,91
VDI4 x VDI2	$y = 0,965x - 0,00231$	0,92
VDI4 x VDI3	$y = 0,904x - 0,00923$	0,95
VES1 x VES2	$y = 0,966x - 0,00377$	0,96
VES1 x VES4	$y = 1,08x - 0,0501$	0,94
VEI1 x VEI2	$y = 1,06x - 0,0388$	0,92
VEI1 x VEI3	$y = 0,902x - 0,0441$	0,94
VEI1 x VEI4	$y = 0,895x - 0,0309$	0,93

Estes dados mostram que os perfis proteicos obtidos apresentaram elevada reprodutibilidade dentro de cada grupo, em termos do número total, intensidade e posição relativa dos *spots* proteicos.

4.2.2. Eletroforese Diferencial em Gel Bidimensional (2D- DIGE):

A imagem dos 6 géis 2D-DIGE foram analisadas pelo *software Decyder 7.0*, o qual mostrou que os perfis proteicos obtidos foram altamente reprodutíveis em termos de número total de *spots* e posição relativa.

A análise das imagens detectou média de 1093 ± 60 spots corados pelos CyDyes por gel. Os géis representativos da análise proteômica comparativa 2D-DIGE do VE e do VD entre os grupos SHAM e IM são mostrados nas figuras 8 e 9.

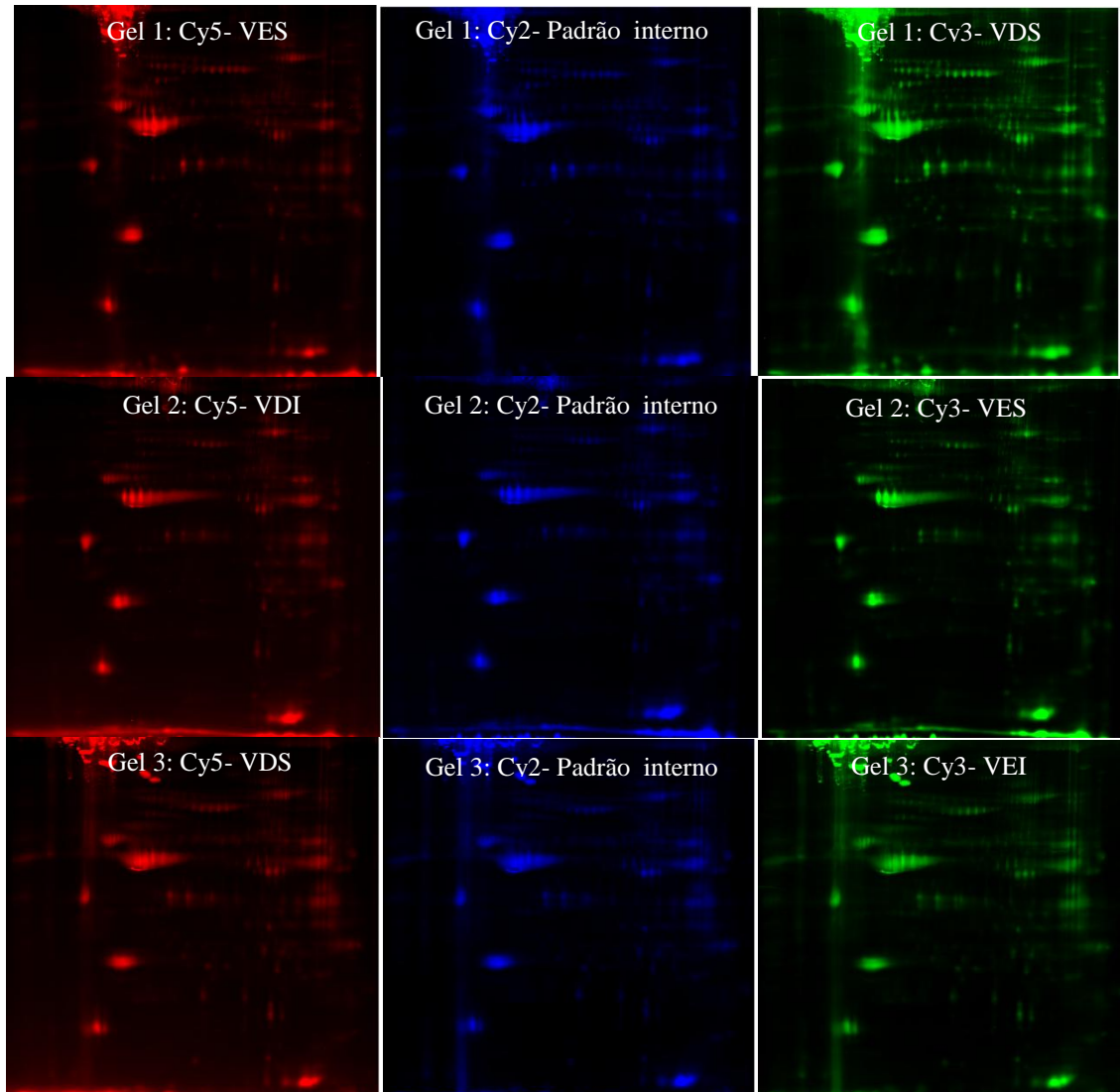


Figura 8: Imagem dos géis da análise proteômica comparativa 2D-DIGE dos ventrículos do grupo SHAM e o grupo IM (Géis 1,2,3).

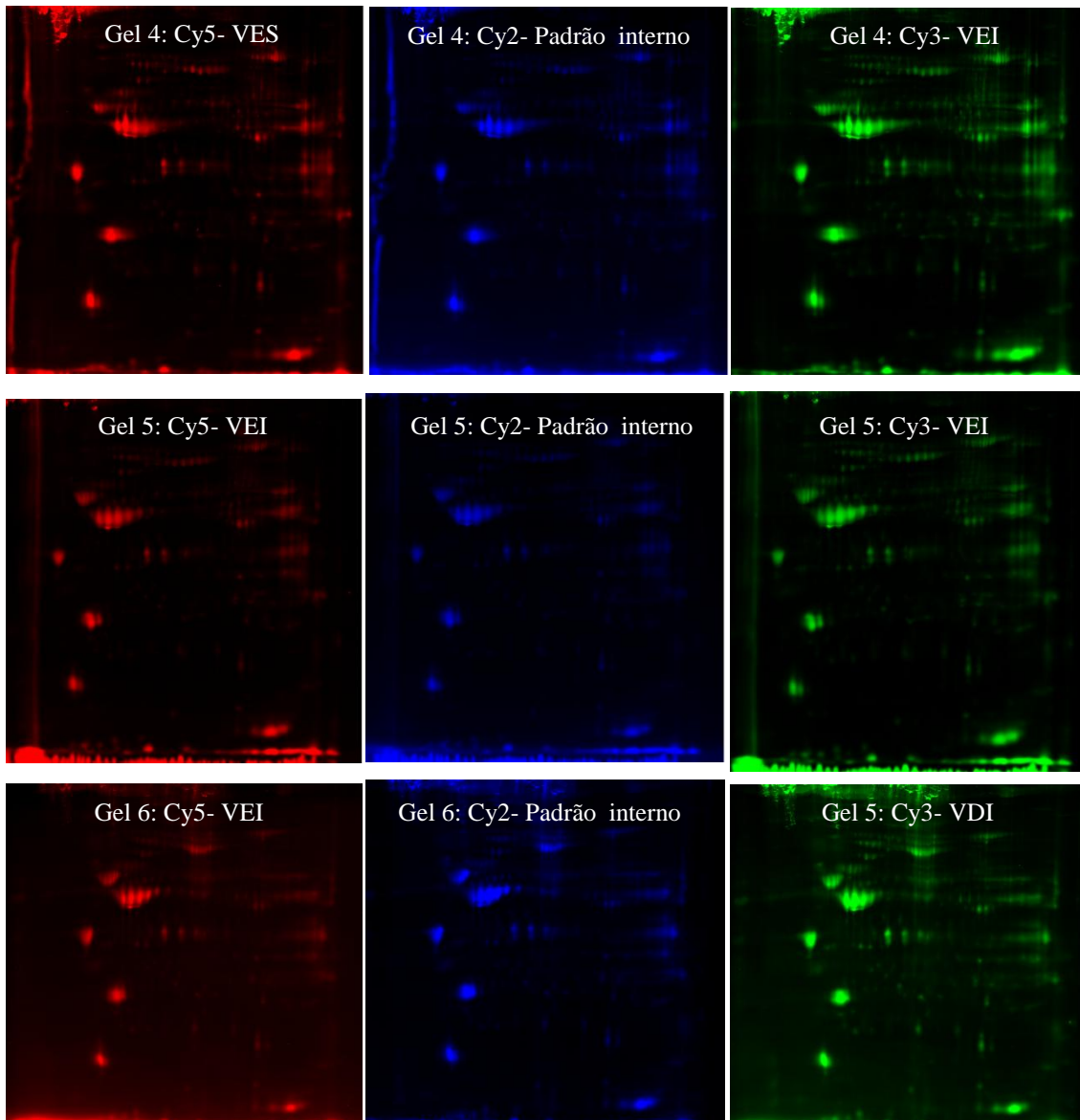


Figura 9: Imagem dos géis da análise proteômica comparativa 2D-DIGE dos ventrículos do grupo SHAM e o grupo IM (Géis 4,5,6).

Foram considerados os seguintes critérios para inferir diferença na intensidade relativa de um *spot*: detecção de forma consistente em todas as replicatas experimentais e significância estatística ($\alpha \leq 0,05$) entre os grupos. Utilizando esses critérios foram detectados 20 *spots* diferencialmente expressos no ventrículo direito e 11 *spots* no ventrículo esquerdo na comparação entre os grupos SHAM e IM. Desses 20 *spots*, 12 (60%) apresentaram maior intensidade relativa no grupo IM (VDI) e os demais 8 *spots* (40%) menor intensidade nesse grupo comparado ao SHAM (VDS). No VE, dos 11 *spots*, apenas 3 *spots* (27,3%) tiveram maior intensidade relativa e 8 (72,7%) menor

intensidade no grupo IM (VEI) comparado ao grupo SHAM (VES). Foram removidos dos géis 30 *spots* bem definidos, pois um desses *spots* era comum aos grupos analisados, os quais foram processados para a identificação proteica por espectrometria de massas em MALDI-TOF-TOF.

A combinação dos espectros de massas resultantes (MS e MS/MS) foi utilizada para a identificação das proteínas, por meio de busca no banco de dados do NCBI nr pelo software MASCOT®. Dentre os 30 *spots* proteicos, 14 foram identificados com sucesso. Desses 14, 13 são proteínas não redundantes, pois uma das proteínas foi encontrada em dois *spots*. A tabela 6 mostra a identidade proteica e a figura 10, a localização dos mesmos no gel.

A categorização funcional das proteínas identificadas foi feita a partir das anotações de três bancos de dados: GENE Ontology (<http://www.geneontology.org/>); PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) e Uniprot (www.uniprot.com). As proteínas identificadas pertencem a várias classes funcionais, incluindo metabolismo (carboidratos, lipídeos, aminoácidos e fosforilação oxidativa), proteínas de choque térmico, contração muscular e proteínas estruturais (tabela 6 e figura 10).

As proteínas identificadas também foram analisadas no programa STRING, uma ferramenta de bioinformática usada para obter possíveis interações existentes proteína-proteína. Os resultados dessa análise são representados pela figura 11, a qual mostra a rede de interações das proteínas, agrupadas (clusterizadas) de acordo com suas classificações funcionais. Na tabela 7, encontram-se a identificação das proteínas analisadas nesse programa.

Tabela 6: Identidade dos “spots” proteicos com intensidades diferentes ($p \leq 0,05$) entre os grupos IM e SHAM identificados por MS e MS/MS. Homologia com a taxonomia *Rattus norvegicus*.

