

**Análise do proteoma mitocondrial de células
do fígado de camundongos apoE *knockout*
tratados com sildenafil**

Thiago Nunes de Menezes

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, maio de 2017

Análise do proteoma mitocondrial de células do fígado de camundongos apoE *knockout* tratados com sildenafil

Thiago Nunes de Menezes

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana S. Meyrelles

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Suely G. Figueiredo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, maio de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DO CANDIDATO
AO TÍTULO DE DOUTOR PELO PPGCF/CCS/UFES**

Número da matrícula do candidato: 2012240020

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "Análise do proteoma mitocondrial de células do fígado de camundongos apoE *knockout* tratados com sildenafil", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Thiago Nunes de Menezes, no dia 19 de maio de 2017, às 8h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 19 de maio de 2017.

Prof.^a Dr.^a Silvana dos Santos Meyrelles
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Suely Gomes de Figueiredo
Co-orientadora

Dr.^a Márcia Helena Borges
Membro externo

Prof. Dr. Marcio Fronza
Membro externo

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Membro interno

Prof. Dr.^a Nazare Souza Bissoli
Membro interno

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada ao meu afilhado, Enzo.

“O amor sem fim não esconde o medo de ser eterno e imperfeito.”

(Barão Vermelho)

AGRADECIMENTOS

Nessas horas muita coisa passa na cabeça. Inevitavelmente o sentimento de gratidão é o que mais circula. Gratidão ao Divino, Sagrado, por uma vida repleta de realizações, cercada de pessoas fantásticas e acolhida numa família maravilhosa.

Meus Pais José e Geruza. Sou muito grato a vocês por todo o esforço que fizeram ao longo da vida para me proporcionarem a melhor educação. Muito obrigado por todas as vezes que escolheram a mim, e não a vocês. Sempre que sentirem orgulho de um filho, sintam orgulho de vocês também!

Aos meus irmãos Gabriela e André, sempre foram meus alicerces. Trouxeram-me as estrelas da família: Isabela, Arthur e Enzo. E também os agregados Serge e Camila.

O meu muito obrigado à Prof.^a Silvana por abrir as portas do seu laboratório, acreditar nas minhas ideias e me ajudar a entrar no prumo quando não sabia mais para onde ir. Sempre foi muito bom conviver com você, e nossos cafés filosóficos serão inesquecíveis!

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fisiologia Translacional e do Laboratório de Química de Proteínas. Em especial a Marcella (coisa linda), ao Gustavo (murça) e ao Allan. Sem vocês boa parte desses resultados não estariam aqui, e também não teria a mesma graça!

A minha família feita ao longo desses 8 anos de Ciências Fisiológicas: Cristie(an), Paqueta, Tatá, Pedro, Léo e Olavo. Muitos seguiram por outros caminhos profissionais mas nossa amizade resiste ao tempo e às escolhas. Sem deixar de mencionar a Catita e a Juju que mesmo não fazendo parte dessa realidade, aguentam a gente falando de projeto, bolsa, congresso, artigo...

Um beijo especial para minha querida amiga Laís. Seria esperado que nós falássemos muito sobre pesquisa, mas as nossas vidas são mais polêmicas!

Meus querido primos Danilo, Felipe e Kbssa. Amor desde a infância. E claro, minha querida comadre Mariana!

Muito obrigado Carla, por ser minha entusiasta e ter toda a compreensão nos momentos de renúncia.

Aos colegas do Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ pela espectrometria de massa.

Aos amigos do HEJSN.

E por último, meu inesgotável agradecimento à minha eterna orientadora, prof.^a Suely. Você é sem dúvida minha grande inspiração, minha mentora intelectual. Às vezes me assusto em notar o quanto repito as coisas que ouço você dizer. Fiquei parecido. De você eu peguei o DNA da pesquisa! Sou muito grato a você por todos esse anos, que certamente, não se encerram aqui.

