

**Alterações no perfil proteico do  
ventrículo esquerdo de ratos após  
tratamento com óleo de soja: um estudo  
proteômico.**

**Taisla Soprani**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, agosto de 2014

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);
- Instituto Nacional e Tecnologia (INCT);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

**Soprani, Taisla 1988**

**Alterações no perfil proteico do ventrículo esquerdo de ratos após tratamento com óleo de soja: um estudo proteômico.** [Vitória] 2014

78pp, 29,7cm (UFES, M.SC., Ciências Fisiológicas, 2014)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Gomes de Figueiredo

1. Ômega-3 2. Óleo de soja 3. Intramuscular 4. Análise proteômica

Àqueles que me apoiam e me encorajam sempre.  
Meus pais, irmã, irmão, e sobrinho, amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Tenham certeza que sou eternamente grata e espero que gostem do resultado final.

## RESUMO

Vários estudos têm demonstrado que o consumo de óleos vegetais, como o óleo de soja, ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) exerce efeitos benéficos à saúde, por prevenir ou reduzir os fatores de risco das doenças cardiovasculares. Embora a demonstração dos efeitos benéficos do consumo de ácidos graxos insaturados sobre o sistema cardiovascular tem sido comprovada fisiologicamente em nível macroscópico, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares/moleculares responsáveis pelo efeito cardioprotetor dos ácidos graxos insaturados. Neste trabalho, foi utilizada uma abordagem proteômica comparativa, por eletroforese em gel bidimensional (2D) acoplada à espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF), para investigar diferenças no proteoma de corações (ventrículo esquerdo - VE) de ratos não tratados (grupo controle - CT) e tratados (grupo tratado - TR) com 0,1mL de óleo de soja via IM por 15 dias. O óleo de soja induziu melhoria na função ventricular esquerda, e uma alteração significativa no proteoma do VE. Os animais TR, apresentavam um menor valor da PDfVE. O perfil proteico dos VE revelou diferença na expressão de 60 spots proteicos ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT e TR, 14 destes foram identificadas por MS e MS/MS, sendo 12 proteínas não redundantes. Alterações robustas foram detectadas em proteínas envolvidas na contração muscular, estrutural e sistema antioxidante. Os animais TR apresentavam aumento da intensidade de proteínas envolvidas na contração muscular, miosina de cadeia leve-3 (MCL-3) e creatina quinase M (CKM), diminuição da intensidade da proteína do citoesqueleto, a desmina e aumento da intensidade da enzima antioxidante tireodoxina. A alteração dos níveis de "expressão" destas proteínas no grupo TR com óleo de soja podem ser associadas com a melhoria da função ventricular esquerda.

## ABSTRACT

Several studies show that consumption of vegetable oils, such as soybean oil, rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) has beneficial health effects by preventing or reducing the risk factors of cardiovascular diseases. While the demonstration of the beneficial effects of the consumption of unsaturated fatty acids on the cardiovascular system has been proven in macroscopic level, the molecular/cellular mechanisms responsible for this phenomenon are poorly understood. In this work a comparative proteomic approach, two-dimensional gel electrophoresis (2D) coupled to mass spectrometry (MALDI-TOF / TOF) was applied to investigate the rats heart proteome differences (left ventricle - LV) that not received (control group - CT) and received 0.1mL of soybean oil intramuscularly for 15 days (treated group - TR). Soybean oil treatment induced improvement in left ventricular function, and a significant change in LV proteome in the TR animals. The TR animals present a lower value of LVEDP. The protein profile of VE revealed differences in the expression of 60 protein spots ( $p < 0.05$ ) between CT and TR groups, 14 of these were identified by MS and MS / MS, being 12 non-redundant proteins. Robust changes were detected in proteins involved in muscular contraction, structural and antioxidant system. The TR group presented an increase in intensity of proteins involved in muscle contraction (myosin light chain 3-(3-MCL), creatine kinase M (CKM)) and tireodoxina antioxidant enzyme. Low intensity cytoskeletal protein, desmin, was detected. The differences in the intensity levels of these spots-related proteins in TR group, might be linked to improvement in left ventricular function.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Aspectos Epidemiológicos das Doenças Cardiovasculares .....	15
1.2 Óleos vegetais: fonte de ácidos graxos .....	16
1.3 Óleos vegetais e a DCV.....	18
1.4 Óleos vegetais e seu metabolismo .....	20
1.1 Proteômica .....	24
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo geral:.....	29
2.2 Objetivos específicos: .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Aspectos éticos .....	31
3.2 Animais.....	31
3.3 Grupos experimentais.....	31
3.4 Medidas de Parâmetros Hemodinâmicos .....	31
3.5 Sacrifício dos animais e coleta de amostras .....	32
3.6 Análise comparativa do VE dos animais dos dois experimentais POR 2DE/MS-MS/MS.....	32
3.6.1 Obtenção do extrato proteico dos ventrículos esquerdos .....	33
3.6.2 Eletroforese bidimensional dos VE dos animais experimentais .....	35
3.6.3 Focalização isoeletrica (1ª dimensão).....	35
3.6.4 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas .....	35
3.6.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE - (2ª dimensão) 36	
3.6.6 Coloração com Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250).....	36
3.6.7 Aquisição, processamento e análise das imagens.....	37
3.6.8 Identificação das proteínas com diferença de expressão entre os grupos	37
3.6.9 Pesquisa em banco de dados.....	39
3.7 Análise estatística.....	39
3.8 Padronização de condições ideais para Eletroforese Bidimensional do EPVE.40	

3.8.1	Testes de precipitação das proteínas do EPVE .....	40
3.8.2	Adição de DTT ao tampão da amostra .....	41
3.8.3	Avaliação da quantidade proteica aplicada no gel .....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1	Medidas Ponderais .....	43
4.2	Medidas Hemodinâmicas.....	43
4.3	Avaliação da Padronização da Eletroforese Bidimensional.....	44
4.4	Análise comparativa do proteoma do ventrículo esquerdo de ratos controle e tratado com óleo de soja.....	47
4.5	Identificação dos spots proteicos com diferentes intensidades.....	51
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES ....</b> Erro! Indicador não definido.	
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura dos ácidos graxos essenciais. (a) Linoléico ( $\omega$ -6) e (b)  $\alpha$ -Linolênico ( $\omega$ -3)..... 17
- Figura 2: Síntese de ácidos  $\omega$ 3 a partir do ácido  $\alpha$ -linolênico. (A) Formação do ácido eicosapentaenóico (EPA). (B) Formação do ácido docosa-hexaenóico (DHA). ..... 22
- Figura 3: Fluxograma das etapas experimentais utilizadas para a análise proteômica..... 34
- Figura 4: Perfis proteicos 2DE: (a) EPVE (b) Proteínas de EPVE após precipitação com acetona. (c) Proteínas de EPVE após precipitação com acetona/TCA. Amostras foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 e SDS-PAGE 12,5% foi usada para a segunda dimensão. Os géis foram corados com Coomassie G-250. .... 45
- Figura 5: Perfis proteicos 2DE obtidos com processo de adição de DTT ao tampão da amostra. Extrato proteico solúvel de VE foi separado por IEF em “IPG strip” pH 3-10. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12,5%. Os géis foram corados com Coomassie G-250. (a) tampão da amostra em concentração normal de DTT. (b) adição de DTT ao tampão da amostra..... 45
- Figura 6: Perfis proteicos 2DE de EPVE: (a) 500  $\mu$ g (b)650 $\mu$ g, (c) 800  $\mu$ g e (d)1000 $\mu$ g de proteínas obtidos com diferentes quantidades de proteínas aplicadas à strip. Extrato proteico solúvel de VE separado por IEF em “IPG strip” pH 3-10. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12,5%. Os géis foram corados com Coomassie G-250..... 46
- Figura 7: Perfil proteico dos VE dos animais dos grupos controle e tratado. Alíquotas de 800 $\mu$ g de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 NL de 17 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%. O triângulo vermelho identifica a imagem selecionada como referência..... 49
- Figura 8: Análise de fatores. Gráfico de projeção dos géis analisados para delineamento dos grupos experimentais..... 50

Figura 9: Comparação do perfil proteico dos géis bidimensionais de referência dos grupos CT e TR. Os “spots” numerados e circundados são os que apresentam diferença de expressão entre os grupos. ° spots somente visualizados nos géis do grupo TR. \* spots identificados por MALDI TOF-TOF.

..... 54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores das medidas ponderais obtidas no primeiro dia após o final do tratamento dos grupos controle (CT) e tratado (TR).....	43
Tabela 2: Parâmetros hemodinâmicos obtidos no primeiro dia após o final do tratamento com óleo de soja. ....	44
Tabela 3: Número de spots observados no 2DE/SDS-PAGE para cada replicata biológica. ....	47
Tabela 4: Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos. As imagens foram relacionadas com a imagem do gel de referência de cada grupo. ....	48
Tabela 5: Identidade dos “spots” proteicos diferentemente expressos entre os grupos CT e TR, identificados por MS e MS/MS. Homologia com a taxonomia <i>Rattus norvegicus</i> . ....	52
Tabela 6: Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos controle (CT) e tratado (TR) com óleo de soja. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

2DE	Eletroforese bidimensional
AA	Ácido Araquidônico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	ATP Sintase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHAPS	3-([3-cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico)
CK	Creatina Quinase
CKM	creatina Quinase do tipo M
CKmi	Creatina Quinase Mitocondrial
CKMM	Creatina Quinase do tipo M
CT	Grupo Controle
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DHA	Ácido Docosahexaenóico
dP/dt+	Derivada da Pressão Positiva
dP/dt-	Derivada da Pressão Negativa
DTT	Dithiothreitol
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
EPM	Erro Padrão da Média
EPVE	Extrato Protéico de Ventrículo Esquerdo
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Frequência Cardíaca

GO	Gene Ontology
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IEF	Focalização Isoelétrica
IPG	Immobilized pH Gradient (gradiente de pH imobilizado)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MALDI-TOF/TOF	- Time of Flight/Time of Flight (Ionização/Desorção a Laser assistida por Matriz – Tempo de Vôo/Tempo de Vôo)
MCL	Miosina de Cadeia Leve
MS	Espectrometria de massas
m/z	Relação massa/carga
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NCBI/nr	National Center for Biotechnology Information non-redundant (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundantes)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAD	Pressão Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Sistólica
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
PC	Peso Corporal
PDf	Pressão Diastólica Final
PDfVE	Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo
PE-50	Polietileno 50
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PPARs	Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomos

PPu	Peso do Pulmão Úmido
PPu/PC	Peso do Pulmão Úmido dividido pelo Peso Corporal
PSA	Persulfato de Amônio
PSVE	Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo
PUFAs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
PVD	Peso do Ventrículo Direito
PVD/PC	Peso do Ventrículo Direito dividido pelo Peso Corporal
PVE	Peso do Ventrículo Esquerdo
PVE/PC	Peso do Ventrículo Esquerdo dividido pelo Peso Corporal
RXR	Ácido 9-cis Retinóico
TR	Grupo tratado
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	N,N-Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TR	Grupo Tratado
VE	Ventrículo Esquerdo
$\omega$ -3	Ômega-3
$\omega$ -6	Ômega-6
$\omega$ -9	Ômega-9

# INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Epidemiológicos das Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) consistem em uma das maiores causas de morte na atualidade, perfazendo 30% das mortes no mundo. Cerca de 15 milhões de pessoas, acometidos por alguma DCV, morrem por ano (OMS, 2013). Mais de três milhões dessas mortes ocorreram antes dos indivíduos completarem 60 anos de idade, e estas poderiam ter sido, em grande parte, evitadas utilizando medidas de prevenção (OMS, 2011).

No Brasil, no ano de 2012, as DCV foram a principal causa de morbidade de indivíduos com mais de 39 anos de idade, o que consiste de 20,95% das internações hospitalares, consumindo boa parte dos recursos do Sistema Único de Saúde (SUS) (DATASUS, 2013). Sugere-se que 80% dos casos de morte por doenças cardiovasculares estejam associados a fatores de risco já conhecidos (Mackay e Mensah, 2004). A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) reconhece a necessidade de uma ação integrada para a prevenção das DCV, e propõe aos países membros o estabelecimento de metas globais para redução, em 20%, da taxa de mortalidade por DCV nesta década (2011-2020) em relação à década passada.

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, estima-se que até 2030 as DCV serão a maior causa de morte da população. Contrariamente, a incidência e a prevalência das DCV vêm apresentando declínio, em anos recentes, em países desenvolvidos. Nos EUA a prevalência de DCV decresceu 0,7% no período de 2006-2010 (CDC/USA, 2011). Na Inglaterra, de 2002 a 2010, a taxa de mortalidade por essas doenças foi reduzida em 50%, enquanto a incidência de infarto agudo do miocárdio (IAM), uma DCV, e a taxa de mortalidade imediata reduziram cerca de 30% (Smolina *et al.*, 2012). A redução desses índices tem sido atribuída à melhoria nas medidas de prevenção e no tratamento médico imediato das DCV.

A doença cardiovascular ocorre em consequência de uma série complexa de eventos que se inicia com um desequilíbrio na homeostase do organismo, causado por interações anormais do ambiente associadas a alterações genéticas (Aguirre *et al.*, 1994; Mehta *et al.*, 2001). As manifestações clínicas mais comuns das DCV incluem: (i) infarto agudo do miocárdio (IAM); (ii) insuficiência cardíaca congestiva (ICC); (iii) acidente vascular cerebral (AVC); (iv) angina, (v) morte súbita entre os 50 e 60 anos em homens, e entre os 60 e 70 anos em mulheres, sendo que o índice de mortalidade aumenta progressivamente com a idade; e (vi) cardiomiopatias.

### **1.2 Óleos vegetais: fonte de ácidos graxos**

Os óleos vegetais de diversos tipos de frutos e sementes apresentam triacilgliceróis esterificados com uma maior proporção de ácidos graxos poliinsaturados do que ácidos graxos saturados. Sendo, portanto, considerado uma fonte importante de ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimentos variados, que podem ser classificadas como ácidos graxos de cadeia curta (2 a 4 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos). Os ácidos graxos também podem ser classificados em saturados e insaturados, dependendo da presença de duplas ligações em sua cadeia. Quando o ácido graxo possui uma única dupla ligação, é denominado monoinsaturado, se contém duas ou mais duplas ligações, poliinsaturado (PUFAs).

O grau de insaturação dos ácidos graxos influencia o seu ponto de fusão, quanto maior o índice de insaturação menor o ponto de fusão de uma gordura. A insaturação de ácidos graxos, devido a sua configuração geométrica *cis*, provoca uma curvatura na cadeia do hidrocarboneto, dificultando o empacotamento da rede cristalina. Consequentemente a interação entre eles é mais fraca e gasta-se menos energia para desfazer estas interações. Portanto, óleos vegetais ricos em ácidos graxos insaturados são líquidos quando em temperatura ambiente, 25 °C .