Function / spot ID ^a	Protein (gi) ^b	MW (KDa)	Mascot Score ^c	Sequence Coverage (%)	RV MI/ SHAM Ratio ^d	P, t test	LV MI/ SHAM Ratio ^e	P, t test	Peptide Sequences
Heat shock proteins									
1	Heat shock cognate 71 kDa protein (gi13242237)	71	395	11%	+1.66	0.026	-	-	R.TTPSYVAFTDTER.L; K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q K.DAGTIAGLNVLR.I; K.STAGDTHLGGEDFDNR.M; R.FEELNADLFR.G
1*					+1.34	0.033	-	-	
50	alpha crystallin B chain (gi16905067)	20	139	14%	+1.48	0.041	-	-	R.QDEHGFIQR.E; R.RPFFPFHSPSR.L; R.APSWIDTGLSEMR.M; R.APSWIDTGLSEMR.M + Oxidation (M)
TCA cycle									
11	Dihydrolipoylysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (gi195927000)	49	315	14%	+1.23	0.041	-	-	K.NDVITVQTPAFAESVTEGDVR.W; K.VEGGTPLFLR.K; R.DYIDISVAVATPR.G; R.GLVVPVIR.N; R.NVETMNYADIER.T; R.EAVTFLR.K
Metabolism fatty acid									
11	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (gi129686)	59	79	5%	-1.34	0.017	-	-	K.NIVIGFAR.M; K.FANPFPAAVR.G; R.GFVDDIIQPSSTR.A
24	Acyl-CoA dehydrogenase precursor short-chain-specific (gi1111334)	44	94	9%	-1.32	0.017	-1.78	0.041	K.LADMALAESAR.L; R.ASSTANLIFEDCR.I; R.ITEIYEGTSEIQR.L
32	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial (gi12018256)	36	317	11%	-1.45	0.041	-1.61	0.0072	R.IAWYLR.D; K.INLIYSR.D; R.SLVNELTFTAR.K; R.YCTQDAFFQVK.E; K.EVDVGLAADVGTQLQR.L; K.RIPEEVSDHNYESIQTSAQK.H
Metabolism amino acid									

Function / spot ID ^a	Protein (gi) ^b	MW (KDa)	Mascot Score ^c	Sequence Coverage (%)	RV MI/ SHAM Ratio ^d	P, t test	LV MI/ SHAM Ratio ^e	P, t test	Peptide Sequences
11	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (gi129686)	59	79	5%	-1.34	0.017	-	-	K.NIVIGFAR.M; K.FANPFPAAVR.G; R.GFVDDIIQPSSTR.A
Glycolysis									
12	Alpha-enolase (gi158186649)	47	364	14%	-1,41	0.021	-	-	K.KLNVVEQEK.I; R.IGAEVYHNLK.N; R.GNPTVEVDLYTAK.G; R.YITPDQLADLYK.S; R.AAVPSGASTGIYEALELR.D
53	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gi56188)	36	171	8%	-	-	-2.01	0.0085	R.VPTPNVSVVTLTCR.L; K.LISWYDNEYGYSNR.V
15	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial precursor (gi56090293)	39	191	15%	-	-	+1.29	0.047	K.VVSPWNSEDAK.G; K.EGIECEVINLR.T; IMEGPAFNFLDAPAVR.V + Oxidation (M); TIRPMDIEAIEASVMK.T + 2 Oxidation (M); TYYMSAGLQPPIVFR.G + Oxidation (M)
ETC									
54	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (gi51948476)	53	297	11%	-1.26	0.029	-	-	R.SLLTYGR.R; K.NRPGNALEK.E; R.TDLTDYLSR.H; R.IPLAEWESR.I; R.IEEVDAQMVR.E; R.RIPLAEWESR.I; K.EVESIGAHNLNAYSTR.E
48	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Ryeske iron-sulfur polypeptide 1, isoform CRA_c (gi149045287)	28	245	9%	+1.23	0.029	-	-	K.VPDFSDYR.R; K.VPDFSDYRR.A; R.GKPLFVR.H; K.EIDQEAAVEVSQLR.D
Cytoskeleton and associated proteins									
59	Desmin (gi11968118)	53	472	19%	+1.25	0.052	+1.61	0.041	K.VELQELNDR.F; R.FLEQQNAALAAEVNR.L; R.DNLIDDLQR.L; K.LQEEIQLR.E; R.EEAENNLAAFR.A; R.FASEASGYQDNIAR.L

Function / spot ID ^a	Protein (gi) ^b	MW (KDa)	Mascot Score ^c	Sequence Coverage (%)	RV MI/ SHAM Ratio ^d	P, t test	LV MI/ SHAM Ratio ^e	P, t test	Peptide Sequences
Miscellaneous functions									
22	Creatine kinase M-type (gil6671762)	43	522	26%	-1.26	0.025	-2.25	0.0072	K.FEEILTR.L; K.DLFDPIIQDR.H; K.LSVEALNSLTGEFK.G; K.SFLVWVNEEDHLR.V; R.LGSSEVEQVQLVVDGVK.L; R.GTGGVDTAAVGAVFDISNADR.L
35	Proteasome activator complex subunit 1 (gil61098214)	29	98	9%	-1.30	0.017	-	-	K.IVVLLQR.L; K.QPHVGDYR.Q; R.IEDGNFVAVQEK.V

^a ID, identificação dos *spots* proteicos.

^b Os números de acesso (gi) correspondem ao código identificador obtido no NCBI GenInfo.

^c Mascot score proteico com significância estatística (p<0.05) na homologia e identidade da proteína.

^d Ratio DIGE (abundância relativa do VDI sobre VDS).

^e Ratio DIGE (abundância relativa do VEI sobre VES).

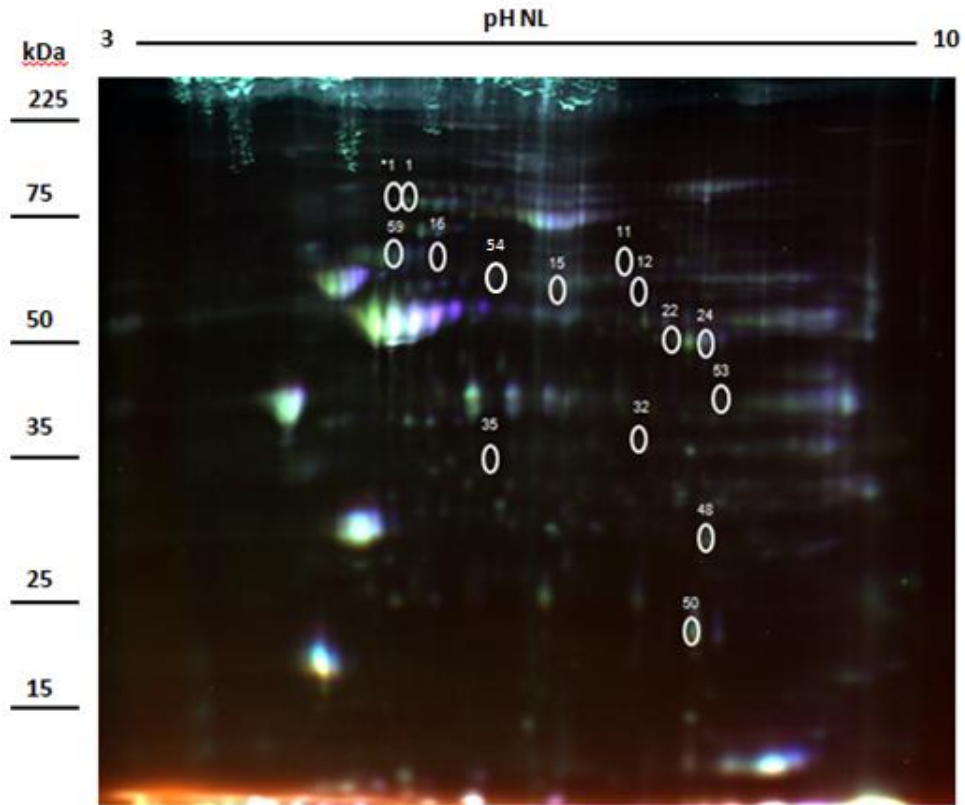


Figura 10: Gel representativo mostrando a localização dos *spots* que foram identificados no MALDI-TOF-TOF- imagem resultante da sobreposição das imagens obtidas do Cy3, Cy2 e Cy5 de um mesmo gel.

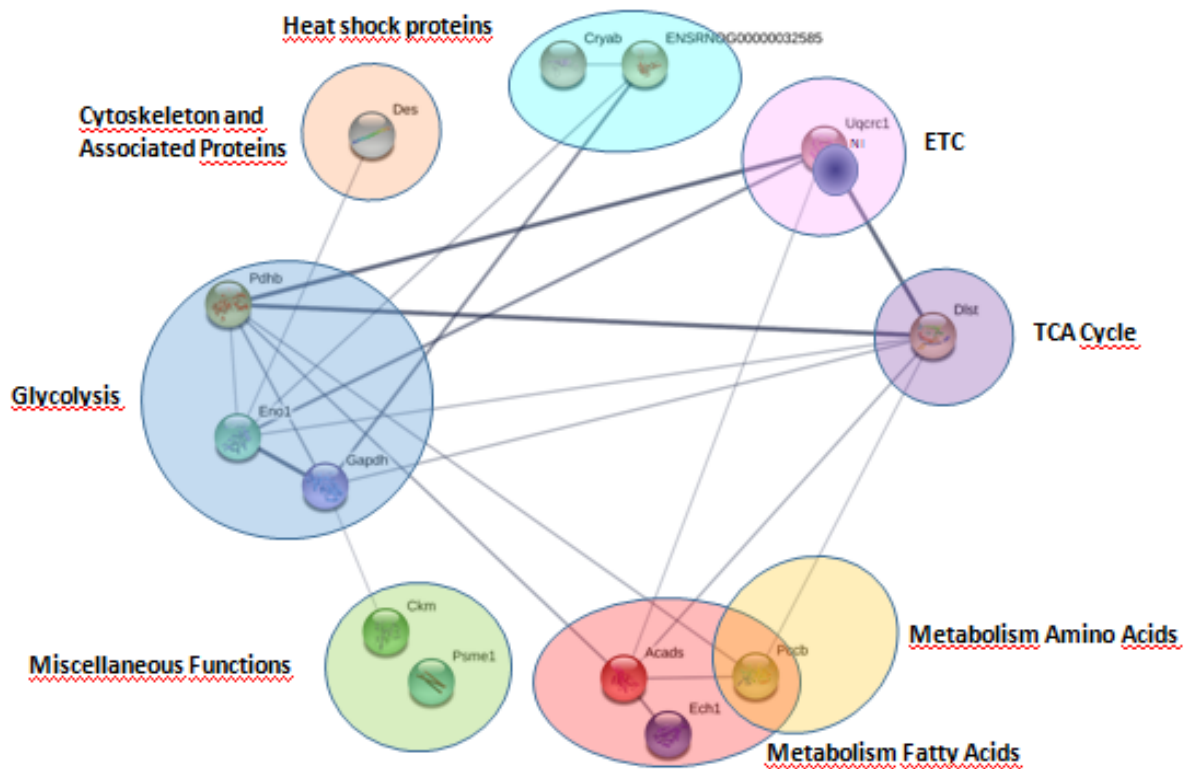


Figura 11: Rede de interações das proteínas identificadas e agrupamento de acordo com suas classificações funcionais por meio do programa STRING. As linhas representam interações existentes entre as proteínas (linha fina representa apenas uma interação e linha grossa representa mais de uma interação).

Tabela 7: Identidade das proteínas analisadas no programa STRING:

Protein	sigla ID
Heat shock cognate 71 kDa protein	ENSRNOG00000032585
alpha cristallin B chain	Cryab
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	Dlst
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Pccb
Acyl-CoA dehydrogenase precursor short-chain-specific	Acads
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Ech1
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Pccb
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial precursor	Pdhb
Alpha-enolase	Eno1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1
Ubiquinol-cytochrome c reductase, Ryeske iron-sulfur polypeptide 1, isoform CRA_c	NI
Desmin	Des
Creatine kinase M-type	CKm
Proteasome activator complex subunit 1	Psme1

4.3. Validação da intensidade da desmina

Os resultados encontrados na análise proteômica de pool das amostras foram validados em amostras individuais por blotting da desmina no VE e VD dos animais analisados no estudo proteômico.