RESUMO

Um dos mecanismos propostos sobre o papel dos lipídios plasmáticos na gênese de doenças, é a sua associação com o estresse oxidativo, caracterizado pelo desbalanço redox, e que pode direta ou indiretamente estar relacionado à fisiopatologia das doenças crônicas não transmissíveis. Proteínas são moléculas envolvidas em praticamente todos os fenômenos biológicos, e o entendimento dos fatores que regulam a sua expressão, pode abrir portas para novas estratégias terapêuticas. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar alterações no proteoma mitocondrial de células do fígado (CF) de camundongos apoE *knockout* (apoE *-/-*) tratados com sildenafil. Previamente foi evidenciado que os animais apoE *-/-* apresentam perfil lipídico plasmático característico das dislipidemias, apresentando concentrações plasmáticas médias para triglicerídeos, colesterol total, LDL e VLDL de 5, 14, 6 e 36 vezes maiores que aquelas observadas para o grupo C57, respectivamente. Este aumento não foi revertido após o tratamento. A citometria de fluxo mostrou elevação nos níveis intracelulares nas CF dos animais apoE *-/-* de ânion superóxido (~82%), peróxido de hidrogênio (~60%) e peroxinitrito (~53%), além do aumento do número de células em apoptose (de ~2% para ~19%). Nossos resultados mostraram que o tratamento com sildenafil previne o aumento das ROS analisadas e inibe a indução de apoptose, sugerindo que o sildenafil possui ação antioxidante. A análise do proteoma mitocondrial por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa (2DE-MS) das CF, mostrou que em ambas as condições experimentais (doença e tratamento), houve mudança no padrão de expressão das proteínas nesse compartimento subcelular. Destaque para o aumento da expressão da urato oxidase no grupo dos animais tratados (~93%) quando comparados com os sem tratamento. Esta enzima é responsável pela degradação do ácido úrico e pode apresentar papel importante na redução da produção de ROS. Os resultados também mostraram que a dislipidemia induz o aumento da transferrina, uma proteína de transporte de Fe, que ao aumentar a oferta desse metal, pode aumentar a formação de H₂O₂ pela reação de Fenton, contribuindo para o estresse oxidativo. Foi possível observar, entretanto, que o sildenafil reduz (~70%) os níveis dessa proteína quando comparado com o grupo apoE *-/-*, indicando equilíbrio redox após o tratamento. Após o estudo proteômico

mitocondrial, foi possível observar a influência do tratamento com sildenafil na regulação de proteínas-chave na homeostase redox, contribuindo para a compreensão dos mecanismos pelos quais o sildenafil apresenta o efeito antioxidante.

Palavras-chave: Dislipidemia, estresse oxidativo, proteoma mitocondrial, sildenafil.

ABSTRACT

The role of plasmatic lipids in the chronic disease may be associated with oxidative stress, which is characterized by redox imbalance. Proteins are molecules involved in almost all biological phenomena and the understanding of the protein regulation may be a source of new therapeutic strategies. Thus, the aim of the present work was analyse the mitochondrial protein expression in 18-weeks old sildenafil-treated apoE^{-/-} mice as compared to non-treated animals. Previously, the apoE^{-/-} mice presented a plasma lipid profile characteristic of dyslipidemia, and the triacylglycerol, total cholesterol, LDL and VLDL levels were 5, 14, 6 and 36 times higher than observed from control group (C57), which was not reverted by treatment with sildenafil. Flow cytometry showed in liver cells increased levels of intracellular reactive oxygen species of superoxide anion (~82%), hydrogen peroxide (~60%), peroxynitrite (~53%) as well as increased apoptotic cells (from ~2% to ~19%). The treatment was able to prevent the production of analysed ROS and reduced the apoptotic cells, restoring the pattern observed in C57 group. It suggests that sildenafil presents an antioxidant action. Differential two-dimensional electrophoresis coupled with mass spectrometry was applied to study the changes in mitochondrial protein profile in both conditions. The treatment up-regulated urate oxidase (~93%), which degrades the uric acid and it may be consider an antioxidant way. The results also showed that the dyslipidemia induces transferrin up-regulation (~914%), an iron-transport protein. The increase of iron supply may leads to hydrogen peroxide formation by Fenton reaction, contributing to oxidative stress. The animals treated with sildenafil presented this protein down-regulated (~70%) compared with those non-treated, suggesting a redox homeostasis state after treatment with sildenafil. Our results clearly point to the strong role of sildenafil in mitochondrial ROS production. Up-regulation of urate oxidase and down-regulation of transferrin may represent an important mechanisms of beneficial action of sildenafil in mitochondrial redox imbalance during dyslipidemia.

Key words: Dyslipidemia, oxidative stress, mitochondrial proteome, sildenafil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PROPORÇÃO RELATIVA DA COMPOSIÇÃO BÁSICA DAS PRINCIPAIS LIPOPROTEÍNAS	20
FIGURA 2: DO GENOMA AO PROTEOMA: UM AUMENTO NA COMPLEXIDADE E NA DINÂMICA	28
FIGURA 3: ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	31
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDAS	39
FIGURA 5: ANÁLISE DO NÍVEL DE APOPTOSE UTILIZANDO AS MARCAÇÕES COM ANEXINA V E PI	43
FIGURA 6: FLUXOGRAMA DO ENRIQUECIMENTO DE MITOCÔNDRIAS DAS CÉLULAS DO FÍGADO	45
FIGURA 7: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE E EDIÇÃO DOS <i>SPOTS</i> CORRESPONDENTES (<i>MATCH</i>)	49
FIGURA 8: NÍVEIS INTRACELULARES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	56
FIGURA 9: PAINEL DO TIPO <i>DOT PLOT</i> DAS MARCAÇÕES DAS CÉLULAS PARA APOPTOSE	58
FIGURA 10: VALIDAÇÃO DO ENRIQUECIMENTO DE MITOCÔNDRIAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	59
FIGURA 11: PERFIL PROTEICO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA COM MITOCÔNDRIAS	61
FIGURA 12: ANÁLISE DE FATORES	63
FIGURA 13: GEL BIDIMENSIONAL TÍPICO	65
FIGURA 14: PERFIL DE INTENSIDADE DOS <i>SPOTS</i> PROTEICOS	74
FIGURA 15: REDE DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	75
FIGURA 16: VIAS DE FORMAÇÃO DE ROS DE A PARTICIPAÇÃO DO SILDENAFIL	83
FIGURA 17: O MECANISMO <i>KISS-AND-RUN</i> E A INTENSIDADE DA TRANSFERRINA	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PERFIL LÍPIDICO PLASMÁTICO.....	55
TABELA 2: VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR	57
TABELA 3: ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE INTRAGRUPOS DAS IMAGENS DOS GÉIS.....	62
TABELA 4: IDENTIDADE DOS <i>SPOTS</i> PROTEICOS EXPRESSOS NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS POR MS E MS/MS	66
TABELA 5: DADOS DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE OS GRUPOS C57, APOE E SILDENAFIL ..	69