Os ácidos graxos insaturados são classificados de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir do grupo metila terminal: ômega-3 ( $\omega$ -3), sendo o ácido alfa linolênico (18:3,  $\Delta^{9,12,15}$ ) um representante desta classe; (ii) ômega-6 ( $\omega$ -6) sendo o ácido linoléico (18:2,  $\Delta^{9,12}$ ) (fig.1); (iii) ômega-9 ( $\omega$ -3 ou n-3). O grau de insaturação dos ácidos graxos implica nas diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais.

Dentre os ácidos graxos insaturados, alguns dos PUFAs como o ômega-3 e ômega-6 são necessários à dieta, e então classificados como essenciais. O organismo de mamíferos é incapaz de sintetizar estes compostos pois não possuem dessaturases  $\Delta$ 12 e  $\Delta$ 15 (que introduzem duplas entre os carbonos 12 - 13 e 15 - 16 por oxidação), as quais são responsáveis pela síntese destes PUFAs.

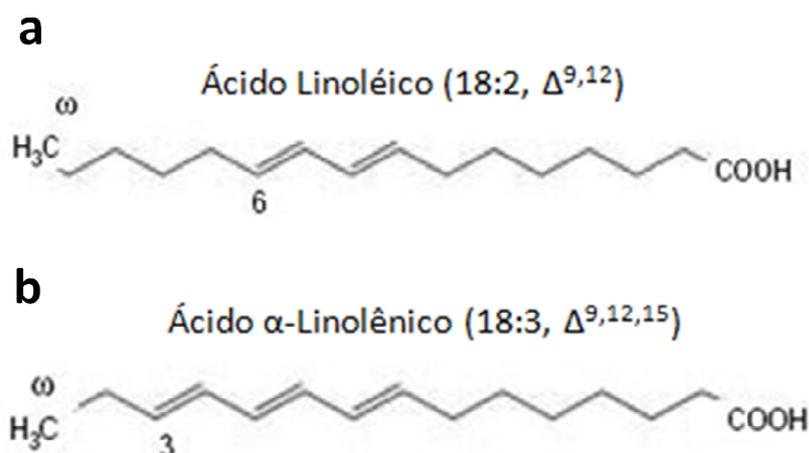


Figura 1: Estrutura dos ácidos graxos essenciais. (a) Linoléico ( $\omega$ -6) e (b)  $\alpha$ -Linolênico ( $\omega$ -3).

### 1.3 Óleos vegetais e a DCV

A OMS estima que o índice de mortalidade cardiovascular poderia ser diminuído em 75% com mudanças no estilo de vida da população. Várias mudanças no estilo de vida são recomendadas para prevenção das DCV. A prática de atividade física, o controle de peso, o consumo moderado de álcool, o abandono do tabagismo e uma alimentação saudável são recomendados. A prática de alimentação saudável, entre outros alimentos, tem incluído o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como peixes, óleo de soja, canola, mostarda (SBC, 2013).

Diversos óleos são utilizados pela população. Dentre os principais podemos citar os óleos de: canola, girassol, gergelim, amendoim, milho, oliva, e soja (o mais usado na nossa culinária). Este último é composto por 54,5% de Ácido Linoléico (18:2,  $\Delta^9,12$ ), 7,2% de Ácido  $\alpha$ -Linolênico (18:3,  $\Delta^{9,12,15}$ ), 23,2 % de Ácido Oléico (18:1  $\Delta^9$ ), 10,5% de Ácido Palmítico (16:0) e 4,6% de outros ácidos graxos (Ohara *et al.*, 2008).

As primeiras evidências dos benefícios do consumo de ácidos graxos poliinsaturados na redução de DCV apareceram no final de 1970, decorrentes de estudos epidemiológicos realizados em populações que consumiam grandes quantidades de peixes que são ricos em PUFA's (Ayerza e Coates, 2005). Em 1986, estudos revelaram uma baixa prevalência de aterosclerose e doença coronariana entre os esquimós da Groelândia e em algumas comunidades japonesas, onde as dietas eram ricas em gorduras PUFA n-3 derivada de peixes e animais marinhos (Lee *et al.*, 1986). Desde então a relação benéfica entre os ácidos graxos insaturados e as doenças cardiovasculares tem sido amplamente estudada.

Vários benefícios do uso da suplementação com ac. graxos poliinsaturados têm sido descritos na literatura, os quais incluem: diminuição dos níveis de triglicerídeos sanguíneos (Phillipson *et al.*, 1985); redução da agregação plaquetária e produção de tromboxano; aumento da produção de prostaciclina (Guivernau *et al.*, 1994), e prevenção de trombose e aterosclerose (Dyerberg *et*

*al.*, 1978). Todos esses benefícios têm sido fortemente correlacionados à presença do ácido  $\alpha$ -Linolênico (omêga-3) (18:3,  $\Delta^{9,12,15}$ ) e têm sido relatados em inúmeros estudos na literatura.

Baylin et al (2003) realizaram um estudo com uma amostragem de indivíduos da região metropolitana de São José, Costa Rica, composta de 482 pacientes sobreviventes de um infarto agudo do miocárdio (IAM) e de 482 da população controle. Neste estudo a concentração de alfa-linolênico, gorduras trans e ácido-linoleico foi mensurada no tecido adiposo dos pacientes, por cromatografia gasosa, e foi demonstrado que existe uma correlação inversa entre a concentração de alfa-linolênico no tecido adiposo e o risco de infarto.

Em 2004, em um estudo epidemiológico na Índia, Rastogi e colaboradores obtiveram informações socioeconômicas e nutricionais por meio de aplicação de um questionário, durante um ano, para 350 pacientes com idade entre 24-71 anos, acometidos por um IAM e 700 controles. Foi observada uma correlação significativa, dose dependente inversa entre a ingestão de vegetais (rico em ácido  $\alpha$ -linolênico) e risco de IAM. Esta correlação foi ainda mais evidente em indivíduos que ingeriram em média 3,5 porções/semana de vegetais de folhas verdes em comparação com aqueles que consumiram 0,5 porção/semana, os primeiros ainda apresentavam 6,7% de redução de risco de IAM. Os autores demonstraram que a utilização do óleo de mostarda é melhor do que a do óleo de girassol (comumente utilizado no preparo dos alimentos neste país), já que seu uso foi associado com um menor risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Rastogi *et al.*, 2004).

Um estudo longitudinal realizado com homens saudáveis (40-75 anos) durante 6 anos, demonstrou uma diminuição de 40% do risco de DCV fatal, em indivíduos com o consumo de ácido  $\alpha$ -linolênico aumentado de 1%. Além disto, foi demonstrado que homens que ingeriam cinco vezes mais de gordura saturada apresentavam risco relativo de infarto do miocárdio 1,22 e para a doença cardíaca coronária fatal foi 2,21 maior que os com consumo moderado. A ingestão de ácido linolênico foi inversamente associada com o risco de

infarto do miocárdio, reduzindo o risco para 0,53 (0,30-0,95) com o aumento de apenas 1% na ingestão (Ascherio *et al.*, 1996).

#### 1.4 Óleos vegetais e seu metabolismo

Embora não possam ser sintetizados por mamíferos, os ácidos graxos essenciais, como o ácido  $\alpha$ -Linolênico e  $\alpha$ -Linoléico, são importantes pois servem como precursores de ácidos graxos com maior número de carbono e de insaturações, os quais estão envolvidos em vários processos fisiológicos. O ácido araquidônico (AA 20:4  $\Delta$  5,8,11,14) proveniente do ácido linoléico, o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5) e ácido docosahexaenóico (DHA 22:6  $\Delta$ ), provenientes do ácido  $\alpha$ -linolênico (Ratnayake and Galli, 2009)(figura 2), são exemplos destes.

As modificações ocorrem na porção carboxi-terminal e envolvem reações de dessaturação e alongamento, ou retirada de carbonos da cadeia, que ocorrem no retículo endoplasmático. As reações de dessaturação são catalisadas pelas Acil-CoA graxo dessaturases, as quais são oxidases de função mista. O alongamento da cadeia ocorre através do sistema de alongamento dos ácidos graxos o qual consiste de 4 reações: adição de *dois* carbonos, seguida por redução desidratação e redução. Para formação dos ácidos graxos derivados inicialmente, o ácido  $\alpha$ -Linolênico (18:3  $\Delta$ <sup>9,12,15</sup>) forma o 18:4  $\Delta$ <sup>6,9,12,15</sup> por ação da  $\Delta$ -6 dessaturase, em seguida ocorre o alongamento formando o 20:4  $\omega$ -3 e então é convertido ao ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5  $\omega$ -3) pela  $\Delta$ -5 dessaturase. O EPA pode ser alongado pela elongase-2 para 22:5  $\omega$ -3 e então até 22:5  $\omega$ -3, seguido por uma  $\Delta$ -6 dessaturase para formar o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ -3).

A figura 2 mostra um esquema das reações destas modificações. Como pode ser observado na figura, as insaturações presentes na porção metila do ácido graxo permanecem inalteradas, sendo esses ácidos derivados considerados também  $\omega$ -3. Estes  $\omega$ -3 são precursores de prostanóides série-3 e leucotrienos série-5, que estão associados às propriedades anti-inflamatórias e antitrombóticas (McKenney e Sica, 2007). O ácido araquidônico, um  $\omega$ -6 (20:4

$\Delta^{5,8,11,14}$ ), é um importante precursor dos eicosanóides, prostanóides série-2 e leucotrienos série-4, que estão associados às atividades pró-inflamatória e pró-trombótica. Este ácido é derivado do ácido linoleico, formado por reações de dessaturação 6, alongamento e dessaturase 5.

Pepe e McLennam (2002) demonstraram os efeitos benéficos de uma dieta rica em óleo de peixe sobre a hemodinâmica ventricular e consumo de oxigênio do miocárdio. Neste estudo foram avaliados os efeitos de 3 dietas: (i) uma dieta padrão rica em ácidos graxos poliinsaturados ( $\omega$ -6); (ii) uma dieta rica em gordura animal saturada; e (iii) uma dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados ( $\omega$ -3). A dieta rica em ácidos graxos  $\omega$ -3 foi capaz de reduzir marcadores isquêmicos como acidose, concentração de  $K^+$  extracelular, lactato, atividade da creatina quinase, e aumentou a contratilidade cardíaca durante a reperfusão. Contrapondo este resultado, os animais que receberam a dieta rica em gordura animal saturada apresentaram diminuição na taxa do consumo de oxigênio, baixa reserva de perfusão coronária e piora na recuperação da função contrátil durante a reperfusão. Assim, a melhora da função contrátil cardíaca pós-isquêmica em ratos, pode ser atribuída à incorporação destes ácidos graxos (EPA e DHA) a lipídeos plasmáticos e lipídeos teciduais (Pepe e McLennam, 2002).

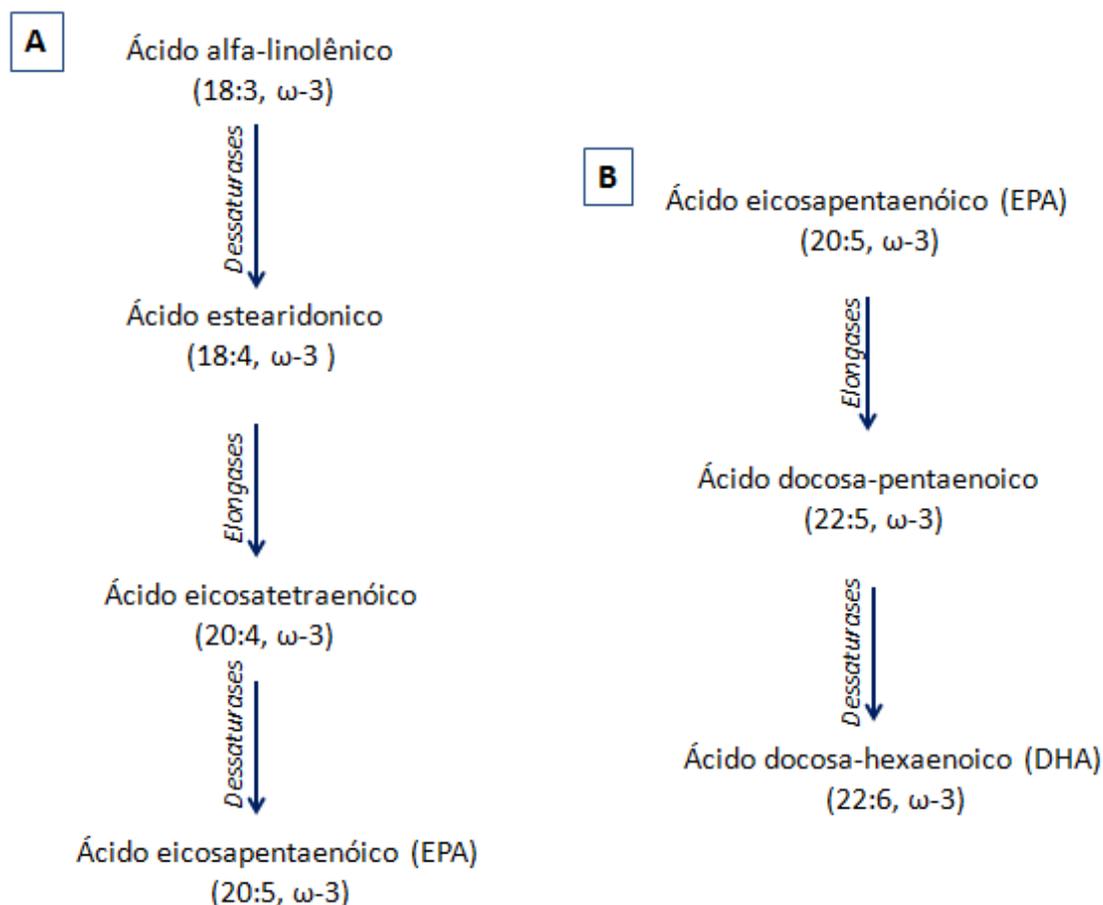


Figura 2: Síntese de ácidos ω-3 a partir do ácido α- linolênico. (A) Formação do ácido eicosapentaenóico (EPA). (B) Formação do ácido docosa-hexaenóico (DHA).

Como já descrito, a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados contribui para: modulação da composição, fluidez, permeabilidade seletiva da membrana celular, sinalização celular e regulação da expressão de genes. Estes compostos são considerados potentes ativadores de PPARs (receptores ativados por proliferadores peroxissomos) que, por sua vez, controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose, lipídio, e adipogênese (Sirtori e Galli, 2002; Lombardo e Chicco, 2006).

Os PPAR são membros da superfamília de receptores de hormônios esteróides que atuam como fatores de transcrição ativados por ligantes. Tais receptores possuem três isoformas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ), que exibem padrões de expressão tecido-específicos e modulam a transcrição de diferentes genes

envolvidos na homeostase e no metabolismo dos lipídeos (Staels *et al.*, 1997; Schoonjans *et al.*, 1997). Quando ativados, os PPAR formam heterodímeros com o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR), que se ligam a elementos responsivos (PPRE) na região promotora dos genes alvos, alterando sua velocidade de transcrição (Schoonjans *et al.*, 1997; Fruchart *et al.*, 1999). Já foram identificados mais de 300 genes alvos de PPAR (Michalik *et al.*, 1999), e seus ligantes naturais conhecidos são os ácidos graxos, preferencialmente os de cadeia longa, como os ácidos graxos poliinsaturados DHA (ácido docosahexaenóico), linoléico, araquidônico e seus derivados (leucotrienos, prostaglandinas e os saturados C6-C18).