A figura 12 mostra o blotting da desmina no VE e VD. Semelhante à análise do 2D-DIGE, foi observado um aumento na intensidade da desmina no VE quanto no VD dos animais infartados com sinais de insuficiência.

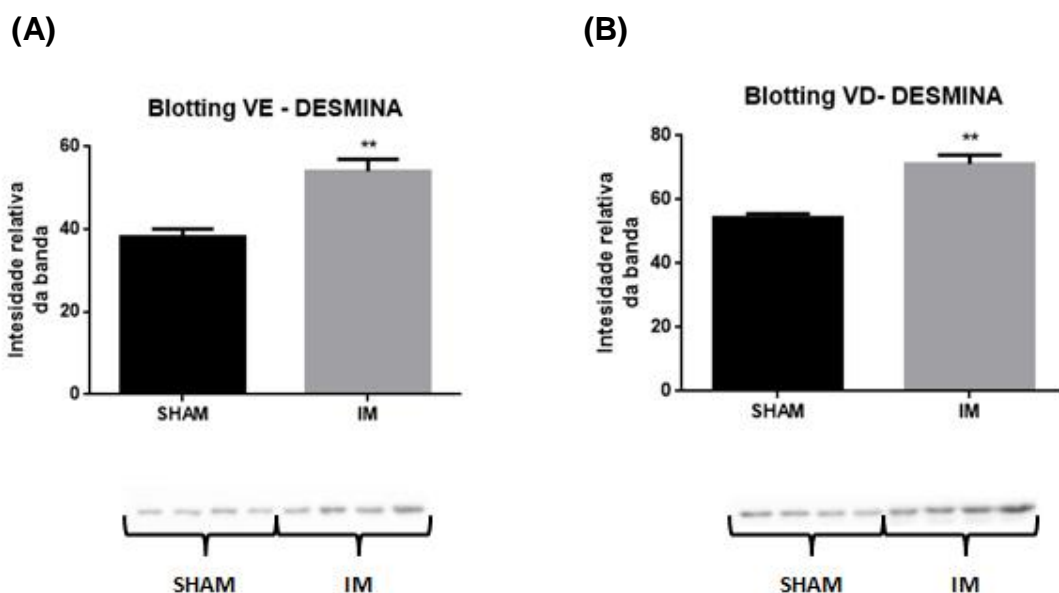


Figura 12. Avaliação da expressão proteica da desmina no VE e VD 7 dias após o infarto. (A) Gráfico representando a análise densitométrica das bandas de desmina no VE. (B) Gráfico representando a análise densitométrica das bandas de desmina no VD (C) Membrana corada com Ponceau- desmina no VE. (D) Membrana corada com Ponceau- desmina no VD. Valores expressos como a média \pm EPM (n=4). ** $P < 0,001$ vs SHAM.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC) pós-infarto do miocárdio é caracterizado por alterações progressivas na estrutura e funcionamento dos ventrículos (remodelamento ventricular- RV). Embora as alterações estruturais e histológicas pós-infarto estejam bem documentadas, os mecanismos moleculares que envolvem remodelamento pós- infarto ainda permanecem por serem investigados.

Considerando que mudanças fenotípicas podem ser correlacionadas com alterações no perfil proteico e as técnicas proteômicas – atualmente - têm sido consideradas poderosas “*approach*” para avaliar alterações de forma global no remodelamento proteico, o que tem contribuído na elucidação de diversos mecanismos fisiopatológicos (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2014; Cubedo *et al.*, 2016). Muitos trabalhos usando técnicas proteômicas tentam aprofundar os conhecimentos sobre alterações no proteoma cardíaco em uma gama de doenças cardiovasculares (McGregor e Dunn, 2006), não somente usando diferentes modelos animais ou amostras de tecidos (Silbiger *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2013), mas também avaliando alterações proteicas em tempos específicos da progressão da doença (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008).

Considerando que o VE é a câmara cardíaca mais prejudicada no infarto, o alvo dos estudos sobre alterações cardíacas são focados principalmente nesta câmara (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008; Juan *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2014; Cubedo *et al.*, 2016). No entanto, poucos são estudos têm sido realizados para estudar a fase precoce do IM no desenvolvimento da IC, bem como remodelamento ventricular pós-injúria, principalmente no que se refere ao VD.

Neste trabalho, com objetivo de identificar marcadores teciduais cardíacos presentes no remodelamento do VD e VE, foi realizada análise proteômica de amostras de VD e VE de ratos infartados e já apresentando sinais de insuficiência cardíaca. O modelo de infarto usado neste trabalho foi aquele induzido por oclusão da artéria coronária esquerda em ratos - técnica já

preconizada e amplamente usada para estudo de doenças que afetam o sistema cardiovascular (Pfeffer *et al.*, 1979; Mill *et al.*, 1990; Baldo *et al.*, 2008).

Diferenças no proteoma do VE já foram mostradas em diversas condições patológicas e em tempos diferentes, infarto do miocárdio, 4 semanas após oclusão da coronária esquerda (Juan *et al.*, 2012); 10 dias pós-cirurgia de oclusão (Mitra *et al.*, 2014); insuficiência cardíaca, 2 meses pós-infarto (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008); modelo de isquemia-reperfusão (Cadete *et al.*, 2012). Entretanto, nossos resultados relativos ao remodelamento proteico do VD no pós-infarto são inéditos.

A presença de IC nos ratos foi confirmada e caracterizada por mensurações de parâmetros ponderais e hemodinâmicos. Conforme já descrito na literatura, com 7 dias pós-infarto já é possível detectar alterações morfo-funcionais no coração (Bernard *et al.*, 2008; Toldo *et al.*, 2011), como: hipertrofia e disfunção sistólica e diastólica.

Como esperado, observamos hipertrofia em ambas as câmaras cardíacas dos animais infartados. A relação dos pesos VD/PC foi maior nesses animais, o que é consistente com a literatura, que mostra hipertrofia do miocárdio na fase precoce ao infarto (Anversa *et al.*, 1985). Sabe-se que, além da hipertrofia, ocorre aumento do diâmetro da cavidade ventricular para compensar o incremento do volume diastólico final. Essas adaptações morfo-funcionais são tidas como benéficas no início do infarto, mas posteriormente, essas adaptações podem levar ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca, aumentando a morbidade e a mortalidade desses animais (Gerdes, 2002).

Também observamos aumento do peso do pulmão - tanto no peso absoluto quanto na relação do peso pulmão/PC - dos animais infartados. Nossos dados estão de acordo com Stefanon *et al.*, 2013 e Bernard *et al.*, 2008, que também observaram esse aumento nos animais com sinais de insuficiência cardíaca.

Quanto aos aspectos funcionais do coração, os animais infartados apresentaram prejuízo na atividade de ambas as câmaras cardíacas. Sobre o

VE, observamos redução da pressão sistólica ventricular esquerda, $dP/dt+VE$ e $dP/dt-VE$. Esses dados evidenciam a perda da função sistólica do VE, que é uma consequência bem característica do pós-infarto (Toldo *et al.*, 2011; Bernard *et al.*, 2008; Sartório *et al.*, 2005). Também observamos um aumento na PDfVE nos ratos do grupo IM, o qual está de acordo com descrições feitas por Pfeffer *et al.*, 1979; Saraiva *et al.*, 2007; Stefanon *et al.*, 2013, este aumento pode ser associado ao incremento do peso do pulmão e hipertrofia do VD.

Quanto à função ventricular direita, observamos aumento tanto na pressão sistólica quanto na diastólica final dos animais infartados e nenhuma alteração no relaxamento e contração dessa câmara. Esse aumento pode ser relacionado à elevação da pós-carga do ventrículo direito devido ao incremento da PDfVE observada nesses animais.

Vale ressaltar que as alterações, ponderais e hemodinâmicas, observadas em nosso modelo, já estão bem estabelecidas e descritas na literatura e validaram nosso modelo de IC. Além disso, essas análises morfo-funcionais demonstram que cada câmara cardíaca apresenta formas de adaptação distintas no pós-infarto e essa diferença se refletiu em nível proteico a qual foi confirmada pela análise proteômica comparativa.

Após seleção e confirmação da insuficiência cardíaca de animais do grupo infartado, foi realizada uma análise proteômica preliminar dos tecidos das câmaras ventriculares destes animais e de animais SHAM - replicatas biológicas (3–4) de animais de cada grupo - por 2DE em mini-géis corados com Coomassie de replicatas biológicas (3–4) de animais de cada grupo. A análise das imagens dos géis - das replicatas biológicas - pelo programa Image Master 2D Platinun v 7.05 (GE Healthcare Life Sciences) mostrou alta reprodutibilidade intragrupo - coeficiente de correlação entre o gel de referência de cada grupo com os demais (0,91-0,96) - demonstrando grande homogeneidade intragrupo. Esta análise nos permitiu usar um *pool* das amostras de cada grupo experimental, para a realização do 2D-DIGE.

Para realização da análise proteômica - 2D-DIGE - foram obtidos seis géis (conforme desenho experimental mostrado na tabela 1 e figuras 9 e 10), cuja análise das imagens (*software Decyder 7.0*) detectou 31 spots proteicos com diferente intensidade (foi considerada a diferença mínima de 25% na comparação entre os grupos): 20 spots no ventrículo direito e 11 spots no ventrículo esquerdo quando comparados entre os animais SHAM e IM com sinais de insuficiência. Do total dos spots proteicos com diferentes intensidades, 13 proteínas não reduntantes foram identificadas com sucesso por MS e MS/MS, as quais foram associadas aos seguintes grupos funcionais: metabolismo energético (ciclo de Krebs; metabolismo de ácidos graxos; metabolismo de aminoácidos; glicólise), proteínas de choque térmico e estruturais.

Os dados gerados da análise proteômica mostram que há um remodelamento protéico significativo - alteração no proteoma - de ambas as câmaras 7 dias pós infarto nos animais insuficientes, entretanto foi observado alterações específicas em cada câmara (tabela 6). As proteínas com alteração em sua intensidade foram identificadas e agrupadas de acordo com a sua função: (i) proteínas do citoesqueleto: desmina (Des); (ii) proteínas de choque térmico: proteína de choque térmico 71kD (HSP-70); alfaB cristalina (Cryab); (iii) ciclo de Krebs: di-hidrolipoil-lisina da succiniltransferase do componente do complexo desidrogenase 2-oxoglutarato (OGDC-E2) (iv) metabolismo de ácidos graxos: cadeia β da propionil-CoA Carboxilase (PCCB); acil CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD); delta (3,5)-delta (2,4) -dienoyl-CoA isomerase, mitocondrial (ECH1); (v) metabolismo de aminoácidos: cadeia β da propionil-CoA Carboxilase (PCCB) (vi) glicólise: subunidade beta-E1 do complexo piruvato desidrogenase (PDHE1-B); α -enolase (ENO1); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH); (vii) cadeia respiratória: subunidade 1 do complexo citocromo bc1 (UQCRC1); ubiquinol-citocromo c redutase, polipeptídeo 1 Ferro-enxofre Ryeske, isoforma CRA_c (UQCRFS1) (viii) funções diversas: creatina quinase do tipo M (CK-MM) e subunidade 1 do complexo ativador de proteassoma (Psme1) (Tabela 6 e figura 11). Algumas destas alterações podem ser classificadas adaptativas e outras como mal-adaptativas.

Com o objetivo de explorar a potencial relevância funcional das proteínas moduladas na IC, uma rede de interação dessas proteínas foi obtida a partir do banco de dados STRING Search (*Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), versão 10.0 e mostrou de acordo com a análise do String, dentre as proteínas identificadas, 13 apresentaram interações proteína-proteína (Figura 12).

Considerando que diversos trabalhos têm apontado desmina (proteína do filamento intermediário) como proteína-chave no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Monreal *et al.*, 2008; Pawlak *et al.*, 2009; Agnetti *et al.*, 2014; Sheng *et al.*, 2016), e que as proteínas de choque térmico apresentam um importante papel na cardioproteção, decidimos por explorar mais profundamente a associação destas proteínas com as alterações fisiológicas observadas na IC.