LISTA DE ABREVIATURAS

2DE	<i>Two Dimensional Electrophoresis</i> (Eletroforese Bidimensional)
ANOVA	Análise de Variância
APO	Apolipoproteína
AU	Ácido úrico
C57	Animais controle, da linhagem C57BL/6
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclico
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano- sulfonato)
DDT	Ditiotreitol
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DHE	Dihidroetídeo
DFCH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
FIE	Focalização isoelétrica
FITC	Isiotiocianato de Fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
HK	<i>House Keeper</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
IGP	Gradiente de pH imobilizado
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MM	Massa molecular
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
PBS	Tampão fosfato de sódio com salina
PDE 5	Fosfodiesterase
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TG	Triglicerídeos
TOF	<i>Time of Flight</i> (tempo de voo)
TRIS-HCl	Tris(hidroximetil) aminometano-hidrocloreto
VDBP	<i>Vitamin D Binding Protein</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Densidade Muito Baixa)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 OS LIPÍDEOS COM RELEVÂNCIA BIOLÓGICA.....	18
1.2 O ESTRESSE OXIDATIVO	22
1.3 A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE COMO ALVO TERAPÊUTICO.....	25
1.4 AS ANÁLISES PROTEÔMICAS COMO FERRAMENTAS DE ESTUDO.....	26
1.4.1 <i>Eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa (2DE-MS)</i>	29
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVO.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 ANIMAIS.....	38
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	38
4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES.....	39
4.3.1 <i>Coleta de sangue e dosagem do perfil lipídico</i>	40
4.3.2 <i>Isolamento de células do fígado</i>	40
4.3.3 <i>Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio</i>	41
4.3.4 <i>Análise da viabilidade celular e apoptose</i>	42
4.3.5 <i>Enriquecimento de mitocôndrias das células do fígado de camundongos</i>	44
4.3.6 <i>Validação do fracionamento subcelular por Western Blot</i>	46
4.3.7 <i>Eletroforese Bidimensional (2DE)</i>	46
4.3.8 <i>Aquisição, processamento e análise das imagens dos géis</i>	48
4.3.9 <i>Digestão dos spots de interesse e extração dos peptídeos</i>	50
4.3.10 <i>Espectrometria de massa e pesquisa em banco de dados</i>	50
4.3.11 <i>Análise da interação entre as proteínas</i>	51
5 RESULTADOS.....	54
5.1 PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO	54
5.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS ISOLADAS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS	55
5.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E APOPTOSE.....	56
5.4 VALIDAÇÃO DO FRACIONAMENTO SUBCELULAR POR WESTERN BLOT	58
5.5 ANÁLISE COMPARATIVA DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS.....	59
5.6 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	63
6 DISCUSSÃO	77
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
8 REFERÊNCIAS	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Desde a segunda metade do século XX, as populações de todas as regiões do mundo, vêm passando por um processo de transição das principais doenças que fazem parte do cotidiano dos indivíduos. Saímos de um quadro onde as doenças infecto parasitárias eram causas importantes de morbimortalidade e passamos a conviver com as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), as quais são de origem multifatorial, se desenvolvem no decorrer da vida e são de longa duração. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, em 2008 as DCNT foram responsáveis por 63% dos óbitos no mundo, e são consideradas, sobretudo, um sério problema de saúde pública (Brasil - Ministério da Saúde, 2011).

Seguindo essa tendência mundial, no Brasil em 2013 foram atribuídas às DCNTs 72,6% das mortes (Serviço de Informação de Mortalidade - SIM, 2015). Essa nova configuração de mortalidade se apresenta como um desafio tanto para os gestores em saúde quanto para os pesquisadores, em função do forte impacto das DCNTs na morbimortalidade, na qualidade de vida dos indivíduos afetados, na maior possibilidade de morte prematura e nos efeitos econômicos adversos para as famílias, comunidades e sociedade em geral (Brasil - Ministério da Saúde, 2011).