Além disto em um trabalho recente Ribeiro Jr e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos do tratamento de óleo de soja (0,1mL) via intramuscular por 15 dias na pressão arterial e ventricular; na mecânica do miocárdio e nas proteínas envolvidas no processo de contração muscular e foi demonstrado que o tratamento com óleo de soja aumenta o desempenho do VE sem alterar a pressão arterial. Estas mudanças foram associadas com um aumento na atividade da ATPase miosínica e da expressão da SERCA2a.

As alterações na expressão proteica induzidas pelo óleo de soja no VE, observadas por estes últimos autores, foram pontuais. Considerando que já está bem descrito que os PUFAs presentes no óleo de soja controlam a expressão de genes envolvidos em processos fisiológicos, este trabalho propôs avaliar de forma global as alterações proteicas induzidas pelo óleo de soja no VE. Para isto, utilizamos uma análise proteômica comparativa por eletroforese bidimensional (2DE) acoplada à espectrometria de massas do VE de ratos tratados e não tratados com óleo de soja.

## 1.1 Proteômica

O termo proteoma surgiu pela primeira vez em 1995 e foi usado por Marc Wilkins, para designar o complemento proteico total expresso por um genoma, por uma célula ou por um tipo de tecido. Atualmente, o termo proteoma é definido como o conjunto de todas as proteínas presentes em uma célula ou em um organismo, num dado momento, incluindo não somente aquelas traduzidas diretamente a partir do material genético, mas também as proteínas modificadas a partir de “splicing” alternativo, processamento pós-traducional, ou de uma combinação de ambos, resultando em modificações que têm o potencial de alterar a estrutura e/ou a função proteica (Apweiler *et al.*, 2009).

Determinar as funções das proteínas e suas interações representa um grande desafio. A proteômica, entretanto, pode ajudar a estudar a complexidade das proteínas, seu papel nos organismos e sua função biológica. A análise proteômica consiste em um amplo grupo de tecnologias decorrentes de métodos físico-químicos de análise de proteínas e envolve: métodos de separação e análise de proteínas (cromatografias, focalização isoeletrica, eletroforeses e espectrometria de massas) e bioinformática (Van Eyk, 2011).

Enquanto o genoma é relativamente constante, o proteoma é altamente dinâmico e varia de acordo com o tipo e o estado funcional da célula, podendo refletir mudanças características e imediatas, em resposta, por exemplo, a estímulos externos e a processos patológicos (Apweiler *et al.*, 2009). Proteínas estão diretamente envolvidas em praticamente todos os processos celulares, influenciando assim o fenótipo celular e, portanto, o tecido ou órgão (Lam *et al.*, 2006). Portanto, a análise do proteoma mostra-se significativamente mais estimulante e complexa do que o sequenciamento do genoma (Rotilio *et al.*, 2012).

Uma das grandes inovações prometidas pelo conhecimento do proteoma, além do mapeamento das vias metabólicas celulares, é a possibilidade de identificação de moléculas que, em última análise, podem ser utilizadas como alvos de drogas específicas ou como marcadores biológicos. A identificação

dos mecanismos fisiopatológicos de doenças por meio da comparação e análise diferencial da expressão proteica, denominada análise proteômica comparativa, pode fornecer informações valiosas para o diagnóstico; tratamento médico; e prognóstico. A análise proteômica tem sido amplamente aplicada em varias 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.

Dentre as técnicas usadas na análise proteômica para fracionar misturas proteicas complexas, uma das principais é a eletroforese bidimensional (2DE). Esta técnica foi desenvolvida há mais de 30 anos por O'Farrell (1975) e Klose (1975), sendo, desde então, aperfeiçoada. Nesta técnica as proteínas são separadas em duas etapas (dimensões): 1ª dimensão (IEF - focalização isoelétrica), nesta as proteínas são separadas de acordo com suas propriedades de carga (pI), migrando em direção ao eletrodo carregado, através de um gradiente específico de pH presente no gel, até alcançar seu pI, no qual a carga líquida da proteína é zero, sob condições desnaturantes; seguida pela 2ª dimensão (SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio), na qual a separação ocorre de acordo com sua massa molecular relativa (McGregor e Dunn, 2006; Görg *et al.*, 2004).

Um dos maiores desafios encontrados na análise por 2DE é o quão bem resolvidas estão as proteínas e quantas destas proteínas estão visíveis no gel 2DE (Aldred *et al.*, 2004). Apesar de ser amplamente usada, a técnica apresenta algumas limitações relacionadas com a solubilização de proteínas de membrana (altamente hidrofóbicas) e segregação de proteínas de pontos isoelétricos (pI) e tamanhos extremos (geralmente limitada entre 10 e 120 kDa). Porém, mesmo com essas limitações, a eletroforese bidimensional (2DE) ainda consiste de uma ferramenta capaz de analisar milhares de proteínas simultaneamente, justificando seu uso na identificação de proteomas (Görg *et al.*, 2004; Vercauteren *et al.*, 2007).

Após a revelação do gel bidimensional, uma imagem digital do perfil proteico é produzida e a análise das imagens dos diferentes perfis é executada utilizando-se software especializado, capaz de quantificar o tamanho e a intensidade dos *spots* proteicos. Os estudos proteômicos comparativos tipicamente envolvem a comparação das imagens de géis obtidos de diferentes grupos experimentais (tratado/controle; doente/sadio) para a identificação de expressão proteica diferencial (Lam *et al.*, 2006). Após análise, 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) “*in tandem*”, sendo a tecnologia MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) uma das mais utilizadas.

Em geral, a abordagem proteômica por 2DE acoplada à espectrometria de massas é utilizada com a finalidade de obter um mapa de referência e/ou o perfil de expressão proteica de um determinado organismo. O perfil de expressão proteica, por sua vez, pode ser utilizado para identificar proteínas envolvidas em determinados processos fisiológicos como: comparação da expressão proteica em resposta a estímulos externos (Guina *et al.*, 2003; Kan *et al.*, 2004); mapeamento de alvos moleculares de drogas (Singh *et al.*, 2001).

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). Apesar desse aumento contínuo no número de estudos em proteômica, as doenças cardiovasculares ainda representam um novo campo de aplicação dessa área (Agnetti *et al.*, 2007).

As alterações protéicas acarretadas pelas DCV podem ser dinamicamente analisadas por esta metodologia. Estudos apontam que a análise proteômica pode fornecer um forte apoio para o diagnóstico precoce e tratamento das doenças cardiovasculares (Pinet, 2007; Ouzounian *et al.*, 2007). Em um estudo recente, Juan e colaboradores (2012) utilizaram uma abordagem proteômica

para identificar diferenças no proteoma de tecido cardíaco de animais infartados, e demonstraram o envolvimento de proteínas relacionadas com o metabolismo energético, citoesqueleto, e proteínas antioxidantes neste processo fisiopatológico. Assim, a proteômica se mostra como um campo promissor, não só para proporcionar um maior conhecimento científico do músculo cardíaco e das doenças relacionadas ao coração, mas também para ajudar a desenvolver alvos terapêuticos adicionais para aumentar nossa capacidade de monitorar pacientes cardíacos.

A literatura acima descrita nos motivou a utilizar a análise proteômica comparativa para a investigação das proteínas envolvidas neste processo de prevenção de DCV pelo óleo de soja. O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil proteico do tecido cardíaco de animais tratados ou não com óleo de soja por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas, visando detectar proteínas com diferentes intensidades de expressão, as quais podem contribuir para desvendar mecanismos moleculares associados à aparente proteção cardiovascular oferecida pelas moléculas presentes neste óleo.

# OBJETIVOS

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Identificar proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular cardíaco (VE) de ratos tratados e não tratados com óleo de soja, por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Obter os parâmetros hemodinâmicos/ponderais dos animais experimentais (tratados e não tratados com óleo de soja);
- Padronizar condições ideais para a melhor resolução das proteínas do VE por eletroforese bidimensional (2-DE);
- Obter o perfil proteico (proteoma) do VE dos animais tratados e não tratados com óleo de soja;
- Realizar análise comparativa dos perfis proteicos do VE dos grupos experimentais;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de animais, por espectrometria de massas;
- Correlacionar às proteínas identificadas com os benefícios hemodinâmicos acarretados pelo óleo de soja.

**MATERIAIS E**

---

**MÉTODOS**

### **3 MATERIAL 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, sob registro no CEP, protocolo no 052/2013. Todos os experimentos seguiram as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

#### **3.2 Animais**

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 200-230g no início dos procedimentos experimentais. Os animais foram provenientes do Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Estes foram mantidos em gaiolas de polipropileno (cinco por caixa) com dimensões de 58x49x20 cm, com acesso à água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12h em alternância.

#### **3.3 Grupos experimentais**

Os animais foram randomizados em 2 grupos experimentais:

*Grupo Controle* (CT): os animais deste grupo receberam por via IM 0,1mL de solução de NaCl à 0,9% diariamente por um período de 15 dias (n=8).

*Grupo Tratado* (TR): os animais deste grupo receberam por via IM 0,1mL de óleo de soja diariamente por um período de 15 dias (n=8).

#### **3.4 Medidas de Parâmetros Hemodinâmicos**

Ao final do tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uretana (1.2g/kg i.p). A artéria carótida direita foi dissecada e canulada 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 inserido na carótida foi conduzido até a aorta para registros de: pressão diastólica (PAD), pressão sistólica (PAS), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC). Posteriormente, o cateter foi direcionado até o VE e então foram mensuradas as pressões: sistólica (PSVE), diastólica final (PDfVE); a primeira derivada da pressão positiva e negativa ( $dP/dt+$  VE,  $dP/dt-$  VE).

### **3.5 Sacrifício dos animais e coleta de amostras**

Após obtenção dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram sacrificados para dissecação do coração. Imediatamente após, para a remoção do sangue circulante, o coração foi lavado sequencialmente; 4x com solução de Krebs à temperatura ambiente, 4x com solução salina à 4°C e 1x em água Milli-Q à 4°C. Em seguida, os átrios e tecidos adjacentes foram removidos, e a massa restante do coração (ventrículos) foi separada em: ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD). O tecido correspondente ao VE foi pesado e alocado em criotubo, o qual foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido. Além do coração, foram dissecados, pesados e congelados o pulmão, fígado e rim. Todas estas amostras foram armazenadas à -80°C.

### **3.6 Análise comparativa do VE dos animais dos dois experimentais POR 2DE/MS-MS/MS**

A figura 3 mostra um fluxograma das etapas experimentais utilizadas para esta análise.

### 3.6.1 Obtenção do extrato proteico dos ventrículos esquerdos

Para extração das proteínas das amostras de ventrículo esquerdo, utilizou-se a metodologia descrita por Burniston (2009), com algumas modificações. Amostras do VE foram pulverizadas sob atmosfera de nitrogênio líquido em grau de porcelana. Ao pó resultante foi adicionado tampão de lise na proporção de 1:10 (p/v), o qual continha 8M de uréia, 2M de tiouréia, 40mM de Tris base, 4% (p/v) de CHAPS, 65 mM DTT (dithiothreitol) e coquetel de inibidor de proteases. A mistura obtida foi submetida à sonicação (3 ciclos de 20 segundos, 15 Hz, com intervalos também de 20 segundos), usando um sonicador ultrassônico (Qsonica XL-2000), em banho de gelo à 4°C. Para remoção do material insolúvel, o lisado celular obtido foi centrifugado à 12000 g por 30min à 4°C. Os sobrenadantes, denominados EPVE (**Extrato Proteico de Ventrículo Esquerdo**). O conteúdo proteico do EPVE foi quantificado utilizando-se o kit de dosagem de proteína 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences), conforme as indicações do fabricante. As amostras foram armazenadas à -80°C para posterior análise por Eletroforese Bidimensional (2DE - PAGE).

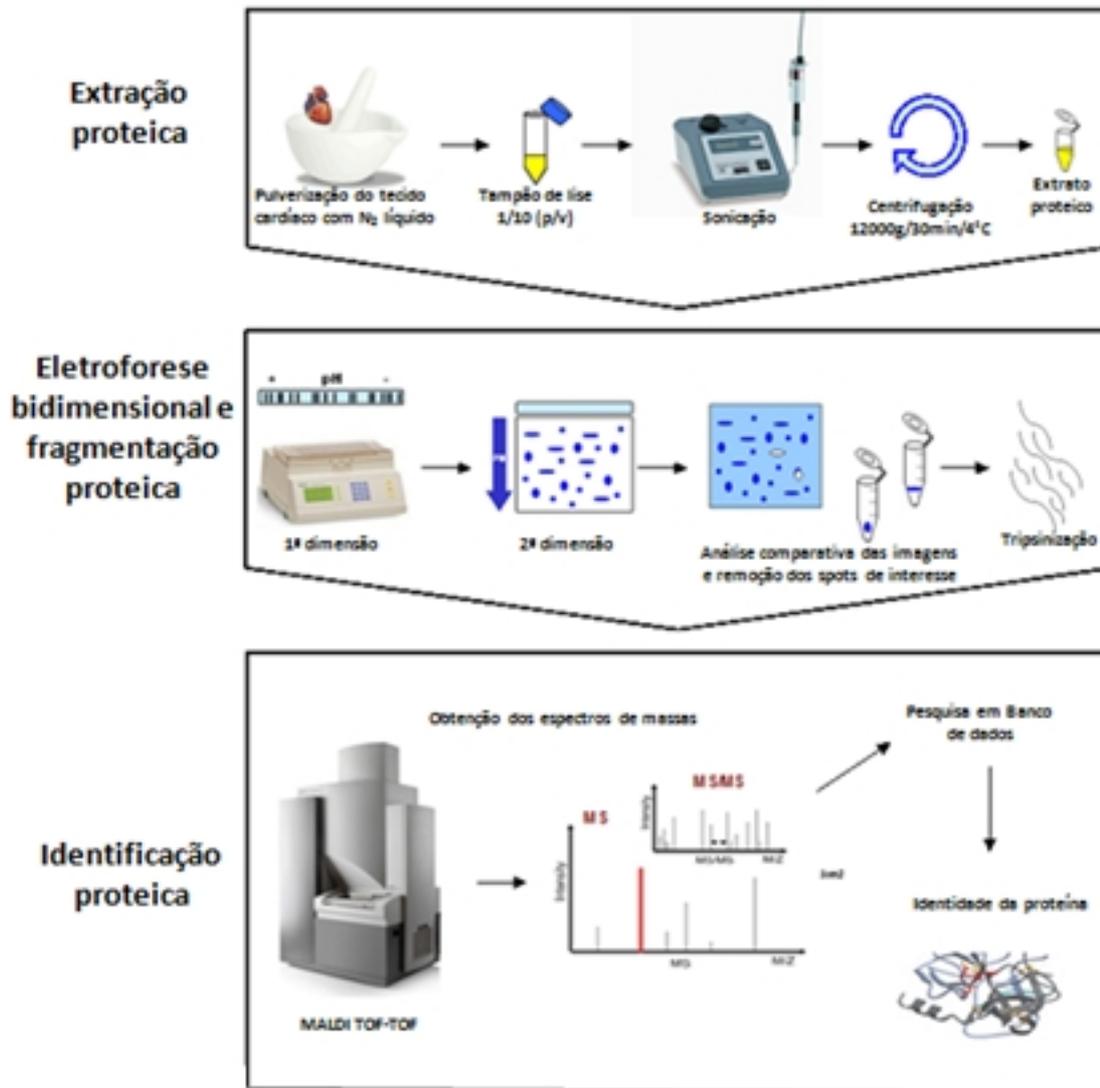


Figura 3: Fluxograma das etapas experimentais utilizadas para a análise proteômica.