A *upregulation* da desmina tem sido reportada tanto na hipertrofia quanto na insuficiência cardíaca (Heling *et al.*, 2000; Sharov *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015). Su e colaboradores (2015) observaram aumento da intensidade dessa proteína no VD ($\approx 25\%$) na fase tardia da insuficiência cardíaca (Su *et al.*, 2015). Sobre o VE, estudos proteômicos envolvendo modelos de hipertrofia, infarto e insuficiência cardíaca também observaram aumento dessa proteína (Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2014). Semelhante ao observado por esses autores, nossos dados também demonstraram que a desmina é modulada positivamente em ambas as câmaras cardíacas na IC, entretanto com maior intensidade no VE. De acordo com Heling e cols. alterações na expressão da desmina podem ser consideradas como um mecanismo compensatório da perda da função contrátil que acontece em razão da morte dos cardiomiócitos no infarto, a fim de garantir integridade celular e estabilidade do sarcômero (Heling *et al.*, 2000).

A desmina é uma proteína do filamento intermediário que ocorre exclusivamente em células endoteliais e musculares, sendo o principal componente proteico dos filamentos intermediários em miócitos cardíacos (Lazarides, 1980). Apresenta papel importante na manutenção da organização

do tecido, a partir de uma rede dinâmica de interações mecanoquímicas que são responsáveis pela manutenção da citoarquitetura muscular, ligando toda a maquinaria contrátil ao citoesqueleto subsarcolemal, os núcleos, e outras organelas (Fuchs e Weber, 1994; Small e Gimona, 1998). Atua também na regulação da expressão gênica, em razão de sua capacidade de se ligar ao DNA. A desmina também desempenha papel muito importante no posicionamento e na função mitocondrial (Capetanaki 2002) (figura 13). Além de interagir com diversas moléculas: chaperona alfa-B-cristalina; proteases (calpaína e caspases); nectina e nebulina (Fuchs e Weber, 1994; Small e Gimona, 1998) (Figura 13).

Mutações da desmina e modificações pós-traducionais podem causar perturbação nessa rede mecanoquímica. Esse desequilíbrio pode levar perda de função da desmina bem como de proteínas que interagem com essa proteína; além de culminar na formação de agregados que podem resultar em efeitos tóxicos nas células (Agnetti et al, 2014) (Figura 15B), como defeitos mitocondriais (alterações no metabolismo energético, na localização da mitocôndria na célula), morte de cardiomiócitos, degeneração muscular e desenvolvimento de miopatia esquelética e cardiomiopatias (Capetanaki et al, 2015).

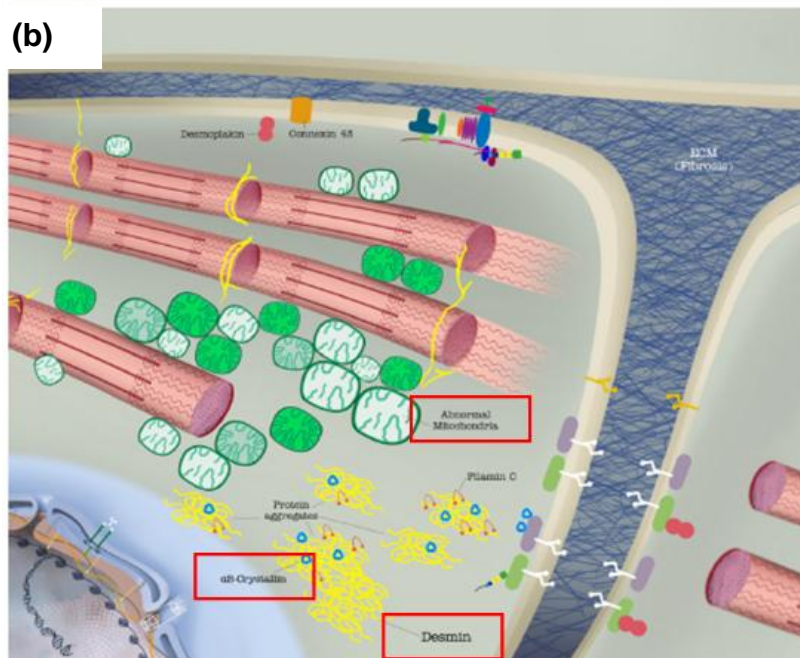
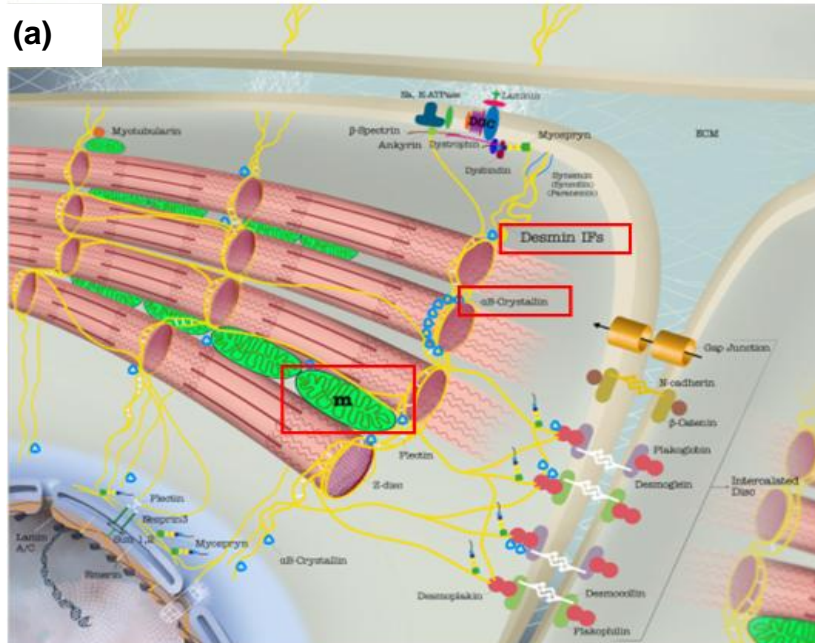
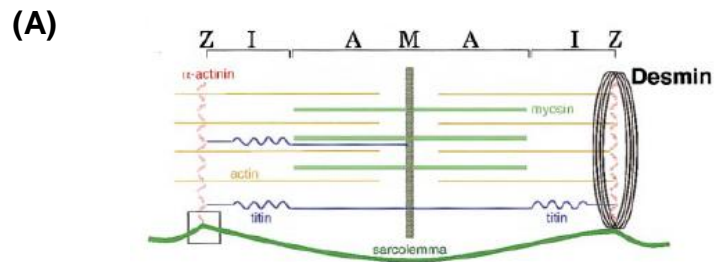


Figura 13: Representação esquemática dos filamentos intermediários da desmina. (A) Representação esquemática da localização da desmina em torno dos discos Z dos sarcômeros. (a) Mostra a interação da desmina com diversas organelas e outras estruturas do músculo cardíaco (b) Conseqüências decorrentes da deficiência ou desestruturação da conexão da desmina com as demais moléculas, devido a mutações e modificações pós-traducionais. (Adaptado de Capetanaki et al., 2016).

Em virtude do importante papel da desmina na manutenção da citoarquitetura celular, alterações na sua expressão/intensidade podem acarretar em comprometimento da mecânica cardíaca. Pawlak e colaboradores observaram que o acúmulo anormal da desmina pode perturbar o papel das miofibrilas, levando à tensão incomum do sarcolema e a uma distribuição atípica das organelas celulares, gerando problemas no funcionamento do coração (Pawlak et al, 2009).

Foi observado neste trabalho, como já descrito na literatura, alterações nos parâmetros hemodinâmicos dos animais infartados com sinais de insuficiência. O VE apresentou comprometimento tanto na contratilidade quanto no relaxamento, além de uma significativa redução da pressão sistólica dessa câmara cardíaca e aumento da pressão diastólica final do VE. Essas alterações funcionais podem ser associadas, portanto, ao aumento da intensidade da desmina (61%) no VE dos animais infartados-insuficientes. Ao contrário do VE, o VD, cujo índice de aumento na intensidade da desmina foi menor (25%), não foi observado comprometimento na contratilidade e relaxamento. Esses dados apontam que a *high-intensity* da desmina pode ser relacionada ao comprometimento do funcionamento cardíaco.

Em um trabalho recente, Sheng *et al* (2016), usando um modelo de camundongos geneticamente modificados, observaram aumento na intensidade de desmina em animais com disfunção diastólica (Sheng *et al.*, 2016). Estudo de Heling e cols. demonstrou correlação positiva entre conteúdo proteico (desmina e tubulina) e pressão diastólica final ventricular esquerda em pacientes com cardiomiopatia dilatada, sugerindo, então, que o aumento de proteínas do citoesqueleto e de proteínas associadas à membrana pode estar associado a patogênese da disfunção diastólica na insuficiência cardíaca (Heling *et al.*, 2000). Em nosso trabalho também encontramos alterações na pressão diastólica final em ambos os ventrículos, o que poderíamos associar ao aumento da desmina observada nas câmaras cardíacas dos animais infartados-insuficientes. Esses dados reforçam que a regulação positiva dessa proteína pode, dessa forma, ser associada às alterações encontradas no funcionamento ventricular cardíaco.

O aumento da expressão da desmina também está associado à hipertrofia cardíaca (Collins et al., 1996; Mitra et al., 2014), o que corrobora com o aumento que observamos no peso relativo do VD e do VE nos animais do grupo IM. A hipertrofia está relacionada a uma maior síntese e incorporação de elementos contráteis e, portanto, ao aumento da expressão de proteínas estruturais, o que pode também justificar o aumento da intensidade da desmina encontrada em nosso estudo nos animais infartados com sinais de insuficiência. Esse aumento pode ser apontado como uma resposta mal adaptativa compensatória em razão da perda de miócitos que acontece no infarto, que resulta no acúmulo de desmina, gerando desorganização da maquinaria contrátil e consequente, prejuízo na função ventricular.

Desminopatias, miopatias relacionadas à desmina, têm sido alvo de muitas pesquisas, entretanto, o papel desta proteína em diversas doenças cardiovasculares ainda precisa ser explorado. Agnetti e cols. sugeriram que modificações pós-traducionais dessa proteína podem culminar na formação de agregados anômalos de desmina (figura 14) e esses agregados podem ter uma importante relação com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Agnetti *et al.*, 2014). Nesse estudo os autores postularam um novo mecanismo da toxicidade cardíaca da desmina, o qual foi baseado na formação e acúmulo de oligômeros amilóides de desmina dirigidos por modificações pós-traducionais da desmina - *PTM-driven* (figura 15), esse processo envolve enzimas - proteolíticas, glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) – enzima da glicogênese), e outras quinsases.

A ativação prolongada neuro-humoral ativa receptores serpenteantes alvos acoplados a proteína G, ativando quinases via AMPc uma das quais fosforila GSK3, tornando-a menos ativa. GSK3 desfosforilada seria responsável por adicionar grupamento fosfato a desmina previamente fosforilada por outra fosfoquinase genérica (PKX), permitindo assim a conformação adequada dessa proteína estrutural exercer o seu papel fisiológico. No entanto em condições patológicas, a desmina encontra-se em menor *status* de fosforilação, (devido a menor atividade da GSK3 quando fosforilada), mais susceptível a sofrer ação

de proteases (calpaína e caspases) (Agnetti et al., 2014). Estas proteases podem clivar a desmina durante a diferenciação celular, particularmente a apoptose. A hidrólise da desmina em locais específicos por estas proteases, libera fragmentos não fosforilados, promovendo a formação de agregados dessa proteína durante o processo de morte celular por apoptose (Chen *et al.*, 2003, Agnetti et al., 2014) (figura 15).

Além disso, a clivagem da desmina pode levar a desorganização da unidade sarcomérica (Goll *et al.*, 2003). Essa desorganização da maquinaria contrátil pode ser associada à diminuição da contratilidade, alterações na homeostase do Ca^{2+} , cardiomiopatia e morte de cardiomiócitos (Goldfarb e Dalakas, 2009; Kostareva *et al.*, 2008).