Dentro do universo multifatorial das DCNT é importante destacar as dislipidemias, as quais tem seu início associado a fatores genéticos e/ou o estilo de vida, que pode estar relacionado tanto com os hábitos alimentares ricos em gorduras quanto pelo sedentarismo.

1.1 Os lipídeos com relevância biológica

Dentre os lipídeos biologicamente mais relevantes, é possível destacar: os fosfolipídeos que constituem a estrutura básica das membranas celulares; o colesterol que é o principal precursor químico dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D, além dos triglicerídeos que constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante para os seres humanos, depositados nos tecidos muscular e adiposo (Greenow et al, 2005).

Para o organismo fazer uso dos lipídeos da dieta, é necessário inicialmente haver a correta absorção no intestino delgado. Em função da característica apolar dos lipídeos, estes são previamente degradados no lúmen intestinal pelas enzimas pancreáticas (lipase e fosfolipase) gerando ácidos graxos livres e uma mistura de mono e diacilgliceróis da dieta. Em seguida, são absorvidos pelas células intestinais onde ocorre a síntese dos triglicerídeos (TG) (Parzianello et al, 2008).

O transporte pela circulação sanguínea desses lipídeos, que são altamente hidrofóbicos, é realizado por agregados moleculares, as lipoproteínas, que são compostas por lipídeos e apolipoproteínas (apo), as quais têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas como a formação intracelular das partículas lipoproteicas, caso das apo B100 e B48, e a atuação como ligantes a receptores de membrana como por exemplo a apo B100 e a apo E (Greenow et al, 2005). Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: (i) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons (de origem intestinal), e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou *very low density lipoprotein* (VLDL - de origem hepática); e (ii) as ricas em colesterol, incluindo as de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL) e as de densidade alta ou *high density lipoprotein* (HDL) (Hansson, 2005). A composição genérica das lipoproteínas é mostrada na figura 1.

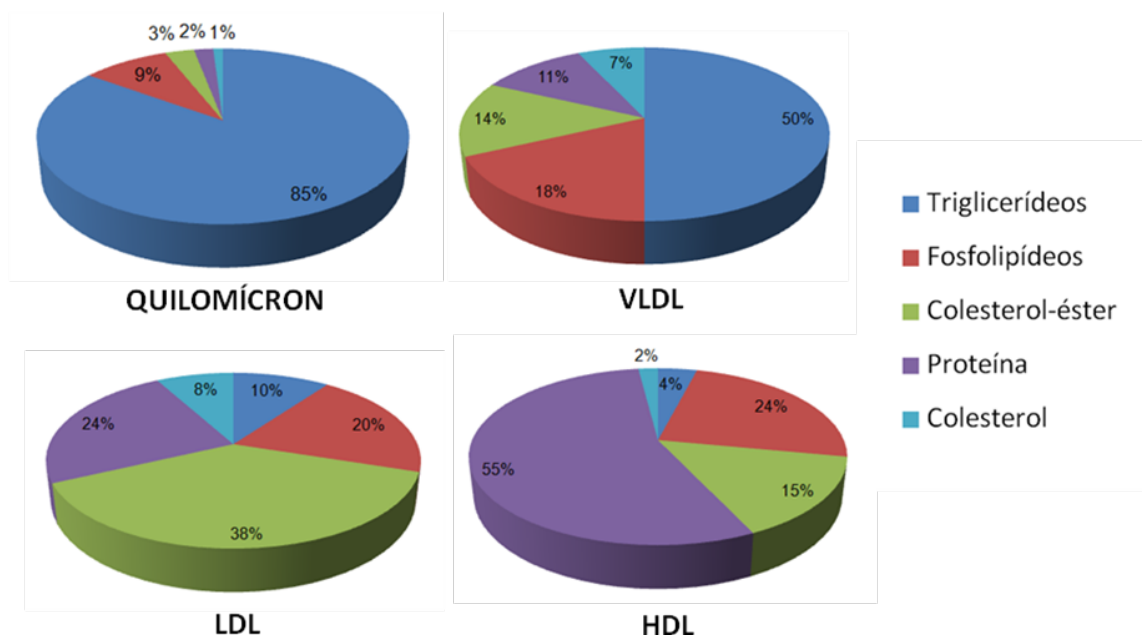


Figura 1: Proporção relativa da composição básica das principais lipoproteínas. A densidade da lipoproteína é maior quando sua porcentagem relativa de proteínas é maior e a de triglicerídeos é menor. Adaptado de Mc Kee, 2009.