### 3.6.2 Eletroforese bidimensional dos VE dos animais experimentais

OS EPVE de quatro animais de cada grupo (CT e TR) escolhidos por randomização, foram submetidos à eletroforese bidimensional utilizando as condições nas quais foi obtida maior resolução das proteínas do EPVE nos géis.

### 3.6.3 Focalização isoeétrica (1ª dimensão)

Amostras de 800µg do EPVE (obtidas conforme o item 3.6.1) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, e 60mM de DTT para um volume final de 350µL. As soluções resultantes foram transferidas para uma bandeja de reidratação, e sobre estas foram colocadas as IPG *strips* desidratadas (17cm, pH 3-10 NL\*). Para a eletrofocalização foi utilizado um sistema IEFCell (Bio-Rad). As IPG *strips* foram reidratadas por processo ativo à 20°C com corrente máxima de 50mA/gel, por 20h. 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.

### 3.6.4 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas

Após a eletrofocalização das proteínas, as *strips* foram submetidas à redução e alquilação. O processo consistiu de incubação sequenciada com: (i) tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl pH 8,8, 6M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 10mg/mL de DTT, durante 15min; e (ii) tampão de equilíbrio contendo 25mg/mL de iodoacetamida durante 15min, à temperatura ambiente.

(\*) Escolha baseada em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório.

### 3.6.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE - (2ª dimensão)

A segunda dimensão foi conduzida em géis de poliacrilamida 12,5%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), seguindo o método descrito por Laemmli (1970) em sistema Ettan DALTsix electrophoresis unit (GE *Healthcare life sciences*). As IPG strips contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para a superfície do gel, as quais foram seladas com solução de agarose 0,5% preparada no tampão (Tris/Glicina/SDS, pH 8,8) de corrida. A eletroforese foi conduzida à 40mA/gel até o termino da corrida.

Os géis foram preparados misturando-se: 116,8mL de solução Acrilamida/BisAcrilamida 37,5:1; 70mL de solução Tris-HCl, 1,5M pH 8,8; 2,8mL de SDS (10% p/v); 88,8mL de água Milli-Q; 2,8mL de PSA (10% p/v) e 280µL de temed (volumes usados para o preparo de 4 géis). A solução foi rapidamente agitada e o gel polimerizado em placas de 25,5cmx21cm.

### 3.6.6 Coloração com Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250)

Ao final da corrida o gel foi retirado da placa e submetido à coloração pelo método Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) seguindo a metodologia proposta por Neuhoff e Arold (1988), com modificações. Inicialmente o gel foi incubado três vezes (30min cada) com solução de ácido ortofosfórico 2% em etanol 30%; em seguida lavado três vezes (10min cada) com solução de ácido ortofosfórico 2%. Posteriormente, o gel foi incubado por 30min com solução de ácido ortofosfórico 2% em etanol 30% com 12% de sulfato de amônio. Em seguida, o gel foi corado durante 5 dias pela adição de Coomassie G-250, na solução acima para concentração final 0,01%. O excesso do corante foi removido do gel com água ultrapura (Milli-Q).

### 3.6.7 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 de quatro animais de cada grupo, perfazendo um total de oito 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<sub>s</sub>* é o volume do “spot” s em um gel contendo n “spots”.

### 3.6.8 Identificação das proteínas com diferença de expressão entre os grupos

As frações dos géis contendo os *spots* de interesse foram manualmente removidas do gel e processados de acordo com Vergote *et al.*, 2005. Estas foram fragmentadas e descoradas por 3 lavagens de 15 minutos com 400µL de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0, sob agitação. Após a remoção do descorante, as frações dos géis foram tratadas com 200 µL de acetonitrila, até a opacificação do gel. Em seguida este solvente foi removido da amostra por concentrador a vácuo (Concentrador Plus, Eppendorf). As frações do gel foram então reidratadas com 10µL de solução de

bicarbonato de amônio 50mM, contendo 20ng/ $\mu$ L de tripsina (Golden) e mantidas por 30 minutos em banho de gelo para incorporação da solução. Para manter as frações úmidas durante a hidrólise triptica, 20 $\mu$ L de solução de bicarbonato de amônio 50mM foram adicionados, e a mistura foi incubada por 14 horas a 37°C.

Em seguida, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e as frações do gel foram submetidas a duas lavagens sucessivas com 30 $\mu$ L de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (30 minutos cada, sob agitação). As soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido até aproximadamente 10 $\mu$ L, por concentração à vácuo.

As amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Os fragmentos da hidrólise enzimática foram eluídos da resina com 6 $\mu$ L de solução 50% de acetonitrila, contendo 0,1% de TFA.

Alíquotas de 0,3 $\mu$ L de cada solução dos fragmentos dessalinizados foram aplicadas em placa anchorship 600 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e em seguida co-cristalizada com 0,3 $\mu$ L de solução saturada da matrix (5mg/mL de CHCA em acetonitrila 70% / TFA 0,1%) à temperatura ambiente. Os espectros de massas foram obtidos em sistema MALDI-TOF/TOF – Autoflex III™, softwares FlexControl™ e FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA), operando no modo positivo/refletor. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de peptídeos Peptide Calibration Standard II (bradicinina  $m/z$  = 757,39; angiotensina II  $m/z$  = 1046,54; angiotensina I  $m/z$  = 1296,68; substância P  $m/z$  = 1347,73; bombesina  $m/z$  = 1619,82; substrato da renina  $m/z$  = 1758,93; ACTH (1-17)  $m/z$  = 2093,08; ACTH (18-39)  $m/z$  = 2465,19; e somatostatina (28)  $m/z$  = 3147,47) da Bruker Daltonics, Bilerica (EUA). Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS.

### 3.6.9 Pesquisa em banco de dados

Os espectros de massas (MS e MS/MS) obtidos de cada *spot* proteico foram combinados pelo software BioTools (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e posteriormente investigados nos bancos de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante (NCBI nr), por meio do software MASCOTR ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Os parâmetros de busca utilizados no MASCOTR foram: *Rattus* como taxonomia; peptídeos tripticos com ausência de um único fragmento; ausência de restrições no peso molecular da proteína; oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente; valores de massa monoisotópica; carga do peptídeo 1+; e tolerância de 0,6 Da na massa do MS e do MS/MS. Score global do MASCOTR correspondente a significância estatística de  $\alpha < 0,05$  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 (Thomas *et al.*, 2003) para *Rattus norvegicus*.

### 3.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise de fatores, foi realizada com auxílio do software Image Master 2D Platinun v 7.05, utilizando os oito géis como fatores. As demais análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. As comparações dos parâmetros entre os grupos foram realizadas através da análise teste *t* não pareado. Os valores de volume normalizado dos *spots* entre dois grupos foram analisados por meio de teste *t* não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 3.8 Padronização de condições ideais para Eletroforese Bidimensional do EPVE.

Anteriormente à realização da 2DE descrita acima, várias condições foram avaliadas, para melhorar a resolução das proteínas do EPVE no gel. Em todas as condições testadas, uma mesma amostra de EPVE, foi utilizada.

#### 3.8.1 Testes de precipitação das proteínas do EPVE

Precipitação com Acetona: a um tubo contendo 120µg do EPVE foram adicionados 37,7µL de PBS e 150µL de acetona. A mistura permaneceu “*over night*” em banho de gelo e foi centrifugada à 10000 g por 30min à 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em tampão de reidratação (Destreak - GE) contendo 0,2% de anfólitos (BioLyte 3-10 buffer - GE), para um volume final de 120µL.

Precipitação com TCA/Acetona: a um tubo contendo 120µg do EPVE foram adicionados 187,7µL de PBS e 40µL de uma solução de TCA (60%). A mistura permaneceu *over night* em banho de gelo e foi centrifugada à 10000 g por 30min à 4°C. Ao precipitado foi adicionado 100µL de acetona (90%) e a mistura permaneceu em banho de gelo por 15min. Após este tempo, a mistura foi novamente centrifugada à 10000 g por 30min à 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, para um volume final de 120µL.

As amostras proteicas obtidas dos processos de precipitação foram avaliadas por 2DE e comparadas com EPVE. A 2DE foi conduzida de acordo com o item 3.6. A focalização isoelétrica (1ª dimensão) foi conduzida no sistema IEFCell (Bio-Rad), em strip de 7cm, pH 3-10 NL, e a 2ª dimensão realizada em sistema Mini-PROTEAN® 2 (BioRad *life sciences*) em gel 12,5%.

### 3.8.2 Adição de DTT ao tampão da amostra

Outra condição testada foi um aumento da concentração do agente redutor DTT no tampão da amostra (DeStreak). Amostras de 100ug de EPVE foram solubilizadas em DeStreak, ou DeStreak adicionado mais 60mM de DTT para um volume final de 120µL.

A focalização isoeétrica (1ª dimensão) foi conduzida no sistema IEFCell (BioRad), usando strip de 7cm, pH 3-10 NL, e a 2ª dimensão realizada em sistema Mini-PROTEAN® 2 (BioRad *life sciences*) em gel 12,5%.

### 3.8.3 Avaliação da quantidade proteica aplicada no gel

Para avaliar a quantidade proteica na qual se obtém melhor resolução na 2DE, foram testadas 4 concentrações de EPVE: 500µg; 650µg; 800µg e 1000µg. Estas, foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, e 60mM de DTT para um volume final de 350µL. As amostras foram avaliadas por 2DE, de acordo com o item 3.6.

# RESULTADOS

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Medidas Ponderais

Os parâmetros ponderais dos grupos estudados foram avaliados no primeiro dia após o final do tratamento e estão mostrados na tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os animais dos grupos não tratado e tratado com relação: ao peso corporal (PC) dos animais; ao peso do VE (PVE); ao peso de VE dividido pelo peso corporal (PVE/PC); ao peso do pulmão úmido (PPu); e ao peso do pulmão úmido dividido pelo peso corporal (PPu/PC). Entretanto, o peso médio do VD dos animais do grupo tratado com soja foi maior do que o dos animais controle. Este aumento foi confirmado pela relação PVD/PC.

Tabela 1: Valores das medidas ponderais obtidas no primeiro dia após o final do tratamento dos grupos controle (CT) e tratado (TR).

	CT (n=6)	TR (n=6)
<b>PC (g)</b>	310,0±11,67	301±9,28
<b>PVE (mg)</b>	0,71±0,038	0,62±0,05
<b>PVE/PC (mg/g)</b>	0,0022±0,00009	0,0022±0,00015
<b>PVD (mg)</b>	0,19±0,01*	0,22±0,005*
<b>PVD/PC (mg/g)</b>	0,0006±0,00002**	0,0007±0,00002**
<b>PPu (mg)</b>	1,50±0,06	1,63±0,16
<b>PPu/PC (mg/g)</b>	0,005±0,0001	0,005±0,0005

(PC: peso corporal; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PVE/PC: peso do ventrículo esquerdo dividido pelo peso corporal; PVD: peso do ventrículo direito; PVD/PC: peso do ventrículo direito dividido pelo peso corporal; PPu: peso do pulmão úmido; PPu/PC: peso do pulmão úmido dividido pelo peso corporal. (\*)Diferente para  $p < 0,05$ .

### 4.2 Medidas Hemodinâmicas

Para avaliação da função ventricular esquerda, os parâmetros hemodinâmicos foram obtidos por meio de registro pressórico por cateterismo arterial "in vivo", e são mostrados na tabela 2. Como pode ser observado não foram encontradas diferenças significativas na frequência cardíaca, pressão arterial

sistólica, pressão arterial diastólica, pressão sistólica de ventrículo esquerdo entre os grupos. Entretanto os animais do TR apresentaram um menor valor da PDfVE (29,2%) quando comparados ao controle.

Tabela 2: Parâmetros hemodinâmicos obtidos no primeiro dia após o final do tratamento com óleo de soja.

	CT (n=8)	TR (n=8)
<b>FC (bpm)</b>	373,82±18,23	342,20±14,72
<b>PAS (mmHg)</b>	114,86±4,62	102,57±4,88
<b>PAD (mmHg)</b>	81,60±5,86	73,75±5,44
<b>PSVE (mmHg)</b>	128,43±6,59	118,82±5,07
<b>PDfVE (mmHg)</b>	6,08±0,41**	4,31±0,26**
<b>dP/dt+ (mmHg/s)</b>	6656,30±691,59	6065,97±433,83
<b>dP/dt- (mmHg/s)</b>	-8061,32±397,59	-6993,63±413,83

FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PSVE pressão sistólica de ventrículo esquerdo; PDfVE: pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; dP/dt + e -: derivadas de pressão sobre a derivada de tempo máximas positiva e negativa. (\*)Diferente para  $p < 0,05$ .

#### 4.3 Avaliação da Padronização da Eletroforese Bidimensional

As figuras 4, 5 e 6 mostram os resultados dos testes realizados para definir condições experimentais para melhor resolução das proteínas do EPVE na 2DE.

A figura 4 mostra os perfis proteicos 2DE das amostras EPVE e EPVE submetidas à precipitação com acetona e acetona/TCA. Como pode ser observado, os géis das amostras obtidas por precipitação apresentam um número menor de *spots* proteicos que a amostra bruta, demonstrando que estes processos acarretam perda de proteínas e prejuízo na obtenção do proteoma das amostras.