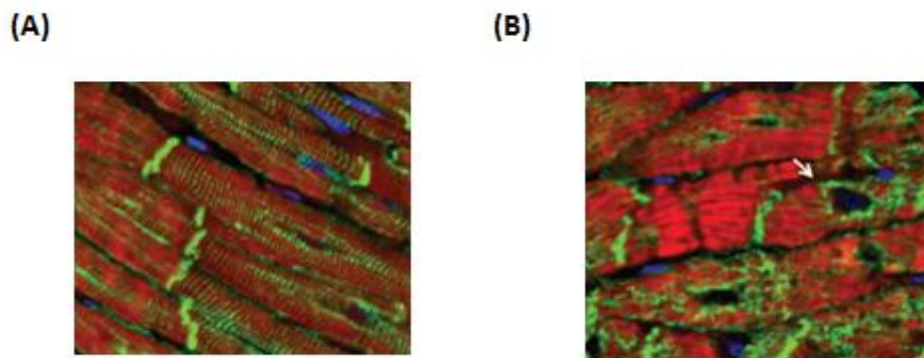


Figura 14. Imagens do citoesqueleto do tecido cardíaco de cães obtidas por microscopia confocal: desmina (representada em verde), actina (vermelho) e o núcleo (azul) (A) Filamentos do citoesqueleto do tecido cardíaco organizados- grupo controle (SHAM) (B) Desorganização do citoesqueleto, mostrando o acúmulo de desmina ao redor do núcleo- grupo IC. (Adaptado de Agnetti et al., 2014).

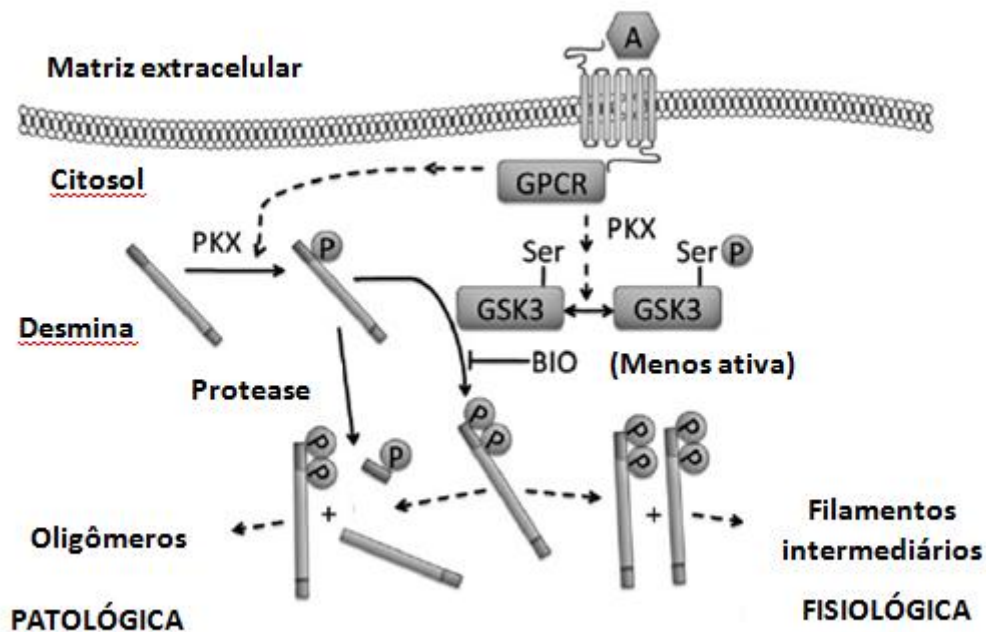


Figura 15- Esquema de vias hipotéticas para a formação dos oligômeros de desmina. De acordo com este esquema, acúmulo de fosfoespécies de desmina com uma menor fosforilação (mono-) gerado por proteínas quinases genéricas (PKX), pode conduzir a um aumento da clivagem e oligomerização de desmina. A: Agonista de GPCR (tal como endotelina, angiotensina II e catecolaminas); GPCR: receptor acoplado a proteína G; P: grupos fosfato. (Adaptado de Agnetti et al., 2014).

Alterações significativas também foram observadas na intensidade de várias proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco nos ventrículos dos animais infartados-insuficientes: (i) Ciclo de Krebs (\uparrow di-hidrolipoil-lisina da succiniltransferase do componente do complexo desidrogenase 2-oxoglutarato; (ii) Metabolismo dos ácidos graxos (\downarrow cadeia β da propionil-CoA Carboxilase - também envolvida no catabolismo de aminoácidos; \downarrow acil CoA desidrogenase de cadeia curta e \downarrow delta (3,5)-delta (2,4) -dienoyl-CoA isomerase, mitocondrial); (iii) Metabolismo de carboidratos - Glicólise (\uparrow subunidade beta-E1 do complexo piruvato desidrogenase; \downarrow α -enolase da glicólise; \downarrow gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, GAPDH e \uparrow subunidade beta-E1 do complexo piruvato desidrogenase - metabolismo aeróbico da glicose); (iv) cadeia respiratória: \downarrow da subunidade 1 do complexo citocromo bc1, \uparrow proteína Ferro-enxofre Ryeske da ubiquinol-citocromo c redutase (Tabela 6 e figura 11).

Considerando que a produção de energia é importante na manutenção do contínuo trabalho mecânico do coração. Alterações nas enzimas envolvidas no metabolismo energético podem também contribuir no comprometimento da função contrátil do miocárdio no infarto e na insuficiência cardíaca (Neubauer, 2007; Doenst et al., 2010).

Em corações normais, o miocárdio preferencialmente oxida ácidos graxos (Lopaschuk *et al.*, 2010), responsável por aproximadamente 60-70% da produção de ATP, e a glicose e o lactato são responsáveis por aproximadamente 30% (Huss e Kelly, 2005). Contudo, em condições patológicas como infarto do miocárdio, ocorre uma alteração no metabolismo cardíaco, em que glicólise passa a predominar como principal fonte de energia em contrapartida a β -oxidação de ácidos graxos (Opie, 1990; Fert-Bober, 2008). Durante a isquemia, glicólise anaeróbica passa a desempenhar um importante papel na preservação miocárdica em resposta a diminuição do oxigênio e nutrientes. No entanto, os produtos acumulados da glicólise, prótons e lactato, acabam promovendo a inibição da glicólise, resultando em redução do metabolismo anaeróbio glicolítico (Das *et al.*, 1987), além da diminuição do metabolismo de ácidos graxos (Opie, 1990; Fert-Bober, 2008). Portanto, esse aumento na glicólise é um efeito a curto prazo, com persistência da isquemia, a obtenção de energia a partir da glicose também fica prejudicada (Li *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho, como esperado, observamos que o infarto seguido do desenvolvimento da insuficiência cardíaca modulou negativamente tanto as enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos quanto na glicólise, o que está de acordo com dados da literatura (Sack *et al.*, 1996; Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2014). Ainda, corroborando com os nossos dados, estudos apontam que na fase de consolidação da insuficiência cardíaca ocorre uma diminuição da utilização tanto da glicose quanto dos ácidos graxos como fontes de energia, embora no estágio inicial dessa doença, a utilização de ácidos graxos permaneça inalterada ou ligeiramente aumentada e a utilização de glicose permaneça aumentada (Neubauer, 2007; Doenst et al., 2010).

Uma modulação negativa da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ($\approx 100\%$) foi observada no VE dos animais infartados-insuficientes. Estudo de Hong Li *et al.* (2012) demonstrou que um grande número de proteínas envolvidas na via glicolítica é liberada no plasma durante a fase precoce da isquemia cardíaca, dentre elas, a GAPDH, a qual foi apontada como candidata a biomarcador de isquemia, o que pode justificar a diminuição da intensidade observada na nossa análise e ainda corroborar com a sua indicação como um marcador da IC precoce pós-infarto.

Também observamos modulação positiva pontuais de subunidades de complexos enzimáticos envolvidos em processos oxidativos (Ciclo de Krebs, cadeia respiratória e do processo oxidativo da transformação do piruvato em Acetil-CoA). A Literatura, com relação a alterações de enzimas oxidativas, é conflitante, tanto diminuição como aumento da expressão de enzimas envolvidas em processos oxidativos já foram observados no infarto do miocárdio e na IC (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2014). As duas proteínas da cadeia respiratória que apresentaram alterações na sua intensidade fazem parte do complexo III, e foram moduladas de maneira opostas no VD dos animais infartados-insuficientes. Heather e colaboradores apontaram prejuízo na respiração mitocondrial pós-infarto, especificamente na atividade do complexo III, em que observou uma menor atividade (Heather *et al.*, 2010).

Ainda relacionado ao metabolismo energético, é importante mencionar o papel da creatina quinase (CK) do tipo M na transdução de energia em tecidos com demandas energéticas elevadas, como músculo esquelético, cérebro e coração. Esta enzima CK catalisa a transferência reversível de um grupo fosforila entre a creatina e a molécula de ATP. Em nosso estudo, o infarto seguido de desenvolvimento da IC modulou negativamente a creatina quinase do tipo M em ambas as câmaras cardíacas. Nas células cardíacas, as isoformas CKMM, CKMB e CKBB localizam-se no citoplasma e a isoforma CKMI nas mitocôndrias sarcoméricas. Parte da CKMM citosólica está associada estruturalmente com as miofibrilas, com o retículo sarcoplasmático, e com membranas sarcolemas (locais de acoplamento excitação-contração)

(Wyss *et al.*, 1992). Estas enzimas usam a fosfocreatina localmente para refosforilação de ADP produzida por ATPases, fornecendo energia suficiente para a cinética contrátil normal ou para recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Wyss *et al.*, 1992).

Considerando que esta proteína desempenha um papel central no fornecimento de energia para vários tecidos, a diminuição da expressão da creatina quinase tipo M está associada a diminuição dos níveis de fosfocreatina, que representa uma forma de tamponamento de energia. Como consequência todas as proteínas miocárdicas com atividade ATPásica, como as da cadeia pesada da miosina e as responsáveis pela captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático podem apresentar déficits em suas funções, com prejuízos na função dos ventrículos. Foi demonstrado que a modulação negativa na expressão desta enzima é maior no VE do que no VD, na fase precoce da IC, o que está de acordo com os nossos resultados, diminuição de $\approx 26\%$ no VD e $\approx 125\%$ no VE dos animais infartados-insuficientes. Além disso, nossos dados estão de acordo com estudos que demonstraram que animais deficientes na produção de creatina quinase tipo M e mitocondrial apresentaram maior susceptibilidade a sofrer danos cardíacos e distúrbios na homeostase de cálcio, após isquemia e reperfusão (Spindler *et al.*, 2004). Ainda, foi observado que modulação negativa desta enzima foi maior no VE ($\approx 125\%$) do que no VD ($\approx 26\%$), o que mostra menor disponibilidade de reserva de energia para o VE.

As alterações descritas sobre o metabolismo energético cardíaco demonstram que a intensidade do prejuízo no funcionamento do coração decorrentes do infarto e da IC, pode ser associado com o comprometimento do processo de obtenção de energia. Vale ressaltar que a contratilidade e relaxamento do VD foram preservados, ao contrário do VE, que teve redução nesses dois parâmetros. Pode-se sugerir que o comprometimento observado nos processos de relaxamento e contração do VE pode ser devido, além do acúmulo de desmina, a impactante redução do metabolismo energético no VE.

Considerando a contínua atividade contrátil e metabólica dos cardiomiócitos, faz-se necessário um rígido controle quanto à síntese, enovelamento, e *turnover* de proteínas. Entretanto, várias condições patológicas: *stress* mecânico e oxidativo, mudanças na temperatura e pH, podem desestabilizar de forma crítica o equilíbrio de proteostases, induzindo o acúmulo de agregados insolúveis de proteínas deformadas (Tarone e Brancaccio, 2014). Esse acúmulo é altamente tóxico para as células, causando morte celular e contribuindo para diversas doenças cardíacas, tais como cardiomiopatia dilatada, arritmias e insuficiência cardíaca (Willis e Patterson, 2013).