O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre principalmente pelas VLDL e LDL. As VLDL são lipoproteínas ricas em TG e contêm a apo B100 como sua apolipoproteína principal. As VLDL são montadas e secretadas pelo fígado e liberadas na circulação periférica. A montagem das partículas de VLDL no fígado requer a ação de uma proteína intracelular, a proteína de transferência de triglicerídeos microsomal ou *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), responsável pela transferência dos TG para a apo B, permitindo a formação da VLDL. A montagem hepática da VLDL também vem sendo reconhecida como foco terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia, seja por meio da inibição da síntese de apo B (Raal et al, 2010), ou pela inibição da MTP (Cuchel et al, 2007). Na circulação, os TG das VLDL, assim como no caso dos quilomícrons, são hidrolisados pela lipase lipoproteica, enzima estimulada pela apo CII e inibida pela

apo CIII. Os ácidos graxos quando liberados são redistribuídos para os tecidos, onde podem ser armazenados, como no tecido adiposo, ou prontamente utilizados, nos músculos esqueléticos. Por ação da lipase lipoproteica, as partículas de VLDL progressivamente depletadas de TG, transformam-se em remanescentes, removidos pelo fígado por receptores específicos. Uma parte das VLDL dá origem às lipoproteínas de densidade intermediária (*intermediary density lipoprotein*, IDL) que são removidas rapidamente do plasma. O processo de catabolismo continua, envolvendo a ação da lipase hepática e resultando na formação das LDL (Greenow et al, 2005).

A LDL tem conteúdo apenas residual de TG e é composta principalmente de colesterol e uma única apolipoproteína, a apo B100. As LDL são capturadas por células hepáticas ou periféricas por meio dos receptores de LDL (LDL-R). No interior das células, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT). A expressão dos LDL-R nos hepatócitos é o principal fator responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidroximetilglutaril (HMG) CoA redutase, enzima-chave para a síntese intracelular do colesterol hepático. A inibição da HMG-CoA redutase e, portanto, da síntese intracelular do colesterol, é importante alvo terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia. Com a queda do conteúdo intracelular do colesterol, ocorre aumento da expressão de LDL-R nos hepatócitos, e, assim, maior captura por essas células de LDL, IDL e VLDL circulantes (Hansson et al, 2005).

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo proteico é representado pelas apolipoproteínas AI e AII. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). A apo AI, principal proteína da HDL, é cofator dessa enzima. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre principalmente nas HDL, é fundamental para sua estabilização e transporte no plasma, no centro desta partícula. A HDL transporta o colesterol até o fígado, onde este é captado pelos receptores SR-B1, sendo o circuito de transporte do

colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, denominado transporte reverso do colesterol. Neste transporte, é importante a ação do complexo *ATP binding cassette A1* (ABC-A1), que facilita a extração do colesterol da célula pelas HDL. A HDL também tem outras ações, como a remoção de lipídeos oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio (Decano et al, 2016) e a estimulação da liberação de óxido nítrico (Raal et al, 2010). Além das diferenças em tamanho, densidade e composição química, as lipoproteínas podem diferir entre si pela modificação *in vivo* por oxidação ou glicação. Estas modificações influenciam seu papel no metabolismo lipídico e no processo aterogênico (Greenow et al, 2005; Hansonn, 2005).

Dentre os mecanismos propostos sobre o papel dos lipídeos na gênese de doenças, destaca-se a sua associação com o estresse oxidativo, um estado em que o excesso de espécies reativas de oxigênio superpõe-se ao efeito dos sistemas antioxidantes, e que pode direta ou indiretamente estar relacionado à fisiopatologia das DCTN. A quantidade relativa de antioxidantes e pró-oxidantes na dieta pode influenciar a suscetibilidade de um indivíduo em desenvolver o estresse oxidativo (Shargorodsky et al, 2010).

1.2 O estresse oxidativo

A produção de espécies reativas resultantes do metabolismo do oxigênio (ROS), em proporções adequadas, exerce funções essenciais ao organismo, como a fertilização do óvulo, a ativação de genes e a participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção (Barbosa et al, 2010).

As ROS são átomos, íons ou moléculas que podem conter o oxigênio (O_2) com um elétron não pareado em sua última camada eletrônica. São caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua

formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (Munro e Treberg, 2017).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase, que controla a formação de ROS, impedindo o desbalanço. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (Barbosa et al, 2010).

As principais ROS que atuam como sinalizadores moleculares são o ânion superóxido ($\bullet O_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\bullet OH^-$) e o peroxinitrito ($\bullet ONOO^-$). O $\bullet O_2^-$ exerce papel central na função vascular, pois é responsável pela formação de outras espécies reativas, levando à menor biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) por inativação progressiva deste, através da formação de peroxinitrito ($\bullet ONOO^-$), um potente e duradouro oxidante, que gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) (para revisão consulte Munro e Treberg, 2017).

A partir do H_2O_2 a reação de Fenton produz o radical hidroxil ($\bullet OH^-$), potencializando o dano oxidativo, uma vez que esse radical é cerca de 1 milhão de vezes mais reativo que seus precursores e possui extrema instabilidade (vida média de 9-10 segundos) (Barbosa et al, 2010). Os radicais $\bullet O_2^-$, o H_2O_2 e, principalmente, o radical $\bullet OH^-$, promovem a peroxidação lipídica, com lesão das mitocôndrias, lisossomos e da própria membrana celular, podendo levar à morte das células (Percário, 2010).