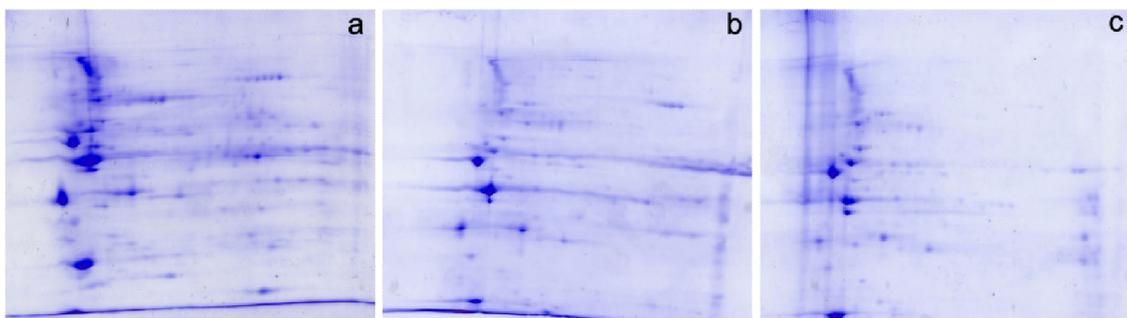


Figura 4: Perfis proteicos 2DE: (a) EPVE (b) Proteínas de EPVE após precipitação com acetona. (c) Proteínas de EPVE após precipitação com acetona/TCA. Amostras foram focalizadas em “IPG strip” pH 3-10 e SDS-PAGE 12,5% foi usada para a segunda dimensão. Os géis foram corados com Coomassie G-250.

A figura 5 mostra os perfis proteicos (2DE) obtidos de EPVE solubilizadas em Destreak (tampão de reidratação) e Destreak adicionado de 60mM de DTT. Pode-se observar que a adição de maior quantidade de DTT melhora a resolução da 2D-SDS- PAGE, principalmente na região básica.

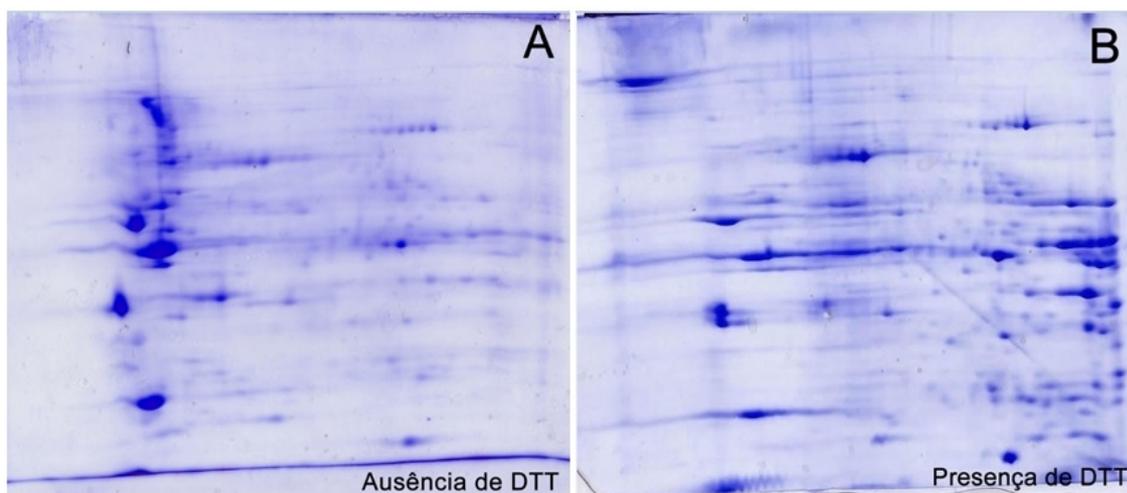


Figura 5: Perfis proteicos 2DE obtidos com processo de adição de DTT ao tampão da amostra. Extrato proteico solúvel de VE foi separado por IEF em “IPG strip” pH 3-10. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12,5%. Os géis foram corados com Coomassie G-250. (a) tampão da amostra em concentração normal de DTT. (b) adição de DTT ao tampão da amostra.

A figura 6 mostra o perfil proteico quando diferentes quantidades proteicas de EPVE (500-650-800-1000 $\mu$ g) foram submetidas à 2DE. A utilização de 800 $\mu$ g foi a mais adequada pois obteve-se spots altamente resolvidos. Quantidades menores de amostras foram insuficientes para a análise das proteínas do ventrículo esquerdo. O uso de 1000  $\mu$ g acarreta perda de resolução das proteínas.

Considerando essas análises preliminares para o desenvolvimento deste trabalho, foram acrescentados no tampão de reidratação 60mM de DTT, e foram utilizadas amostras de EPVE contendo 800 $\mu$ g.

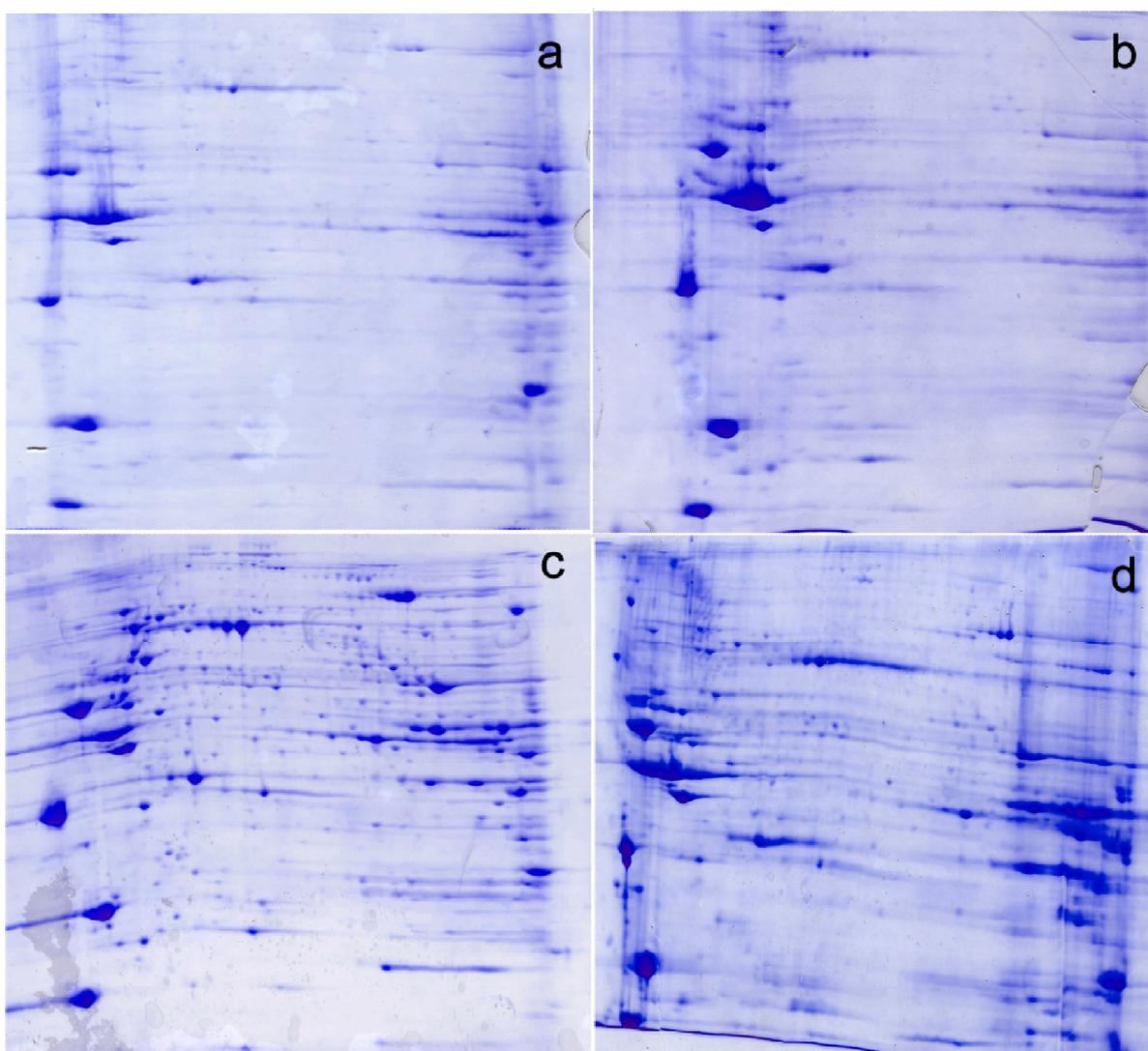


Figura 6: Perfis proteicos 2DE de EPVE: (a) 500  $\mu$ g (b)650 $\mu$ g, (c) 800  $\mu$ g e (d)1000 $\mu$ g de proteínas obtidos com diferentes quantidades de proteínas aplicadas à strip. Extrato proteico solúvel de VE separado por IEF em "IPG

strip” pH 3-10. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12,5%. Os géis foram corados com Coomassie G-250.

#### 4.4 Análise comparativa do proteoma do ventrículo esquerdo de ratos controle e tratado com óleo de soja.

Foram obtidos 8 géis bidimensionais (quatro géis por grupo) para a análise proteômica comparativa do VE de ratos não tratados e tratados com óleo de soja (Figura 7), correspondendo a 4 replicatas biológicas dos animais controle e dos tratados. A tabela 3 mostra o número de spots observados por gel após a edição dos mesmos pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05.

Tabela 3: Número de spots observados no 2DE/SDS-PAGE para cada replicata biológica.

Grupo	Amostras de VE dos animais.	Número de spots no gel	Média do número de spots
Controle	CT 7	465	401
	CT 2	422	
	CT 5	401	
	CT 6	319	
Tratado	TR 8	416	367
	TR 6	347	
	TR 3	401	
	TR 1	304	

O gel que apresentava o maior número de spots de cada grupo foi escolhido como o gel de referência do grupo (CT7 e TR8). O coeficiente de correlação entre o gel referência com os demais de cada grupo, próximo de 1 (0,8008-0,9458), e a equação da regressão linear que correlaciona a % de volume dos “spots” estão mostrados na Tabela 4.

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.

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

Tabela 4: Análise de reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos. As imagens foram relacionadas com a imagem do gel de referência de cada grupo.

<b>Relação entre os géis</b>	<b>Equação</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<b>CT7xCT2</b>	$y = 0,747x + 0,0555$	0,8008
<b>CT7xCT5</b>	$y = 0,997x + 0,018$	0,8191
<b>CT7xCT6</b>	$y = 0,744x + 0,0582$	0,8736
<b>TR8xTR1</b>	$y = 0,916x + 0,0055$	0,8631
<b>TR8xTR3</b>	$y = 0,984x + 0,000929$	0,9064
<b>TR8xTR6</b>	$y = 0,885x + 0,00915$	0,9458

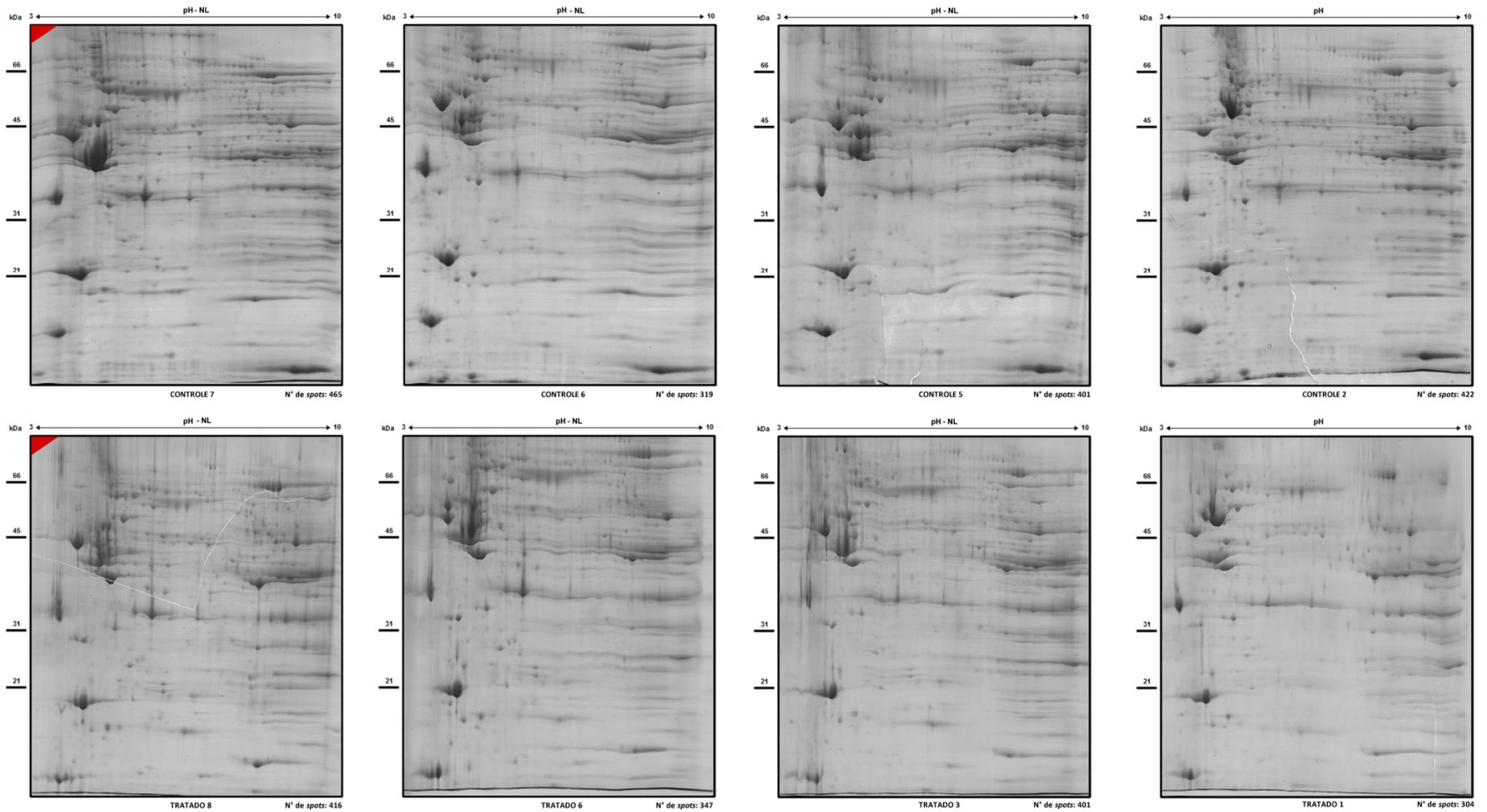


Figura 7: Perfil proteico dos VE dos animais dos grupos controle e tratado. Aliquotas de 800µg de proteínas solúveis foram focalizadas em "IPG strip" pH 3-10 NL de 17 cm. As proteínas eletrofocalizadas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12,5%. O triângulo vermelho identifica a imagem selecionada como referência.

A figura 8 mostra o resultados da análise de fatores dos 8 géis obtidos. Nesta análise os géis são representados pelos vetores em azul e os “matches” são representados pelas cruces vermelhas. Pode-se observar que os géis do VE dos animais controle e tratados se encontram em quadrantes diferentes, o que demonstra que CT e o TR são grupos distintos com relação ao proteoma do VE.