Vários estudos demonstram que condições de estresse induzem um aumento na expressão e atividade de proteínas de choque térmico (HSP) nas células cardíacas (Cieniewski-Bernard et al., 2008; Mitra *et al.*, 2014). Essas proteínas agem como “chaperonas” moleculares e auxiliam no dobramento e montagem final das proteínas, mantendo o equilíbrio correto entre síntese e degradação, contribuindo, dessa forma, para seu adequado funcionamento, e garantindo a correta conformação e localização no interior da célula.

O aumento na expressão e na atividade destas proteínas funciona como mecanismo de cardio-proteção em situações de lesão por isquemia/reperfusão, insuficiência cardíaca e arritmia (ver revisão Tarone e Brancaccio, 2014), sendo, portanto, apontadas como importante alvo terapêutico nas doenças cardiovasculares.

Em nosso estudo, observamos aumento na intensidade de duas proteínas de choque térmico somente no VD (proteína de choque térmico 71 kDa e a Alfa b cristalina – Cryab, também denominada Hspb5) dos animais infartados-insuficientes. Sheikh e colaboradores (2009) também observaram um aumento da Cryab no VD de porcos (neonatos) com hipertrofia induzida pelo bandejamento da artéria pulmonar, mostrando aumento dessa proteína em condições de stress (Sheikh *et al.*, 2009). Entretanto, é importante mencionar que os dados da literatura são conflitantes quanto a modulação da expressão da Cryab em diversas doenças cardiovasculares. Alguns autores descrevem aumento na intensidade do Cryab (20kDa) no IM e na insuficiência cardíaca

(Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2015), mas *downregulation* também é descrito nessas duas doenças (Hwang *et al.*, 1997; Arbustini *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000; Cubedo *et al.*, 2016). Esta divergência pode estar relacionada a diferenças em relação ao tempo de análise pós-injúria, severidade do infarto, área estudada (borda, zona remanescente ao infarto).

Sabe-se que em condições de stress, Cryab é fosforilada e translocada do citosol para o citoesqueleto (Ito *et al.*, 1997). No coração, em condições fisiológicas, a maior parte da proteína Cryab está na fração solúvel, sendo uma pequena quantidade associada aos componentes do citoesqueleto. Durante a isquemia, Cryab se desloca do citosol para os filamentos de desmina ao nível da linha Z (Golenhofen *et al.*, 1998) e, acredita-se que essa associação estabilize e proteja o citoesqueleto do dano ocasionado pelo estresse. Dessa forma, podemos sugerir que a maior expressão da Cryab no VD dos animais corresponda a uma adaptação benéfica desta câmara frente ao infartado-insuficiência cardíaca. Como já descrito, a ativação de fatores neuro-humorais no infarto, ativa proteínas quinase via AMPc, fosforila a Cryab, a qual transloca para citoesqueleto e impedindo a oligomerização da desmina nesta câmara, evitando formação de fibras amiloides (oligômeros) conforme já discutido anteriormente. Este efeito protetor da Cryab ser associada à preservação da contratilidade e relaxamento observada nessa câmara cardíaca nos animais infartados-insuficientes.

Outra proteína de choque térmico identificada em dois spots com alteração entre os grupos analisados, foi HSP 71 kDa, a qual também foi modulada positivamente apenas no VD dos animais infartados com sinais de insuficiência. A identificação dessa proteína em dois spots pode ser devido aos *splicing* alternativos dos transcritos, às modificações co- e pós-traducionais das proteínas, e também a migração diferenciada de cadeias e/ou subunidades proteicas.

Embora muitos trabalhos sobre infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca identifiquem aumento de intensidade dessas proteínas de choque térmico no VE (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2014; Cubedo *et al.*, 2016;

Bernard *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2015) em nosso trabalho não observamos aumento destas proteínas nesta câmara. Dessa forma, é possível que o comprometimento na contratilidade e relaxamento observado no VE possa ser associado à “aparente” ausência na modulação da expressão dessas proteínas frente ao dano isquêmico, principalmente no que diz respeito à Cryab na proteção dos filamentos intermediários.

Como já mencionado acima, um dos possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da IC é a formação e acúmulo de oligômeros de desmina. Além de atuarem protegendo a agregação da desmina, as chaperonas estão também envolvidas no processo de degradação de proteínas defeituosas via sistema ubiquitina-proteassoma. Nesse processo, a porção C-terminal do Hsp70 interage com a proteína (CHIP), que é uma ligase de ubiquitina altamente expressa no coração (McDonough e Patterson, 2003) que, em cooperação com Hsp70 e Bag1, controlam a degradação da miosina e de outras proteínas sarcoméricas (Willis *et al.*, 2009; Arnd *et al.*, 2010), orientando-as para a sua degradação no proteassoma (Demand *et al.*, 2001) (Figura 17). Outra via de degradação de proteínas é via autofágica, na qual as proteínas são cercadas por uma membrana dupla de vacúolos autofágicos que se fundem com os lisossomos (Arnd *et al.*, 2010). Todos esses processos correspondem a importantes instrumentos para o *turnover* de proteínas sarcoméricas, garantindo, dessa forma, a correta função contrátil e regulação da massa cardíaca (Willis e Patterson, 2013) (Figura 16).

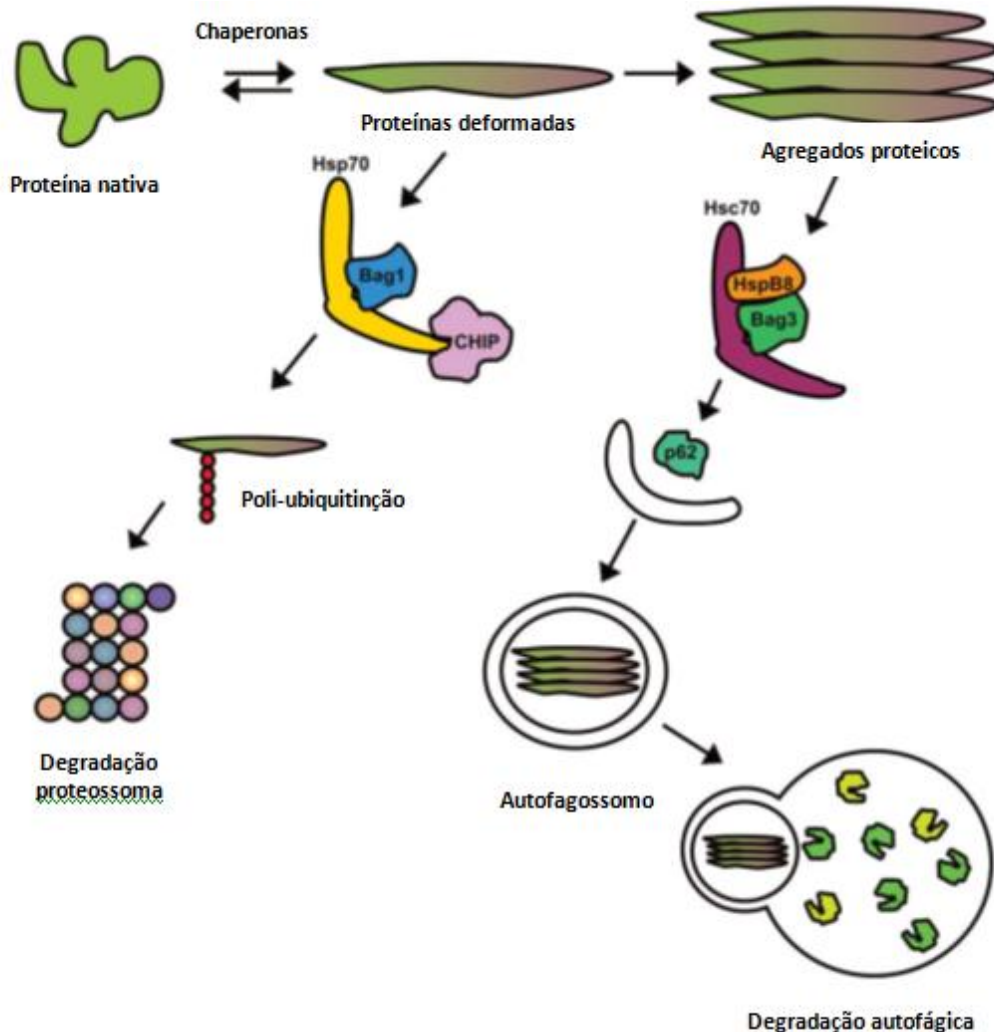


Figura 16: Controle da degradação das proteínas deformadas pelas *chaperonas* moleculares. A “maquinaria *chaperona*” desempenha um ativo papel na proteostase ao direcionar as proteínas deformadas para serem degradadas via sistema ubiquitina-proteossoma ou via autofágica. Duas moléculas co-chaperonas, Bag1 e Bag3, agem direcionando as proteínas danificadas tanto para o proteossoma quanto sistema de autofagossoma. Bag1 coopera com Hsp70 e CHIP, uma ubiquitina ligase altamente expressa no coração, por ubiquitinação dos substratos desdobrados, direciona-os para o proteossoma. Em condições de sobrecarga do proteossoma, proteínas desdobradas podem formar grandes agregados, que são dirigidos para a via de “clearance” autofágica num processo conhecido como autofagia seletiva assistida por *chaperona* (CASA) por Bag3, em associação com Hsc70, a pequena *chaperona* HspB8 e a proteína p62 direcionam para a membrana autofagossomal (Adaptado Tarone *et al.*, 2014).

Apesar do aumento das proteínas de choque térmico, foi observada uma modulação negativa - apenas no VD - da subunidade 1 do complexo ativador de proteossoma. Esse dado está de acordo com o trabalho de Fessart *et al.* (2014), em que observaram diminuição tanto da expressão proteica de subunidades do proteossoma, bem como de sua atividade, o que resultou em

acúmulo de proteínas ubiquitinadas (Fessart *et al.*, 2014). A diminuição da função do proteassoma pode contribuir para o aumento do acúmulo de proteínas, deterioração da função do miocárdio e progressão para insuficiência cardíaca (McLendon e Robbins, 2011). Embora, em nosso trabalho tenha sido observada diminuição do ativador do proteassoma apenas no VD, a qual apresentou função normal quanto aos aspectos de contratilidade e relaxamento, pode ser que esta diminuição nesta câmara seja compensada pelo aumento da Cryab observada no VD.

Os dados obtidos na análise proteômica foram validados por Western blot da desmina. Os resultados obtidos foram consistentes com os da proteômica. Foi observado aumento da intensidade da desmina tanto no VE quanto no VD dos animais com insuficiência cardíaca.

Considerando os nossos dados sobre a modulação da desmina, na insuficiência cardíaca pós-infarto, juntamente com a literatura vigente, pode-se inferir que a toxicidade cardíaca dessa proteína depende nível do aumento de sua expressão/intensidade, pois um índice maior de aumento foi observado no VE ($\approx 60\%$), que pode ser associado ao maior comprometimento desta câmara.

Como já descrito anteriormente o infarto induz ativação neurohumoral prolongada e consequente liberação de mediadores químicos, como: catecolaminas, endotelina, angiotensina II, os quais interagem com receptores acoplados a proteína G ativam quinases via AMPc, gerando a fosfo-GSK3, isoforma menos ativa, resultando em menor *status* de fosforilação da desmina, tornando-a mais susceptível à clivagem e, posterior, oligomerização, presente em processo patológicos. A alta intensidade/expressão de desmina no VE pode levar a formação e deposição de grandes quantidades de oligômeros de desmina.

Com relação ao VD, o índice de aumento da desmina foi menor (VE - 61 % e VD - 25%), pode-se inferir que este aumento não foi suficiente para prejudicar a contratilidade e relaxamento desta câmara e/ou que o aumento na expressão

da alfa-B-cristalina observado somente nessa câmara possa funcionar como um mecanismo de citoproteção, impedindo oligomerização da desmina.