O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de formação de $\bullet OH^-$ tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, capaz de alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Além disso, diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as

membranas celulares, sendo potencialmente tóxico para as células (Barbosa et al, 2010).

A prolongada exposição às ROS, até mesmo em baixas concentrações, pode resultar em danos a moléculas biologicamente importantes e potencialmente conduzir ao dano tecidual e doenças (Fang et al, 2002). As ROS têm como alvos celulares principais as proteínas, os lipídeos, o ácido desorribonucléico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), e sua produção excessiva ocasiona lesões na célula, alterando sua integridade e, conseqüentemente, sua funcionalidade (Oliveira e Schoffen, 2010).

Todas as estruturas celulares são suscetíveis a ação das ROS, porém as membranas celulares são as estruturas mais acometidas pela peroxidação lipídica, sofrendo alterações em sua estrutura e permeabilidade, o que acarreta perdas da seletividade na troca iônica, liberação de compostos citoplasmáticos e formação de produtos tóxicos (Antunes et al, 2008). Uma lesão da membrana, por sua vez, expõe as estruturas intracelulares, deixando vulneráveis diversas organelas, inclusive material genético, contribuindo para a ocorrência de mutações que desfavorecem a regulação do ciclo celular e podem provocar morte celular (Gomes, 2007). Os produtos da peroxidação lipídica, derivados de ácidos graxos poliinsaturados, são extremamente instáveis e se decompõem para formar uma série de compostos que incluem estruturas carbonílicas reativas, como o malondialdeído (MDA), o qual é produto da oxidação da partícula de LDL e cujos níveis elevados estão associados a fatores de risco cardiovascular como diabetes, hipertensão e as dislipidemias (Nasser, 2011).

Em todas as células eucariotas, a principal fonte produtora de espécies reativas de oxigênio, são as mitocôndrias (Munro e Treberg, 2017). Como já mencionado, numa situação de desbalanço redox, as ROS se tornam nocivas a homeostase de diversos tipos celulares, ao se difundirem para o citosol através de um canal iônico voltagem-dependente (VDAC) para o $\bullet\text{O}_2^-$, e por difusão simples para o H_2O_2 (Turrens, 2003), são capazes de induzir apoptose/necrose, fragmentação do material genético, peroxidação lipídica, disfunção endotelial,

dentre outros danos (Bernardes et al, 2016; Dias et al, 2014; Tonini et al, 2013; Rodrigues et al, 2013; Balarini et al, 2013). Nesse processo de produção de espécies reativas de oxigênio, as proteínas mitocondriais desempenham um papel fundamental, seja na cadeia transportadora de elétrons ou no efluxo das ROS para o citosol (Turrens, 2003).

Utilizando o modelo animal que mimetiza a dislipidemia em humanos (o camundongo *knockout* para a apolipoproteína E, apoE -/-), nosso grupo de pesquisa já evidenciou que, a dislipidemia induz o estresse oxidativo em artérias aortas (Balarini et al, 2013), em células mononucleares (Tonini et al, 2013), células do fígado (Rodrigues et al, 2013) e mais recentemente, em células da medula óssea (Bernardes et al, 2016).

1.3 A inibição da fosfodiesterase como alvo terapêutico

O principal efeito da inibição das fosfodiesterases (PDE) é o aumento dos nucleotídeos cíclicos intracelulares: Adenosina monofato cíclico (cAMP) e Guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Em função de existirem diversas isoformas das PDE bem como uma distribuição heterogênea entre os tecidos, o uso de inibidores seletivos se apresentam como estratégias terapêuticas relevantes. O sildenafil, responsável pela inibição da degradação do cGMP, apresenta alta seletividade para a isoforma 5 da fosfodiesterase, a PDE5 (Raja e Nayak, 2004). A definição mais conservadora para o sildenafil é sobre a sua atuação no relaxamento vascular, uma vez que a inibição da hidrólise o cGMP favorece o aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico. Entretanto, num contexto global, é necessário também se avaliar os efeitos pleiotrópicos desta droga. O termo pleiotrópico é, classicamente relacionado com as múltiplas funções atribuídas a um único gene, entretanto, a farmacologia também adotou esse termo de maneira a mencionar os diversos efeitos de um fármaco/droga.

Utilizando o sildenafil, Milani e colaboradores em 2005, descreveram para ratos diabéticos, um aumento da capacidade antioxidante total bem como uma redução da peroxidação lipídica. Assim como Milani, desde o final dos anos 90, vários grupos de pesquisa trouxeram diversas evidências experimentais que o aumento dos níveis intracelulares de cGMP induzidos pela inibição das PDEs (como faz o sildenafil), previnem a indução do estresse oxidativo em glândulas salivares (Abdollahi, 2003), células renais (Kohda, 2001) e pulmões (Zhang, 1999).