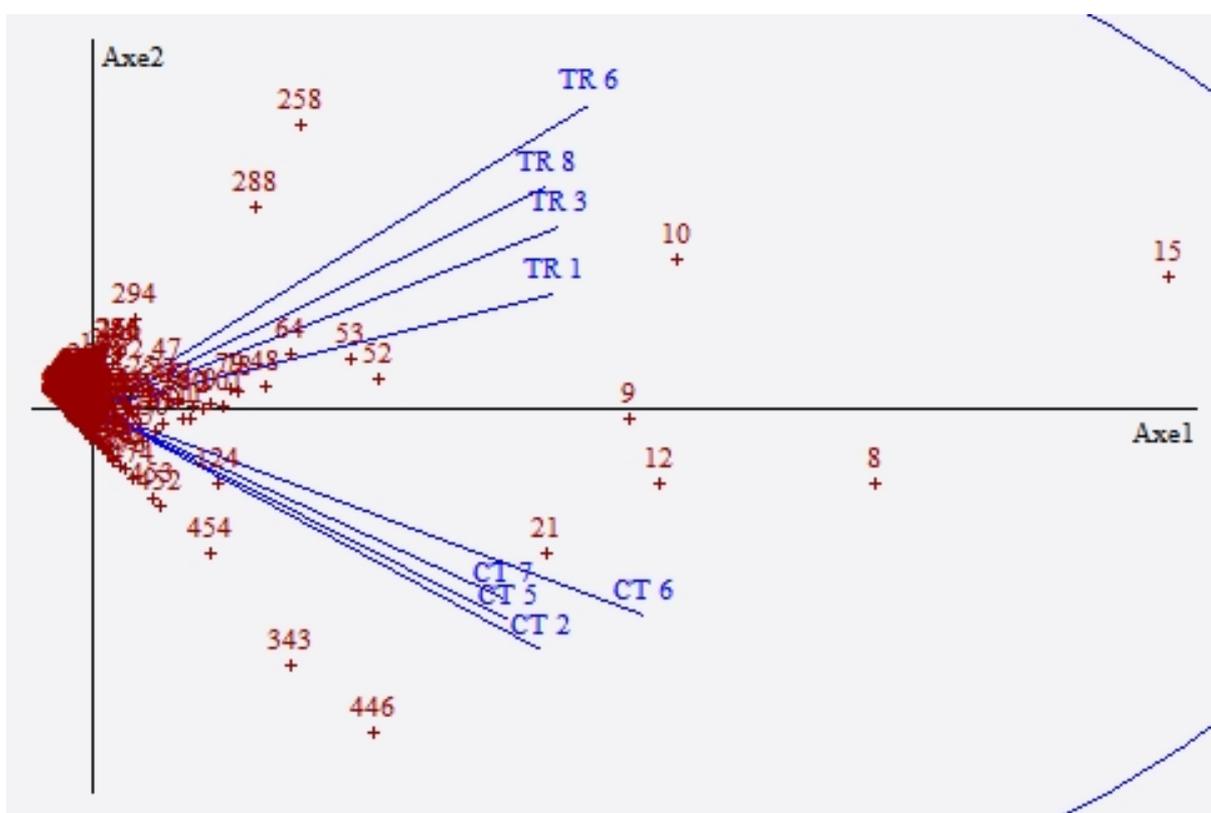


Figura 8: Análise de fatores. Gráfico de projeção dos géis analisados para delimitação dos grupos experimentais.

Após a análise pelo software, autenticação por inspeção visual e normalização dos volumes dos spots, foi realizada a análise quantitativa comparativa, para que fossem identificados os spots com diferentes intensidades. Esta análise revelou um total de 60 “spots” diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais (Figura 9). Dentre estes *spots* proteicos, 22 apresentavam maior intensidade e 38 menor intensidade no grupo tratado, quando comparados aos *spots* do grupo controle.

#### 4.5 Identificação dos spots proteicos com diferentes intensidades.

Dos 60 *spots* proteicos diferencialmente expressos, 39 foram removidos dos géis e preparados para a identificação proteica. Os demais spots não foram retirados por se localizarem em áreas de difícil identificação no gel. Estes spots foram processados para a análise por espectrometria de massas em sistema 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<sup>1</sup> pelo software MASCOT<sup>®</sup>. Dentre os 39 *spots* proteicos, 14 foram identificados.

Foram identificadas 12 proteínas não redundantes, uma vez que duas proteínas (miosina de cadeia leve-3; creatina kinase tipo-M) estavam presentes em dois spots. A tabela 5 mostra a identidade dos 14 spots proteicos identificados.

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](http://www.uniprot.com)). As proteínas identificadas pertencem a várias classes funcionais, incluindo metabolismo (carboidratos, lipídeos e fosforilação oxidativa), resposta ao estresse oxidativo, contração muscular e estruturais. A tabela 6 mostra os dados da análise estatística e a alteração do volume normalizado dos *spots* proteicos identificados, além da localização celular, função molecular e os processos biológicos relacionados às proteínas identificadas.

Tabela 5: Identidade dos “spots” proteicos diferentemente expressos entre os grupos CT e TR, identificados por MS e MS/MS. Homologia com a taxonomia *Rattus norvegicus*.

Spot ID <sup>#</sup>	Nome da proteína	Número de acesso <sup>b</sup>	Sequências de peptídeos identificadas	ppm	Mascot – score proteico <sup>d</sup>	pl (teórico) <sup>a</sup>	MM kDa (teórico)
1	myosin light chain 3 <sup>d</sup>	gi 6981240	ITYGQCGDVL	15.5	96	5,03	22,2
			GYTLPPHCSR	30.6	65		
			DLFDPIIQDR	25.0	91		
			LGSSEVEQVQLVVDGVK	28.4	143		
2	Creatine kinase tipo-M	gi 6671762	TGTAEMSSILEER	31.2	62	6,58	43,2
			FEEILTR	10.9	51		
			GGDDLDPNYVLSSR	18.5	85		
			SFLVWVNEEDHLR	16.4	126		
3	Tu translation elongation factor, mitochondrial (predicted), isoform	gi 149067905	RGTGGVDTAAVGAVFDISNADR	15.0	117	7,23	44,0
			AEAGDNLGALVR	10.6	82		
			YEEIDNAPEER	8.86	84		
			ADAVQDSEMVELVELEIR	19.1	133		
			KYEEIDNAPEER	13.4	104		
			LLDAVDTYIPVPT	15.8	113		
			GITINAAHVEYSTAAR	15.7	137		
			GEETPVIVGSALCALEQR	16.1	176		
			DLEKPFLLPVESVYSIPGR	16.0	191		
			HVLATLGER	4.22	72		
4	myosin light chain 3 <sup>d</sup>	gi 6981240	NKDTGTYEDFVEGLR	14.8	124	5,03	22,2
			AAPAPAAAPAAPEPERPK	18.4	130		
			HVLATLGER	4.22	72		
			NKDTGTYEDFVEGLR	14.8	124		
			AAPAPAAAPAAPEPERPK	18.4	130		
6	thioredoxin-dependent peroxide reductase	gi 6680690	SVEETLR	3.56	47	7,15	28,3
8	Creatine kinase tipo-M	gi 6671762	GTGGVDTAAVGAVFDISNADR	22.6	231	6,58	43,2

21	preprohaptoglobina	gi 204657	GSFPWQAK	-7.18	43	6,10*	30,4
			MGYVSGWGR	-8.50	52		
			YVMLPVADQEK	-10.25	48		
			SCAVAEYGVYVR	4.51	64		
			GYGFGLIK	-3.38	72		
26	Vdac 1 protein	gi 74204235	LETAVNLAWTAGNSNTR	12.4	98	8,55	30,8
			KLETAVNLAWTAGNSNTR	15.8	167		
			VNSSLIGLGYTQTLKPGIK	16.5	143		
			EHINLGCDVDFDIAGPSIR	21.0	207		
			WNTDNTLGTEITVEDQLAR	20.0	189		
			TDEFQLHTNVNDGTEFGGSIYQK	32.0	217		
31	Desmina	gi 11968118	LQEEIQLR	16.6	65	5,21	53,4
			RIESLNEEIAFLK	17.1	66		
37	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4	gi 68341995	HGWSYDVEGR	5.22	90	10,14	19,7
			SYGANFSWNKR	1.03	33		
			LDVTPLTGVPEEHIK	-5.17	82		
44	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5-like	gi 327277452	VLKPTIFPVVPR	-24.75	56	5,67	76,3
45	glycogen phosphorylase, muscle form	gi 158138498	DYYFALAHTVR	13.6	98	6,91	97,7
46	chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial	gi 61557218	EAGLSGQATSPLGR	2.49	109	6,10	72,7
			EGPAPAYVSSGPFR	1.95	130		
53	ES1 protein homolog, mitochondrial precursor	gi 51948422	ITNLAQLSAANHDAAIFFGGFGAAK	14.9	98	9,11	28,4

d Homologia com a taxonomia *Mus musculus*. #Número identificador atribuído ao "spot" proteico. bCódigo identificador obtido no NCBI GenInfo. <sup>a</sup>Valor obtido segundo Uniprot.

\*pl referente ao peptídeo em casos nos quais não foi encontrado o pl do prepetídeo.

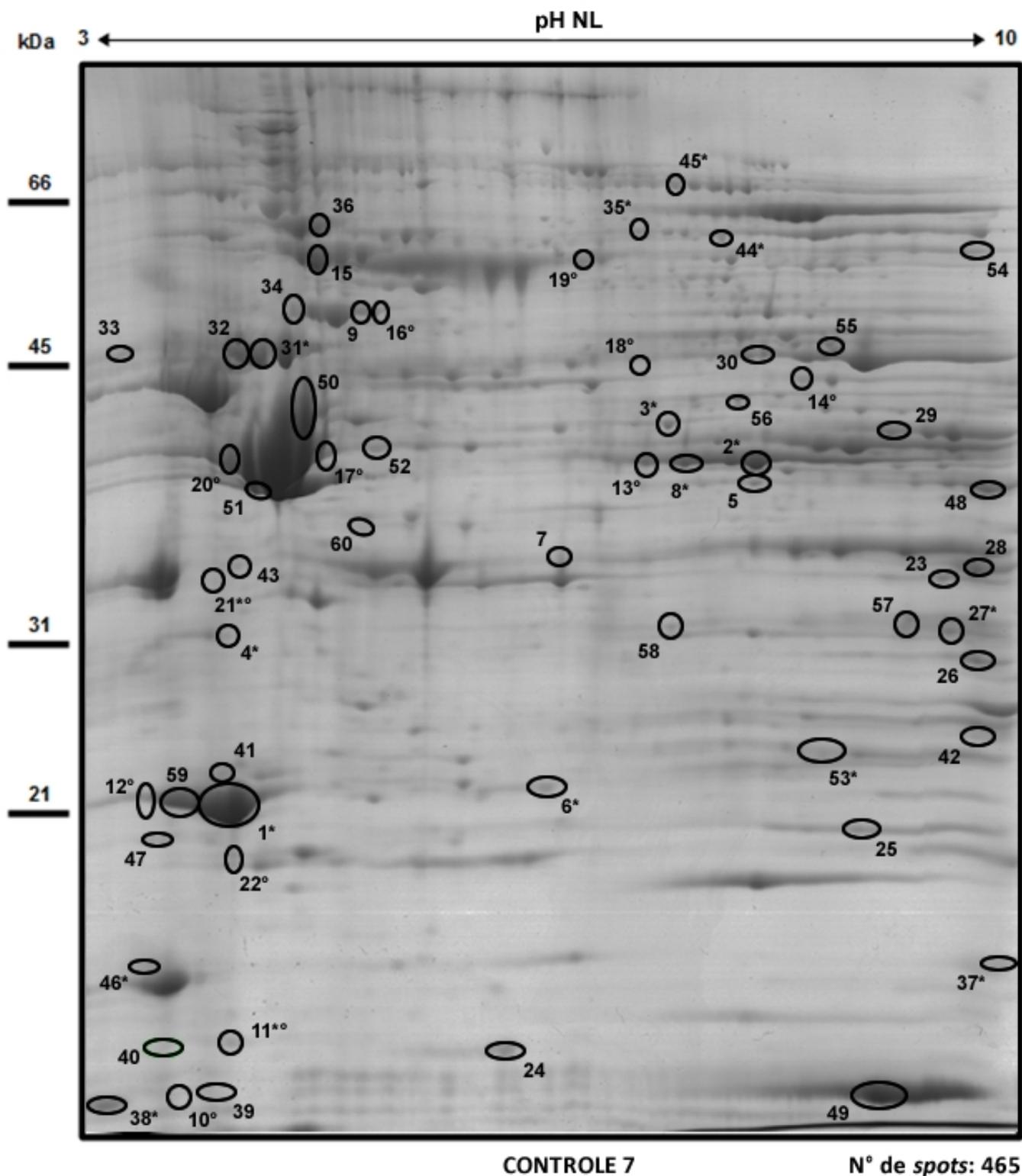


Figura 9: Comparação do perfil proteico dos géis bidimensionais de referência do grupo CT. Os "spots" numerados e circundados são os que apresentam diferença de expressão entre os grupos. ° spots somente visualizados nos géis do grupo TR. \* spots identificados por MALDI TOF-TOF.

Tabela 6: Dados das proteínas diferentemente expressas entre os grupos controle (CT) e tratado (TR) com óleo de soja.

Match ID	Nome proteína (ID da proteína)	CT <sup>a</sup>	TR <sup>a</sup>	Alteração do volume do spot <sup>b</sup>	Valor de "p"	Processo Biológico <sup>c</sup>	Função Molecular <sup>c</sup>	Localização celular <sup>c</sup>
1	Miosina de cadeia leve-3 (P09542)	5,36±0,535	7,18±0,425	-1.33	0,037	Contração muscular cardíaca	Motora	Complexo da Miosina
2	Creatina kinase tipo M (P00564)	1,331±0,099	1,950±0,223	-1.40	0,0442	Processo de biossíntese fosfocreatina	Kinase Transferase	Citoplasma
3	Tu translation elongation factor, mitochondrial (predicted), isoform (P49411)	0,083±0,004	0,136±0,016	-1.63	0,0185	Biossíntese de proteínas	Fator de alongamento	Mitocondrial
4	Miosina de cadeia leve-3 (P09542)	0,119±0,012	0,386±0,074	-3,24	0,0040	Contração muscular cardíaca	Motora	Complexo da Miosina
6	thioredoxin-dependent peroxide reductase (Q9Z0V6)	0,070±0,010	0,118±0,015	+1,68	0,0087	Antioxidante	Oxidoreductase Peroxidase	Mitocôndria
8	Creatina kinase tipo M (P00564)	0,281±0,068	0,106±0,013	+2,65	0,0449	Biossíntese de fosfocreatina	Kinase Transferase	Citoplasma
21	Preprohaptoglobin (P06866) <sup>d</sup>	-*	0,0392±0,005	-	-	Fase aguda da Imunidade	Antioxidante	
26	Vdac 1 protein, partial (Q9Z2L0)	0,181±0,021	-*	-	-	Apoptose/ transporte de íons	Porina	Membrana Celular
31	Desmina (P48675)	0,501±0,089	-*	-	-	Proteína estrutural	Proteína muscular	Citoplasma

37	NADH desidrogenase [ubiquinone] (Q91VD9)	0,080±0,018	-*	-	-	Cadeia respiratória	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Membrana mitocondrial interna
44	long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 (P18163)	0,039±0,006	-*	-	-	Metabolismo de lipídeos	Aciltransferase / Transferase	Membrana mitocondrial interna
45	glycogen phosphorylase, muscle form (P09812)	0,044±0,011	-*	-	-	Metabolismo de carboidrato Metabolismo de glicogênio	Glicosiltransferase / Transferase	Reticulo Sarcoplasmático
46	chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial (Q5BJQ0)	0,129±0,047	-*	-	-	Biossíntese da ubiquinona	Chaperona / Kinase	Mitocôndria
53	ES1 protein homolog, mitochondrial precursor (P56571)	0,240±0,039	-*	-	-	-	-	Mitocôndria

a Média ± erro padrão da média do volume normalizado de cada "spot" nos géis obtidos. b Razão entre a média do volume normalizado dos "spots" com expressão proteica aumentada pela média do volume normalizado dos "spots" com expressão proteica reduzida. (+) indica *upregulation*, enquanto (-) indica *down regulation* dos "spots" do grupo controle em relação ao tratado. c Foram utilizadas as anotações dos bancos de dados do Uniprot e PANTHER para a definição dos processos biológicos, das funções moleculares e das localizações celulares. d dados referentes ao peptídeo em casos nos quais não foi encontrado os dados referentes ao prepropeptídeo.\*não foi possível, por limitação da técnica, a visualização deste spot no gel.

**DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado que o consumo de óleos vegetais, ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), exerce efeitos benéficos à saúde, por acarretar: diminuição dos níveis de triglicerídeos sanguíneos (Phillipson *et al.*, 1985); redução da agregação plaquetária e prevenção na formação de trombos e de aterosclerose (Dyerberg *et al.*, 1978), e também aumento da produção de prostaciclina (Guivernau *et al.*, 1994), que podem prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Baseados nestes estudos, e motivados pela busca de uma vida longa e saudável, o consumo de óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados pela população tem aumentado. A sociedade brasileira de cardiologia (SBC) ressalta que, uma suplementação com ômega-3 (~1 g/dia) é recomendada para diminuir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos que apresentam baixo a moderado risco, e indica a suplementação de 2-4 g/dia de ômega-3 para indivíduos com hipertrigliceridemia grave (índices maiores que 500 mg/dL), com risco de pancreatite, refratários a medidas não farmacológicas e tratamento medicamentoso (SBC, 2013).

Embora a demonstração dos efeitos benéficos do consumo de ácidos graxos sobre o sistema cardiovascular tem sido comprovada fisiologicamente em nível macroscópico, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo efeito cardioprotetor dos ácidos graxos insaturados. Numa tentativa inicial de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na proteção oferecida pelos óleos vegetais às doenças cardiovasculares, nós analisamos, por eletroforese bidimensional (2DE) comparativa acoplada à espectrometria de massas, o proteoma do VE de animais não tratados e tratados com 0,1mL de óleo de soja via IM por 15 dias. Como já descrito na introdução, trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa de eletromecânica cardíaca e reatividade vascular da UFES, liderado pelos pesquisadores Dr. Dalton Vassalo e Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon, têm demonstrado que o tratamento de ratos com óleo de soja acarreta uma melhoria da função ventricular esquerda, tanto em ratos saudáveis como em ratos infartados.

Previamente à nossa análise proteômica, alguns parâmetros ponderais (PVE; PVE/PC; PVD; PVD/PC; PPU; PPU/PC) e medidas hemodinâmicas (FC; PAS; PAD; PSVE; PDfVE; dP/dt+; dP/dt-) foram avaliados nos animais em estudo. Dentre os parâmetros ponderais avaliados, foi observado que o peso médio do ventrículo direito (PVD) dos animais do grupo tratado com óleo de soja foi 15% superior ao do grupo não tratado. Este dado está em desacordo com o encontrado por Ribeiro Jr e colaboradores, que não observaram nenhuma alteração nos parâmetros ponderais nos animais tratados com óleo de soja (Ribeiro et al., 2010).

Lisboa Jr. num estudo realizado não observou alteração quando comparou os parâmetros ponderais de ratos infartados tratados e não tratados com óleo de soja (Lisbôa, 2012). Considerando esta incoerência entre nossos dados e a literatura, faz-se necessário a confirmação da alteração do PVD, o que poderia ser feito por análise pato-histológica do ventrículo direito.

No que concerne às medidas pressóricas “*in vivo*” em nosso trabalho não foram observadas alterações nos parâmetros (PAS; PAD; PSVE; dP/dt+; dP/dt-), resultado que corrobora com o encontrado por Ribeiro Jr. e colaboradores (Ribeiro et al, 2010). Somente a PDfVE mostrou-se menor no grupo tratado quando comparada ao grupo controle. Similar aos nossos dados, Lisbôa Jr observou que animais infartados tratados com óleo de soja (via IM por 15 dias) apresentavam um valor menor na PDfVE (Lisbôa, 2012).

O ventrículo esquerdo é responsável pelo bombeamento de sangue através do corpo pela artéria aorta, vaso de grosso calibre e elástico, que oferece maior resistência ao fluxo de sangue que as artérias de calibre usual. Esta câmara deve, então, desenvolver maior força e suportar maiores pressões que o ventrículo direito para bombear o sangue eficientemente através do corpo. Entretanto, um aumento da frequência respiratória e cardíaca pode causar danos às paredes internas da cavidade ventricular esquerda pela exposição direta ao fluxo aumentado de sangue e ao aumento da pressão sanguínea, os quais podem acelerar os danos celulares, p. ex. hipertrofia, e substituição tecidual (fibrose) enrijecendo o coração.

Diversos estudos têm demonstrado um aumento da PDfVE em situações fisiopatológicas, como no infarto agudo do miocárdio (IAM) e na insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Pfeffer e colaboradores (1979), Saraiva e colaboradores (2007) e Santos e colaboradores (2009) demonstraram que incrementos na PDfVE estão diretamente associados a variações na extensão do infarto, sendo que o aumento na PDfVE é bastante expressivo em infartos extensos, o que causa um prejuízo no desempenho da maquinaria cardíaca. Animais com um quadro de ICC também apresentam aumento significativo na PDfVE, podendo chegar a 18mmHg (Stefanon *et al.*, 2013). Assim, a manutenção da baixa pressão no interior da câmara cardíaca pode proteger o coração dos danos já citados. Podemos sugerir que os menores valores da PDfVE encontrados nos ratos tratados com óleo de soja, no nosso estudo, podem proteger o ventrículo esquerdo de possíveis danos.

Após a confirmação da melhoria da função ventricular esquerda dos animais submetidos ao tratamento com óleo de soja, o perfil proteico do VE destes animais foi comparado por eletroforese bidimensional ao de animais que não receberam o tratamento. Para esta análise, foram obtidos oito géis do VE (perfis proteicos) de quatro animais tratados e quatro não tratados. A análise da imagem dos géis, pelo Image Master 2D Platinun v 7.05 (GE Healthcare Life Sciences), revelou uma média de 401 spots para o grupo não tratado; e 367 spots para o grupo tratado. O coeficiente de correlação de 0,80-0,94 demonstrou alta reprodutibilidade entre os géis obtidos.

Quando as imagens obtidas dos géis foram analisados pela ferramenta estatística “análise de fatores” (figura 8), os vetores representativos das replicatas biológicas dos grupos encontravam-se próximos e dentro do mesmo quadrante, enquanto o conjunto de vetores representativos dos géis de cada grupo eram encontrados em quadrantes diferentes. Esta análise demonstra que os proteomas dos grupos analisados (tratado e não tratado) são distintos, e que o tratamento com óleo de soja induz uma alteração significativa no proteoma do VE, o que pode sugerir que o óleo de soja induz alterações na expressão de proteínas que acarretam melhoria na função cardiovascular.

As diferenças encontradas no proteoma do VE estão de acordo com dados da literatura, que demonstram que ácidos graxos insaturados são potentes ativadores de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs). Estes receptores controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose, lipídio, e adipogênese (Sirtori e Galli, 2002; Lomardo e Chicco, 2006), e conseqüentemente a expressão proteica.

Como já descrito nos resultados, dentre os *spots* detectados na análise das imagens dos géis bidimensionais, 60 apresentaram intensidade diferenciada entre os grupos experimentais (não tratado e tratado). Dentre estes *spots* proteicos, 22 apresentavam maior intensidade e 38 menor intensidade no grupo tratado, quando comparados aos *spots* do grupo controle.

Infelizmente, devido a problemas técnicos, somente 14 (23,3%) dos 60 spots proteicos com diferença de intensidade foram identificados com sucesso por espectrometria de massas (MS e MS/MS). As proteínas identificadas foram categorizadas como: (i) proteínas de contração muscular cardíaca: cadeia leve-3 (MCL-3); creatina quinase do tipo M (CKMM); (ii) do metabolismo energético: NADH desidrogenase, fosforilase do glicogênio, acil-CoA sintetase de ácidos graxos de cadeia longa; (iii) estruturais: desmina.; (iv) de estresse: chaperona bc1, tioredoxina, preprohaptoglobina; (v) proteína de membrana: vdac 1; (vi) de biossíntese proteica: fator de alongamento Tu.

As 14 proteínas identificadas consistiam do produto de 12 genes. O produto de dois genes foi identificado em dois *spot*: o da miosina de cadeia leve-3 e o da creatina quinase. A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene pode ser devida principalmente aos *splicing* alternativos dos transcritos, às modificações co- e pós-traducionais das proteínas, e também migração diferenciada de cadeias e/ou subunidades proteicas.

Dentre as proteínas envolvidas na contração muscular, os dois spots identificados como MCL-3 apresentaram maior intensidade nos géis do VE dos animais tratados, o que pode sugerir aumento de sua expressão nestes

animais. A miosina é uma das principais proteínas envolvidas na contração muscular, processo resultante de sua interação com a actina. As quais estão arranjadas em forma de filamentos que sofrem interações transientes cíclicas, deslizando uns sobre os outros, produzindo contração muscular. A miosina é constituída por duas cadeias pesadas (220 kDa), a extremidade carboxi-terminal destas cadeias apresentam um formato alongado, enquanto a região amino-terminal se apresenta como um domínio globular. À cada uma das regiões globulares estão associadas duas cadeias leves (20 kDa). As cadeias leves da miosina são componentes essenciais na geração da força contrátil juntamente com a actina, e alterações, como aumento/diminuição da expressão destas proteínas têm sido postuladas por afetar a contratilidade miocárdica (Seguchi *et al.*, 2007; Morano *et al.*, 1998).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a diminuição na expressão da miosina está associada à disfunção contrátil encontrada na cardiomiopatia dilatada (Corbett *et al.*, 1998), e à insuficiência cardíaca (Van der Velden *et al.*, 2003). Em estudo de White e colaboradores, alterações no grau de fosforilação desta proteína foram ainda associadas à lesão de isquemia/reperfusão (White *et al.*, 2005). O aumento da expressão da miosina também foi observado no VE de ratas treinadas por corrida por Diffie (2004), o que está de acordo com o aumento da intensidade "over expressão" da miosina de cadeia leve ( $\cong$  20 kDa) encontrada no nosso estudo. Podemos sugerir que o aumento da expressão da MCL-3 encontrada no grupo de animais tratado com óleo de soja pode contribuir para a maior força de contração, o que culmina na melhora da função ventricular esquerda observada nestes animais.

Outra alteração de "expressão proteica" encontrada neste trabalho, que podemos associar com a melhora na função ventricular esquerda dos ratos tratados com óleo de soja, é a diminuição na intensidade de "expressão" da desmina.

A desmina é uma proteína de filamento intermediário, de massa molecular de aproximadamente 54 kDa, e constituída por três grandes domínios: uma haste conservada em alfa-hélice; uma cabeça globular variável não em alfa-hélice; e

uma cauda carboxi-terminal. A alfa-hélice é constituída por 308 resíduos de aminoácidos, e esta conectada à cabeça, formada por 84 aminoácidos. Esta parte é importante na montagem do filamento e nas interações entre os dímeros. O domínio cauda é responsável pela integração dos filamentos e da própria proteína, às demais proteínas e organelas.

Esta proteína possui como funções: a ligação do aparelho contrátil com as mitocôndrias, núcleo e sítios de ligação célula-célula (por exemplo, desmossomas); a transmissão de informações para regulação do metabolismo celular energético e da contração; além de apresentar um papel essencial na manutenção da arquitetura do músculo por formar um arcabouço ao redor do disco Z; e por conectar o aparato contrátil sarcomérico ao citoesqueleto sarcolemal, ao núcleo e à mitocôndria (Pawlak *et al.*, 2009). Juntamente com a tubulina e a actina, a desmina pertence ao grupo de proteínas citoesqueléticas e é a principal proteína músculo-específica do filamento intermediário tipo III.

A diferença de intensidade da desmina entre nossos grupos experimentais, diminuição no grupo tratado, está de acordo com os dados da literatura. Inúmeros estudos têm demonstrado que na hipertrofia e na insuficiência cardíaca há acúmulo de microtúbulos, o que impede o movimento do sarcômero e contribui para a redução da complacência ventricular. Faber e colaboradores, ao realizarem uma análise proteômica do VD de ratos com hipertrofia patológica, observaram o aumento da expressão da desmina neste quadro (Faber, *et al.*, 2005). Um outro estudo com corações de humanos portadores de insuficiência cardíaca congestiva, identificou, por western blott, o aumento da expressão de desmina (Heling, *et al.*, 2000).

Corroborando com estes achados, Pawlak e colaboradores (2009) relataram que um acúmulo anormal de desmina pode perturbar a função das miofibrilas, levando à tensão incomum do sarcolema, como descrito acima e a uma distribuição atípica das organelas celulares. Considerando as informações descritas acima, podemos sugerir que, tanto o aumento na intensidade da miosina de cadeia leve-3, quanto a diminuição da desmina no grupo tratado, podem ser associados com a melhora da função cardíaca.

Como já descrito, a creatina quinase tipo M (CK-M) foi identificada em dois spots proteicos, com migração distinta na primeira dimensão e similar na segunda. A creatina quinase (CK) compreende uma família de isoenzimas de  $\cong$  43 kDa de massa molecular, e tem papel central na transdução de energia em tecidos com demandas energéticas elevadas, como músculo esquelético, cérebro e coração. A maior parte da creatina quinase se encontra na forma dimérica, composta por duas subunidades, M (músculo), B (cérebro), resultando em 3 isoenzimas. A creatina quinase citosólica existe sob a forma homodimérica (CKMM; CKBB)/heterodimérica (CKMB). Três formas citoplasmáticas (CKMM; CKBB e CKMB) e uma isoforma mitocondrial (CKmi) são encontradas nas células cardíacas, entretanto a forma predominante no miocárdio é o heterodímero (CKMB) (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Lopes *et al.*, 2005). 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).