Em resumo, os dados obtidos nesse estudo demonstram que as câmaras cardíacas de animais que desenvolveram insuficiência 7 dias pós-infarto, além das diferenças do ponto de vista hemodinâmico e estrutural - já bem documentadas na literatura - ocorrem também diferenças em termos de remodelamento protéico, e ainda sugerem que as câmaras apresentam remodelamento distinto. Além disso, trazem avanços no conhecimento das alterações no proteoma dos ventrículos de animais infartados-insuficientes, principalmente em relação ao VD, em que os dados disponíveis são derivados de doenças pulmonares. Os dados produzidos podem auxiliar na compreensão de mecanismos moleculares envolvidas nas alterações fisiopatológicas do infarto e insuficiência cardíaca e indentificar alvos farmacológicos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho geraram novas informações sobre o remodelamento protéico do VD e VE na insuficiência cardíaca em fase precoce ao infarto do miocárdio.

Nossos resultados mostraram:

- Que as câmaras cardíacas apresentam remodelamento protéico diferente sete dias pós-infarto em animais com sinais de insuficiência cardíaca, o qual pode ser associado com o comprometimento das câmaras: PSVE e $dP/dt+VE$ e $dP/dt-VE$ significativamente reduzidas após o infarto, enquanto que PSVD foi significativamente maior após isquemia e $dP/dt+VD$ e $dP/dt-VD$ foram preservadas após injúria.
- Diferença na intensidade/expressão de 20 proteínas no VD e 11 no VE do IM-IC - 14 dessas proteínas foram identificadas.
- Alterações foram detectadas em proteínas do metabolismo energético (carboidratos, lipídeos, aminoácidos e fosforilação oxidativa), resposta ao estresse, contração muscular e proteínas estruturais e funções diversas.
- Que as alterações incluem modulações adaptativas e mal adaptativas.
- Aumento na expressão da desmina (proteína do filamento intermediário), tanto no VD quanto no VE, sendo esse aumento mais expressivo no VE. Esta alteração pode explicar o comprometimento da contratilidade e relaxamento observada apenas no VE, pois acúmulo anormal dessa proteína está relacionado à perturbação do papel das miofibrilas, devido à formação de agregados gerando problemas no funcionamento.
- Proteínas do metabolismo energético apresentaram diminuição de expressão em ambas as câmaras, sendo esse comprometimento também mais

expressivo no VE, o que se pode sugerir que o déficit energético seja maior no VE do que no VD.

- Proteínas de choque térmico, alfa-B-cristalina e HSP-71 (moléculas cardioprotetoras em condições de estresse) apresentaram aumento de expressão apenas no VD, que pode ser apontado como motivo do menor dano funcional observado nessa câmara cardíaca.
- Nossos dados mostraram pela primeira vez que a insuficiência cardíaca, desenvolvida em fase precoce ao infarto, altera o proteoma do VD. E abrem perspectivas para futuras investigações na área das doenças cardiovasculares versus insuficiência cardíaca.

7. REFERÊNCIAS:

- Abbate A, Bussani R, Sinagra G, Barresi E, Pivetta A, et al. **Right ventricular cardiomyocyte apoptosis in patients with acute myocardial infarction of the left ventricular wall.** Am J Cardiol 102: 658–662, 2008.
- Anavekar NS, Skali H, Bourgoun M, Ghali JK, Kober L, et al. **Usefulness of right ventricular fractional area change to predict death, heart failure and stroke following myocardial infarction (from the VALIANT ECHO study).** Am J Cardiol 101: 607–612, 2008.
- Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G **Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy.** American Journal of Physiology; 248(6 Pt 2):H876-82, 1985.
- Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. **Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction.** Am J Cardiol 68: 7D–16D,1991.
- Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, et al. **Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics.** Cytometry A., 75(10): 816-832; 2009.
- Arbustini E, Morbini P, Grasso M, Fasani R, Verga L, Bellini O, Dal Bello B, Campana C, Piccolo G, Febo O, Opasich C, Gavazzi A, Ferrans VJ. **Restrictive cardiomyopathy, atrioventricular block and mild to subclinical myopathy in patients with desmin-immunoreactive material deposits.** J Am Coll Cardiol.;31:645–653, 1998.
- Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, Carvalho HF, Rodrigues SL, Rossoni LV, Mill JG. **The antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats.** Cell Physiol Biochem 2011.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT, Tajara EH. **Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas.** Rev Assoc Med Bras., 58(3):366-375, 2012.
- Bernard CC, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, et al. **Proteomic analysis of left ventricular remodeling in na experimental modelo of heart failure.** J Proteome Res., 7:5004-5016, 2008.
- Bers,D.M. **Cardiac excitation-contraction coupling.** Nature, 415: 198-204, 2002.
- Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. **The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension.** Chest 135:794–804, 2009.

Bolger AP, Sharma R, Li W et al. **Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease.** *Circulation* 106:92–99, 2002.

Burniston JG. **Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity controlled endurance exercise.** *Proteomics*. Jan;9(1):106-15, 2009.

Busatto VC, Cicilini MA, Mill JG. **Increased angiotensina-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction.** *Braz J Med Biol Res*; 30: 679-687,1997.

Bussani R, Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Dobrina A, Leone AM, et al. **Right ventricular dilatation after left ventricular acute myocardial infarction is predictive of extremely high peri-infarctual apoptosis at postmortem examination in humans.** *J Clin Pathol* 56: 672–678, 2003.

Capetanaki Y. **Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function.** *Trends Cardiovasc Med* 12:339–348, 2002.

Chen F, Chang R, Trivedi M, Capetanaki Y & Cryns VL .**Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis.** *Journal of Biological Chemistry*, 278: 6848-6853, 2003.

Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN, Saxena P, Banerjee SK, Bhadra MP. **A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats.** *J Transl Med*.11:130,2013.

Cohen JA, Kaplan MM. **Left-sided heart failure presenting as hepatitis.** *Gastroenterology* 74:583–587, 1978.

Collins JF, Pawloski-Dahm C, Davis MG, Ball N, Dorn GW, 2nd, Walsh RA. **The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure.** *J Mol Cell Cardiol.*;28:1435-43, 1996.

Cubedo J, Vilahur G, Casaní L, Mendieta G, Gómez-Jabalera E, Juan-Babot O, Padró T, Badimon L. **Targeting the molecular mechanisms of ischemic damage: Protective effects of alpha-crystallin-b.** *Int J Cardiol.*;215:406-16, 2016.

Das DK, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH. **Aerobic vs anaerobic metabolism during ischemia in heart muscle.** *Ann Chir Gynaecol.*; 76(1):68-76, 1987.

Datasus, Ministério da Saúde.. [internet]. **Sistema de informações de mortalidade. Óbitos por residência por ano do óbito segundo capítulo CID-10. Brasil, 2013.** Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 23 de maio de 2016.

Dhalla NS, Afzal N, Beamish RE et al **Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure.** Can J Cardiol 9:873–887, 1993.

Di Salvo TG, Mathier M, Semigran MJ, Dec GW **Preserved right ventricular ejection fraction predicts exercise capacity and survival in advanced heart failure.** J Am Coll Cardiol 25: 1143–1153, 1995.

Doenst, T., Pytel, G., Schrepper, A., Amorim, P., *et al.*, **Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload.** Cardiovasc Res. 86, 461-470, 2010.

Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. **The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis.** Proteomics. 3(8):1567-96; 2003.

Drake JI, Bogaard HJ, Mizuno S, Clifton B, Xie B, Gao Y, Dumur CI, Fawcett P, Voelkel NF, Natarajan R. **Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension.** Am J Respir Cell Mol Biol;45(6):1239–1247, 2011.

Erlebacher, J. A.; Weiss, J. L.; Weisfeldt, M. L.; Bulkley, B. H. **Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement.** J. Am. Coll. Cardiol.; 4, 201–8. 1984.

Faria TO, Baldo MP, Simoes MR, Pereira RB, Mill JG, et al. **Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development.** Arch Med Res 42: 274–280, 2011.

Fert-Bober J, Basran RS, Sawicka J, Sawicki G. **Effect of duration of ischemia on myocardial proteome in ischemia/ reperfusion injury.** Proteomics;8:2543–55, 2008.

Fessart D, Martin-Negrier ML, Claverol S, Thiolat ML, Crevel H, Toussaint C, Bonneu M, Muller B, Savineau JP, Delom F. **Proteomic remodeling of proteasome in right heart failure.** J Mol Cell Cardiol.;66:41-52, 2014.

Frangogiannis NG. **The mechanistic basis of infarct healing.** Antioxid Redx Signal; 8: 1907-1939, 2006.

Fuchs E., Weber K., **Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.** Annu. Rev. Biochem. 63: 345– 382, 1994.

Galie N, Hoeper MM, Humbert M, et al. **Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).** Eur Heart J;30:2493–537, 2009.

Ganguly PK, Dhalla KS, Shao Q, Beamish RE, Dhalla NS. **Differential changes in sympathetic activity in left and right ventricles in congestive heart failure after myocardial infarction.** Am Heart J; 133: 340-345,1997.

Gerdes M.A. **Cardiac Myocyte Remodeling in Hypertrophy and Progression to Failure.** Journal of Cardiac Failure; Vol. 8 No. 6 Suppl.S264, 2002.

Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F, Tavazzi L. **Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure.** J Am Coll Cardiol, 37(1):183–188, 2001.

Goldfarb LG, Dalakas MC. **Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease.** J Clin Invest 119: 1806–1813, 2009.

Golenhofen N, Ness W, Koob R, Htun P, Schaper W, Drenckhahn D. **Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein alpha-B-crystallin to Z lines of myocardium.** Am J Physiol ;274: H1457–H1464, 1998.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W & Cong J. **The calpain system.** Physiological Reviews, 83: 731-801, 2003.

Gomez-Arroyo J, Mizuno S, Szczepanek K, Van Tassel B, Natarajan R, Dos Remedios CG, Drake JI, et al. **Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension.** Circ Heart Fail 6(1): 136–144, 2013.

Gupte AA, Cordero-Reyes AM, Youker KA, Matsunami RK, Engler DA, Li S, Loebe M, Ashrith G, Torre-Amione G, Hamilton DJ **Differential mitochondrial function in remodeled right and nonremodeled left ventricles in pulmonary hypertension.** J Card Fail.;22(1):73-81, 2016.

Haas B, Serchi T, Wagner DR, Gilson G, Planchon S, Renaut J, Hoffmann L, Bohn T, Devaux Y. **Proteomic analysis of plasma samples from patients with acute myocardial infarction identifies haptoglobina as a potential prognostic biomarker.** J Proteomics. 10;75(1):229-36, 2011.

Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ. **Right ventricular function in cardiovascular disease, part I.** Circulation 117: 1436–1448, 2008.

Heather LC, Carr CA, Stuckey DJ, Pope S, Morten KJ, Carter EE, Edwards LM, Clarke K. **Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction.** Cardiovasc Res.;85(1):127-36, 2010.

Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, et al. **Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium.** Circ Res., 86(8): 846–853; 2000.

Huss JM, Kelly DP. **Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance.** J Clin Invest;115:547–55, 2005.

Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SK, Waye MM, Fung KP, Lee CY, Liew CC. **A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes.** Circulation;96:4146–4203, 1997.

Ito H, Okamoto K, Nakayama H, Isobe T, Kato K. **Phosphorylation of B-crystallin in response to various types of stress.** J Biol Chem. 1997.

Jacquet S, Yin X, Sicard P, Clark J, Kanaganayagam GS, Mayr M, Marber MS. **Identification of cardiac myosin-binding protein c as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis.** Mol Cell Proteomics. 8(12):2687-99, 2009.

Jiang B, Liao R. **The paradoxical role of inflammation in cardiac repair regeneration.** J Cardiovasc Transl Res; 3: 410-416, 2010.

Johns TNP, Olson BJ. **Experimental myocardial infarction. A method of coronary occlusion in small animals.** Ann Surg; 140: 675-682, 1954.