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa vem contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na melhora do balanço redox observada para o sildenafil. Em camundongos apoE *knockout* foi descrito: o reestabelecimento da função endotelial (Balarini et al, 2013; Leal, 2015) e a melhora de biomarcadores de genotoxicidade em células monocleares, células do fígado (Rodrigues et al, 2013) e células da medula óssea (Bernardes et al, 2016). Em modelos experimentais de hipertensão renovascular, o sildenafil foi capaz de atenuar, em camundongos, o estresse oxidativo e a lesão ao DNA (Dias et al, 2014) e melhorar a função e a estrutura endotelial (Fahning et al, 2015), e em ratos, prevenir a lesão renal desencadeada pela nefropatia induzida por contraste (Almeida, 2016).

Assim, é possível concluir que o sildenafil apresenta como efeito pleiotrópico, uma relevante ação antioxidante em diversos órgãos e sistemas, sendo uma promissora estratégia terapêutica para as desordens causadas pelo estresse oxidativo.

1.4 As análises proteômicas como ferramentas de estudo

Se fosse possível definir o lema da revolução genômica, este seria: sequenciar genes, entender suas funções e compreender (até curar) doenças. O que existe, de fato, é uma grande quantidade de informações geradas pelas

análises genômicas que ainda não atingiram esse objetivo, ainda que estes estudos tenham conduzido o desenvolvimento de diversos campos da ciência (Oliveira et al, 2014).

No curso temporal do desenvolvimento das investigações, a transcriptômica (estudo dos transcritos dos genes) foi, provavelmente, o passo seguinte mais óbvio ao estudo genômico, a fim de se compreender as informações obtidas considerando a proximidade dos transcritos ao material genético, bem como aos processos fisiológicos. Numerosos bancos de dados transcriptômicos foram gerados mas, embora informativos, eles *per se* não foram capazes de prover as informações necessárias para alcançar o entendimento da relação do genôma com seu fenótipo e suas implicações fisiológicas (Graves e Haystead 2002; Fields, 2001). Isso se deve ao fato de não haver uma linearidade entre o número de genes, de seus transcritos e das proteínas sintetizadas. A idéia de que um gene codifica somente uma proteína é ultrapassada, dada influência de processos como *splicing* alternativo do mRNA e modificações proteicas pós-traducionais (McGregor e Dunn, 2006). A figura 2 ilustra esse conceito.

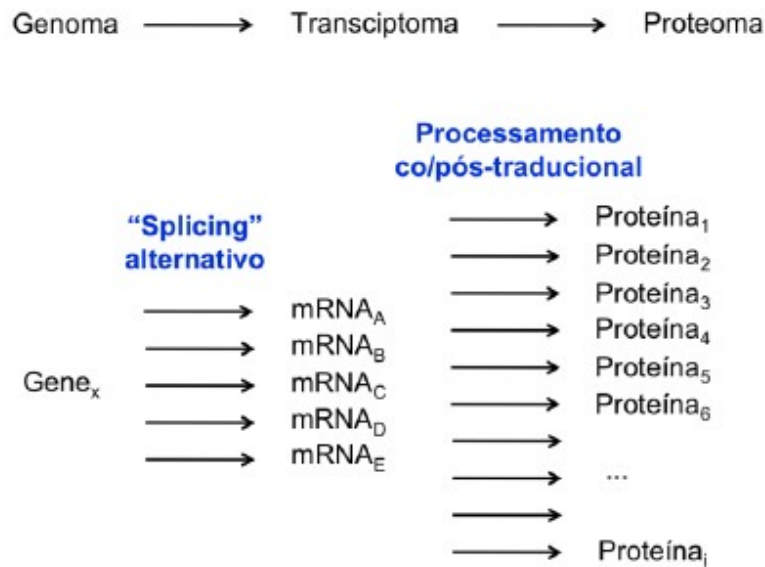


Figura 2. Do genoma ao proteoma: um aumento na complexidade e na dinâmica. A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene é devida principalmente aos *splicing* alternativos dos transcritos e às modificações co- e pós-traducionais das proteínas. É estimado que o genoma humano origina em média 180 mil diferentes espécies de mRNA. Estes são traduzidos a proteínas que são processadas em diferentes vias, gerando cerca de 8 a 10 diferentes formas modificadas de proteínas. Portanto, o genoma humano pode potencialmente produzir cerca de (180000×10) 1,8 milhões de diferentes espécies proteicas. Adaptado de Jensen (2006).

Assim, o estudo das proteínas - sendo estas o produto final da decodificação do DNA - é fundamental para fazer a conexão necessária com as informações produzidas pela genômica e a transcriptômica.

O termo proteoma foi utilizado primeiramente por Wasinger e colaboradores (1995) como proteínas complementares ao genoma. Tradicionalmente, é definido como a análise do conjunto completo de proteínas (proteoma) expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinada situação e, ao contrário do genoma,

não é estático, podendo ser modificado pelas condições e estímulos que este organismo está exposto.

Considerando esta observação, uma visão mais abrangente foi elaborada por Arrell e colaboradores (2001) para definir o termo proteoma: consiste no 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. Dessa forma, o proteoma não pode ser diretamente previsto a partir de informações do genoma ou do transcriptoma (Apweiler et al, 2009).