A CK-M é uma transferase responsável por catalisar a transferência reversível de uma unidade de fosforila entre a creatina e o ATP, da mitocôndria para as miofibrilas. Spindler e colaboradores (2004) demonstram que, animais deficientes na produção de creatina quinase tipo M e mitocondrial apresentam maior susceptibilidade a sofrer danos cardíacos e distúrbios na homeostase de cálcio, após isquemia e reperfusão (Spindler *et al.*, 2004).

O spot mais básico apresentava-se mais intenso no grupo tratado (1,4 vezes), enquanto o mais ácido apresentava-se menos intenso. Pode-se sugerir que a forma mais ácida encontra-se fosforilada, sendo portanto uma modificação pós traducional da forma básica (PTM). Em estudo recente, foi identificado, por espectrometria de massas, que uma modificação pós traducional (fosforilação) da creatina quinase no resíduo de Ser6 não afeta a atividade desta enzima, mas leva ao aparecimento da enzima fosforilada no retículo endoplasmático, junto à bomba de cálcio, local no qual a creatina quinase muscular citosólica é conhecida por bombear o  $\text{Ca}^{2+}$  (Ríos *et al.*, 2014).

Considerando que esta proteína desempenha um papel central no fornecimento de energia para vários tecidos, tais como o músculo esquelético e cardíaco, e que a energia é crucial para manter o desenvolvimento e regulação da função cardíaca, o aumento na intensidade de expressão da creatina quinase tipo M demonstrada neste trabalho nos animais tratados com óleo, pode também ser associada com o benefício do consumo de óleo vegetal para a função cardíaca.

Vários estudos têm relatado efeitos benéficos dos agentes antioxidantes, particularmente no que diz respeito à proteção cardiovascular (Coppey, *et al.*, 2001; Thirunavukkarasu, *et al.*, 2007). Os organismos apresentam sistemas naturais de defesa contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, além de defender o organismo em situações patológicas, mantêm suas concentrações em níveis compatíveis com a atividade fisiológica. A produção excessiva de EROs pode levar a estresse oxidativo, perda de função celular, e, em casos mais graves, a apoptose ou necrose. Um equilíbrio entre oxidantes (EROs) e sistemas antioxidantes intracelulares é, portanto, vital para a função, regulação e adaptação celular a diversas condições.

Neste trabalho identificamos um aumento significativo (68,5%) na intensidade da thioredoxina (Trx) no grupo tratado, o que pode ser associado à proteção cardíaca oferecida pelos óleos vegetais. A Trx é uma enzima antioxidante que oferece proteção contra EROs. Considerando que doenças cardiovasculares podem causar desordens e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o aumento na intensidade da Trx no VE do grupo tratado pode contribuir para a proteção cardíaca oferecida pelo óleo de soja.

Nossos dados estão de acordo com Tuncay e colaboradores (2007), que demonstraram que os níveis da Trx redutase e outras enzimas antioxidantes que se apresentam diminuídas no coração diabético, foram normalizadas após tratamento com ômega-3.

Também observamos maior intensidade (1,63 vezes) do fator de alongamento Tu no grupo tratado com óleo de soja. Fatores de alongamento consistem de

um conjunto de proteínas que estão envolvidos com a síntese proteica, promovem o alongamento do polipeptídeo nascente (referencia). Este fator promove a ligação do aminoacil-tRNA aos ribossomas durante a síntese de proteínas em células eucarióticas, reação facilitada pela hidrólise do GTP. Esta alteração provavelmente pode indicar que animais suplementados com óleo de soja (ácidos graxos poliinsaturados), apresentam aumento na síntese proteica.

Devido à falta de resolução de algumas regiões dos géis do grupo tratado, não conseguimos quantificar a intensidade de alguns dos spots proteicos com diferenças de intensidade (proteínas do metabolismo energético; chaperona bc1; e Vdac). Devido a isto optamos por não discutir o envolvimento destas proteínas no presente trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento de alterações proteicas no VE induzidas pelo óleo de soja. O proteoma diferencial deste tecido possibilitou identificar diferenças de expressão proteicas, que podem estar associadas com os efeitos benéficos deste óleo. A identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos pode estar associadas com a redução da PDfVE encontradas nos animais tratados, e que o aumento na intensidade da Trx podem conferir maior proteção contra agentes oxidantes nestes animais.

Nossa análise proteômica diferencial do ventrículo esquerdo de animais não tratados e tratados com óleo de soja, apesar de inicial e descritiva, gerou alguns dados relevantes sobre este tratamento, que excedem investigações prévias que utilizaram técnicas bioquímicas tradicionais para a análise de proteínas. Entretanto nosso estudo proteômico apresentou várias limitações, podemos citar: (i) baixa resolução das proteínas na região básica do gel, (ii) processo utilizado para extração proteica não foi efetivo para proteínas de membranas; (iii) identificação de somente 23,3% das proteínas dos spots com diferenças de intensidade.

Nossos resultados abrem perspectivas para futuras investigações na área das

doenças cardiovasculares versus óleos vegetais. Temos como metas futuras: (i) validação das proteínas identificadas, utilizando a técnica de *Western blot*, (ii) aperfeiçoamento da técnica, com a utilização de método de maior sensibilidade para detecção proteica; (iii) análise proteômica e fosfoproteômica de organelas celulares; (iv) avaliar o efeito de vários ácidos graxos poliinsaturados puros por via oral e/ou intramuscular. A complementação de nosso trabalho com informações adicionais pode aumentar nosso conhecimento sobre este tema.

CONSIDERAÇÕES

FINAIS

1. Animais tratados com óleo de soja via IM apresentam:

- ✓ Menor valor de PDfVE,
- ✓ Alteração significativa no proteoma do VE;

2. Foram identificados 60 *spots* proteicos com intensidades diferentes entre os grupos controle e tratado com óleo de soja por 2-DE.

3. Quatorze *spots* proteicos foram identificados por espectrometria de massas, dos quais seis apresentavam maior intensidade e oito menor intensidade no grupo tratado;

4. Quatro proteínas identificadas podem ser relacionadas com a melhoria da função cardíaca observada nos animais tratados com óleo de soja, entre elas:

- ✓ - Aumento da intensidade de proteínas envolvidas na contração muscular (MCL-3, CKM);
- ✓ - Diminuição da intensidade da desmina, proteína músculo específica do filamento intermediário tipo III;
- ✓ - Aumento da intensidade da enzima antioxidante tireodoxina.

**REFERÊNCIAS**

---

**BIBLIOGRÁFICAS**

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnetti G, Kane LA, Guarnieri C. Proteomic technologies in the study of kinases novel tools for the investigation of PKC in the heart. **Pharmacol Res.**, 55(6): 511-22. 2007.

Aguirre FV, McMahon RP, Mueller H, Kleiman NS, Kern MJ, Desvigne Nickens P, et al. Impact of age on clinical outcome and postlytic management strategies in patients treated with trombolytic therapy: results from the TIMI II study. **Circulation**, 90(1): 78-86; 1994.

Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. **Clin Biochem.** 37(11): 943-952; 2004.

Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, Kellner R, Kubicek M, Lottspeich F, Maser E, Mewes Hw, Meyer He, Müllner S, Mutter W, Neumaier M, Nollau P, Nothwang Hg, Ponten F, Radbruch A, Reinert K, Rothe G, Stockinger H, Tárnok A, Taussig Mj, Thiel A, Thiery J, Ueffing M, Valet G, Vandekerckhove J, Wagener C, Wagner O, Schmitz G. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. **Cytometry A.**, 75(10): 816-832; 2009.

Ascherio A, Hennekens C, Willett WC, Sacks F, Rosner B, Manson J, Witterman J, Stampfer MJ. Prospective Study of Nutritional Factors, Blood Pressure, and Hypertension Among US Women. **Hypertension**, 27: 1065-1072; 1996.

Ayerza R, Coates W. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. **Nutrition Research**, 25: 995–1000; 2005.

Baylin A, Kabagambe Ek, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H: Adipose tissue alpha-linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. **Circulation**, 107: 1586-1591; 2003.

Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. **Proteomics**. 9(1): 106-115; 2009.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). USA, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em 06 de junho de 2014.

Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. **Diabetes**, 50(8): 1927–1937; 2001.

Corbett J, Why H, Wheeler C, et al. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, 19: 2031–2042; 1998.

Diffie GM. Adaptation of Cardiac Myocyte Contractile Properties to Exercise Training. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, 32: 112–119; 2004.

Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Bezstarosti K, Dekkers DH, Duncker DJ, et al. Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: correlations with the degree of hypertrophy. **Proteomics**, 5(10): 2519–2530; 2005.

Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.**, 10(3): 245-257; 1999.

Gorg A, Weiss WE, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, 4(12): 3665-3685; 2004.

Guina, T, Wu M, Miller SI, Purvine SO, Yi EC, Eng J, Goodlett DR, Aebersold R, Ernst RK, Lee K A. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. **J Am Soc Mass Spectrom.**, 14(7): 742-751; 2003.

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.

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.

Kan B, Habibi H, Schmid M, Liang W, Wang R, Wang DE, Jungblut PR. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. **Proteomics**, 4(10): 3061-3067; 2004.

Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, 26(3): 231-243; 1975.

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

Lisboa, Sergio Jr. **Avaliação do desempenho cardíaco de ratos infartados e tratados com óleo de soja por via intramuscular.** Tese de mestrado em ciências fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2012.

Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **J Nutr. Biochem.**, 17(1): 1-13; 2006.

Lopes Sta, Franciscato C, Teixeira LV, Oliveira TGM, Garmatz BC, Veiga APM, Mazzanti A. Determinação de creatina quinase em cães. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia.** 12: 31-37; 2005.

Mackay J, Mensah G. The atlas of heart disease and stroke. World Health Organization. 2008. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resouces/atlas/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resouces/atlas/en/)>. Acesso em 28 de abril 2014.

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

McKenney JM, Sica D. Prescription omega-3 fatty acids for the treatment of hypertriglyceridemia. **Am J Health-Syst Pharm.**, 64(6): 595-605; 2007.

Mehta RH, Rathore SS, Radford MJ, Wang Y, Krumholz HM. Acute myocardial infarction in the elderly: differences by age. **J Am Coll Cardiol.**, 38(3): 736-741; 2001.

Datasus, Ministério da Saúde.. [internet]. Sistema de informações hospitalares. Internações e valor total de internações segundo capítulo CID-10. Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 02 maio de 2014.

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: 02 de maio de 2014.

Morano I, Bachle-Stolz C, Katus A, Ruegg JC. Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. **Basic Res Cardiol.**, 83(4): 350–359; 1988.

Neuhoff V, Arold N. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R- 250. **Electrophoresis**, 9(6): 255-262. 1988.

O'farrell Ph. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol. Chem.**, 250(10): 4007-4021; 1975.

Ohara N, Kasama K, Naito Y, Nagata T, Saito Y, Kuwagata M, Okuyama H. Different effects of 26-week dietary intake of rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats. **Food Chem. Toxicol.**, 46(7): 2573-2579; 2008.

OMS - World Health Organization. Global Burden of Disease. 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/)>. Acesso em 30 de abril 2014.

OMS - World Health Organization. Global Burden of Disease. 2013. Disponível em: <[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/)>. Acesso em 30 de abril 2014.

Ouzounian M, Lee DS, Gramolini AO. Predict prevent and personalize genomic and proteomic approaches to cardiovascular medicine. **J Cardiol.**, 23(SupplA): 28A-33A; 2007.

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): 955-961; 2009.

Pepe S, McLennan PL. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and post-ischemic recovery of contractile function. **Circulation.** 105: 2303–2308; 2002.

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

Pinet F. Proteomic in cardiology. **Arch Mal Cour Vaiss**, 100(1): 47-51; 2007.

Rastogi T, Reddy KS, Vaz M, Spiegelman D, Prabhakaran D, Willett WC, Stampfer MJ, Ascherio A. Diet and risk of ischemic heart disease in India. **Am J Clin Nutr.**, 79(4): 582-592; 2004.

**Ratnayake WMN, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. Ann. Nutr. Metab., 55: 08-43; 2009.**

Ribeiro Junior RF, Fernandes AA, Meira EF, Batista PR, Siman FD, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Soybean oil increases SERCA2a expression and left ventricular contractility in rats without change in arterial blood pressure. **Lipids Health Dis.**, 9:53; 2010.

Rios E, Mancio J, Rodrigues-Pereira P, Magalhães D, Bartosch C. Large myocardial infarction with myocardium calcium deposits associated with reperfusion injury. **Cardiovasc Pathol.** Jul. 2014

Rotilio D, Della Corte A, D'imperio M, Coletta W, Marccone S, Silvestri C, Giordano L, Di Michele M, Donati Mb. Proteomics: bases for protein complexity understanding. **Thromb Res.**, 29(3): 257-262; 2012.

Saraiva RM, Kanashiro-Takeuchi RM, Antonio EL, Campos O, Tucci PJF, Moisés VA. Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction. **Braz J Med Biol Res.**, 40: 1557-1565; 2007.

Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. **Curr Opin Lipidol.**, 8(3): 159-166; 1997.

Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, et al. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. **J Clin Invest.**, 117(10): 2812–2824; 2007.

Singh VK, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. **FEMS Microbiol Lett**, 199(1): 79-84; 2001.

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). p. 1039-45. 2004

Sirtori CR, Galli C. N-3 fatty acids and diabetes. **Biomed Pharmacother**, 56(8): 397-406; 2002.

Smolina K, Wright FL, Rayner M, Goldacre MJ. Determinants of the decline in mortality from acute myocardial infarction in England between 2002 and 2010: linked national database study. **BMJ**. jan 2012.

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. **I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular**. ISSN-0066-782X • Volume 100, Nº 1, Supl.3, Janeiro 2013.

Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J. The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). **Biochimie**. 79(2-3): 95-99; 1997.

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**, 8(5): 64986; 2013.

Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, Bagchi D, Das DK, Maulik N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. **Free Radic Biol Med.**, 43(5): 720–729; 2007.

Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A. Panther: a library of protein families and subfamilies indexed by function. **Genome Res**. 13(9): 2129-2141; 2003.

Tuncay E, Seymen AA, Tanriverdi E, Yaras N, Tandogan B, Ulusu NN, Turan B. Gender related differential effects of omega-3e treatment on diabetes-induced left ventricular dysfunction. **Mol Cell Biochem.**, 304(1–2): 255–263; 2007.

Van der Velden J, Papp Z, Boontje N, et al. The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. **Cardiovasc Res.**, 57: 505–14; 2003.

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

Vercauteren FG, Arckens L, Quirion R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids**. 33(3): 405-414; 2007.

Vergote D, Bouchut A, Sautière PE, Roger E, Galinier R, Rognon A, Coustau C, Salzet M, Mitta G. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **Int J Parasitol**. 35(2): 215-24; 2005.

White M, Cordwell S, McCarron H, et al. Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems. **Proteomics**. 5: 1395–410; 2005.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol. Rev.**, 80: 1107-1213; 2000.

Wyss M, Smeitink J, Weyers Ra, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 25: 119-166; 1992.