Juan GH, Bin GC , Li GJ, Jun LX, Bo S, Ning LX. **Comparative Proteomic Analysis in Left Ventricular Remodeling following Myocardial Infarction in Rats.** Biomed Environ Sci., 25(1): 117-123; 2012.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. **Apoptotic and necrotic myocytes cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats.** Lab Invest; 74: 86-107,1996.

Kehat I, Molkentin JD. **Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation.** Circulation.;122(25):2727-35, 2010.

Konstam MA, Salem DN, Isner JM et al **Vasodilator effect on right ventricular function in congestive heart failure and pulmonary hypertension: end-systolic pressure–volume relation.** Am J Cardiol 54:132–136, 1984.

Kostareva A, Sjöberg G, Bruton J, Zhang SJ, Balogh J, Gudkova A, Hedberg B, Edström L, Westerblad H, Sejersen T. **Mice expressing L345P mutant desmin exhibit morphological and functional changes of skeletal and cardiac mitochondria.** J Muscle Res Cell Motil 29: 25–36, 2008.

Lam L, Lind J, Semsarian C. **Application of proteomics in cardiovascular medicine.** Int J Cardiol., 108(1): 12-19; 2006.

Larose E, Ganz P, Reynolds G, Dorbala S, Di Carli MF, et al. **Right ventricular dysfunction assessed by cardiovascular magnetic resonance imaging**

predicts poor prognosis late after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 49: 855–862, 2007.

Lazarides E. **Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.** Nature;283:249–256, 1980.

Li, H., Li, J., Wang, Y., Yang, T., **Proteomic analysis of effluents from perfused human heart for transplantation: identification of potential biomarkers for ischemic heart damage.** Proteome Sci, 10: 21, 2012.

Liu T, Chen L, Kim E, Trand D, Phinney BS, Knowlton AA. **Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure.** Life Sci;101(1-2):27-36, 2014.

Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S., Stanley, W. C., **Myocardial fatty acid metabolism in health and disease.** Physiol Rev, 90, 207-258, 2010

Loscalzo J. **Proteomics in cardiovascular biology and medicine.** Circulation. Jul 29;108(4):380-3, 2003.

Machackova J Sanganalmath SK, Barta J, Dhalla KS, Dhalla NS. **Amelioration of cardiac remodeling in congestive heart failure by beta-adrenoceptor blockade is associated with depression in sympathetic activity.** Cardiovasc Toxicol; 10: 9-16, 2010.

Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, Westfall M, Robinson D, Imahashi K, Murphy E, Robbins J. **Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy.** Circulation;112(22):3451-61, 2005.

Marano G, Palazzesi S, Fadda A, Vergari A, Ferrai AU. **Attenuation of aortic banding-induced cardiac hypertrophy by propranolol is independent of beta-adrenoceptor blockade.** J Hypertens; 20: 763-769, 2002.

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

McGregor E, Dunn MJ. **Proteomics of the heart: unraveling disease.** Circ Res, 98(3): 309-321; 2006.

McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, et al. **ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association.** Circulation;119(16):2250–2294, 2009.

McLendon PM, Robbins J. **Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story.** Am J Physiol Heart Circ Physiol.;301(4):H1220-8, 2011.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. **Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats.** Cardiovasc Res, 24: 748–753, 1990.

Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. **Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats.** Braz J Med Biol Res 24: 855-858, 1991.

Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, et al. **Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape.** J Am Coll Cardiol, 19(6), 1136-44, 1992.

Mitra A, Basak T, Ahmad S, Datta K, Datta R, Sengupta S, Sarkar S. **Comparative proteome profiling during cardiac hypertrophy and myocardial infarction reveals altered glucose oxidation by differential activation of pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β .** J Mol Biol, 427: 2104–2120, 2015.

Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M et al **Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension.** Circulation 102:865–870, 2000.

Neubauer, S., **The failing heart--an engine out of fuel.** N Engl J Med, 356, 1140-115, 2007.

Oakley C **Importance of right ventricular function in congestive heart failure.** Am J Cardiol 62: 14A–19A, 1998.

Opie, L. H., Myocardial ischemia – **Metabolic pathways and implications of increased glycolysis.** Cardiovasc Drugs Ther, 4, 777–790,1990.

Opie H L, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. **Controversies in ventricular remodelling.** Lancet . 367: 356–67, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Doenças Cardiovasculares. Fact Sheets, n. 317, Mai. 2015.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 23 mai. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **O Dia Mundial do Coração 2013 preconiza hábitos de vida saudável desde a infância.** Disponível em: http://www.paho.org/bireme/index.php?id=219%3Ao-dia-mundial-do-coracao-2013-preconiza-habitos-de-vida-saudavel-desde-a-infancia&option=com_content. Acesso: em 23 mai. 2016.

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. **Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats.** Am J Physiol Heart Circ Physiol; 280: 2726-2731, 2001.

Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Meja L, Pandian NG, Hanak GG, et al. **Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction.** Am J Physiol 274: H1812–H1820, 1998.

Pawlak A, Gil RJ, Walczak E, Seweryniak P. **Desmin expression in human cardiomyocytes and selected clinical and echocardiographic parameters in patients with chronic heart failure.** Kardiol Pol;67(9):955-61, 2009.

Pereira RB, Sartorio CL, Vassallo DV, Stefanon I **Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction.** J Pharmacol Exp Ther 312: 1321–1325. 6, 2005.

Pfeffer MA, Braunwald E **Ventricular remodeling after myocardial infarction – Experimental observations and clinical implications.** Circulation 81: 1161–1172, 1990.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. **Myocardial infarct size and ventricular function in rats.** Circulation Research 44: 503-512, 1979.

Prabhu SD, Wang G, Luo J, Gu Y, Ping P, Chandrasekar B. **β -Adrenergic receptor blockade modulates Bcl-xS expression and reduces apoptosis in failing myocardium.** J Mol Cel Cardiol; 35: 483-493, 2003.

Puwanant S, Priester TC, Mookadam F, Bruce CJ, Redfield MM, Chandrasekaran K **Right ventricular function in patients with preserved and reduced ejection fraction heart failure.** Eur J Echocardiogr 10:733–737, 2009.

Ramzan, R., Weber, P., Linne, U., Vogt, S., **GAPDH: the missing link between glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation?** Biochem Soc Trans, 41, 1294-1297, 2013.

Resende MM, Kauser K, Mill JG. **Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats.** Life Sci; 78: 3066-3073, 2006.

Robinson TF, Geraci MA, Sonnenblick EH, Factor SM. **Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration.** Circ Res; 63: 577-592, 1988.

Rocha TM, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV et al. **Eletroforese Bidimensional e análises de proteomas.** Embrapa, 2005. (Embrapa. Comunicado Técnico, 136).

Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. **Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart.** *Circulation*;94:2837–2842, 1996.

Samad BA, Alam M, Jensen-Urstad K **Prognostic impact of right ventricular involvement as assessed by tricuspid annular motion in patients with acute myocardial infarction.** *Am J Cardiol* 90:778–781, 2002.

Samak,M.; Fatullayev,J.; Sabashnikov,A.; Zeriuoh,M.; Schmack,B.; Farag,M.; Popov.A.F.; Dohmen,P.M.; Choi,Y.H.; Wahlers,T.; Weymann,A. **Cardiac hypertrophy: An introduction to molecular and cellular basis.** *Medical Science Monitor Basic Research*, 22:75-79, 2016.

Sarnoff SJ, Berglund E . **Ventricular function. I. Starling's law of the heart studied by means of simultaneous right and left ventricular function curves in the dog.** *Circulation* 9:706–718, 1954.

Sartório CL, Pinto VD, Cutini GJS, Vassallo DV, Stefanon I. **Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction.** *J Cardiovasc Pharmacol*; 45: 321-326, 2005.

Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D., Snyder, S. H., **Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 11669-11674, 1997.

Sharov VG, Kostin S, Todor A, Schaper J, Sabbah HN. **Expression of cytoskeletal, linkage and extracellular proteins in failing dog myocardium.** *Heart Fail Rev*;10(4):297–303, 2005.

Sheikh AM, Barrett C, Villamizar N, Alzate O, Valente AM, Herlong JR, Craig D, Lodge A, Lawson J, Milano C, Jaggars J.**Right ventricular hypertrophy with early dysfunction: A proteomics study in a neonatal model.** *J Thorac Cardiovasc Surg*.137(5):1146-53, 2009.

Silbiger VN, Luchessi AD, Hirata RD, Neto LG, Pastorelli CP, Ueda EK, et al. **Time course proteomic profiling of human myocardial infarction plasma samples: an approach to new biomarker discovery.** *Clin Chim Acta*. 412:1086–93, 2011.

Small J.V, Gimona M., **The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell,** *Acta Phyiol. Scand*. 164:341– 348, 1998.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** vol.93 no.1 supl.1 São Paulo 2009.

Spindler M. Meyer K, Stromer H, Leupold A, Boehm E, Wagner H. **Creatine Kinase-deficient hearts exhibit increased susceptibility to ischemia**

reperfusion injury and impaired calcium homeostasis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Sep; 287(3). H1039-1045. 2004.

Stefanon I, Valero-Muñoz M, Fernandes AA, Ribeiro RF Jr, Rodríguez C, Miana M, Martínez-González J, Spalenza JS, Lahera V, Vassallo PF, Cachofeiro V. **Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats.** PLoS One. May 31;8(5), 2013.

Su YR, Chiusa M, Brittain E, Hemnes AR, Absi TS, Lim CC, Di Salvo TG. **Right ventricular protein expression profile in end-stage heart failure.** Pulm Circ. Sep;5(3):481-97, 2015.

Sun JP, James KB, Yang XS et al **Comparison of mortality rates and progression of left ventricular dysfunction in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and dilated versus nondilated right ventricular cavities.** Am J Cardiol 80:1583–1587, 1997.

Sutton MG, Sharpe N **Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy.** Circulation 101: 2981–2988, 2000.

Tarone G, Brancaccio M, **Keep your heart in shape: molecular chaperone networks for treating heart disease.** Cardiovasc Res; 102: 346–361, 2014.

Unlu M, Morgan ME, Minden JS. **Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts.** Electrophoresis.18(11):2071-7; 1997.

Urashima T, Zhao M, Wagner R, Fajardo G, Farahani S, Quertermous T, Bernstein D. **Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis.** Am J Physiol Heart Circ Physiol; 295(3):H1351–H1368, 2008.

Van Eyk JE. **Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research.** Circ Res, 108(4): 490-498; 2011.

Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA et al. **Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure.** Circulation 114:1883–1891, 2006.

Wasinger VC, Cordwell, SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. **Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium.** Electrophoresis, 1090-1094. 1995.

Willis MS, Patterson C. **Proteotoxicity and cardiac dysfunction—Alzheimer’s disease of the heart?** N Engl J Med;368:455–464, 2013.

Willis MS, Schisler JC, Portbury AL, Patterson C. **Build it up-tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere.** *Cardiovasc Res*;81:439–448, 2009.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF et al. **Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.** *Biotechnol Genet Eng Ver*, 13:19-50; 1996.

Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. **Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism.** *Biochim Biophys Acta*. Sep 25;1102(2):119-66, 1992.

Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, Erickson JM, Zhang JQ. **Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodeling in rats.** *Cardiovasc Res*; 78: 523-532, 2008.

Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M. **Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays.** *Circulation.*;102:3046–3052, 2000.

Yao, L. L., Wang, Y. G., Liu, X. J., Zhou, Y., *et al.*, **Phenylephrine protects cardiomyocytes from starvation-induced apoptosis by increasing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity.** *J Cell Physiol*, 227, 3518- 3527, 2012.

Zamilpa R, Lopez EF, Chiao YA, Daí Q, Escobar GP, Hakala K, Weintraub ST, Lindsey ML. **Proteomic analysis identifies in vivo candidate matrix metalloproteinase-9 substrates in the left ventricle post-myocardial infarction.** *Proteomics*, 10: 2214–2223; 2010.

Zornoff LAM, Skali H, Pfeffer MA, Sutton MSJ, Rouleau JL, et al. **Right ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 39: 1450–1455, 2002.