Enquanto o genoma é relativamente constante, o proteoma se modifica de acordo com as interações momento-a-momento, entre o genoma e o ambiente (Arab et al., 2006). 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). Assim, a análise do proteoma mostra-se significativamente mais estimulante e complexa do que o sequenciamento do genoma (Rotilio et al., 2012).

Para a análise de um determinado proteoma, utiliza-se de uma das abordagens proteômicas, termo pelo qual se representa 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 isoelétrica, eletroforeses e espectrometria de massa) e bioinformática (Van Eyk, 2011).

1.4.1 Eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa (2DE-MS)

De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas nos tipos *top-down* ou *bottom-up*. Os dois conceitos se diferenciam em sua essência quanto a forma de análise das proteínas: na abordagem *top-down* as proteínas não passam por processos de separação, tendo como objeto de análise a amostra completa. Já o conceito *bottom-up*, a identificação das proteínas de interesse é feita após uma prévia separação das proteínas contidas naquele proteoma, e em seguida a digestão triptica dessas proteínas (Oliveira et al, 2014), como é feito na eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa.

A eletroforese bidimensional (2DE) foi desenvolvida há mais de 40 anos por O'Farrell (1975) e Klose (1975), sendo, desde então, aperfeiçoada. Nesta técnica as proteínas são separadas em duas etapas (dimensões): 1ª dimensão (FIE - focalização isoeletrica), nesta etapa, 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 num gel em tira, 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). A associação dessas tecnologias tem contribuído para a caracterização de grande parte das proteínas presentes em organismos vivos e para a análise de proteomas complexos (Rotilio et al., 2012).

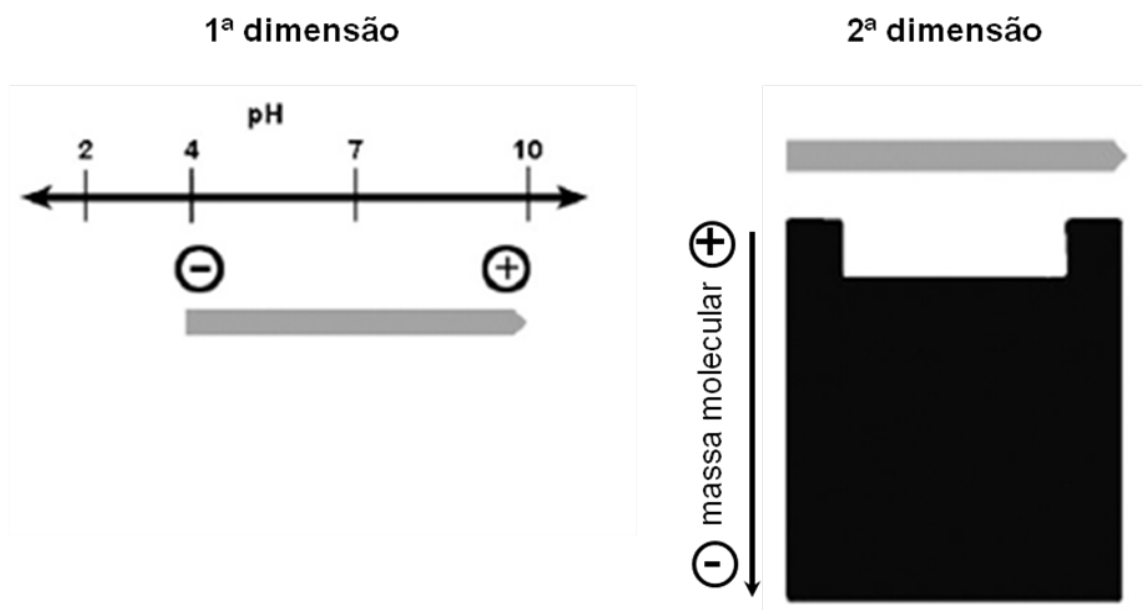


Figura 3. Eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão, as proteínas são resolvidas (separadas) de acordo com seu ponto isoelétrico, utilizado a focalização isoelétrica. Nesta etapa, as proteínas migram num campo elétrico sobre um gel com gradiente de pH, até estacionarem na faixa onde sua carga líquida é zero. Na segunda dimensão a migração ocorre em gel de poliacrilamida de acordo com sua massa molecular relativa. Adaptado de Oliveira et al., 2014.

Após a distribuição pelo gel de poliacrilamida de acordo com suas características físico-químicas, as proteínas então são extraídas, submetidas à digestão por tripsina e identificadas por espectrometria de massa (MS). A técnica consiste basicamente na ionização da proteína e na avaliação da razão massa/carga (m/z) dos íons. Os equipamentos possuem uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massa e um detector. O primeiro componente é utilizado para gerar íons peptídicos ou proteicos, geralmente transferindo prótons (H^+) para as moléculas sem alterar sua estrutura química. O íon é acelerado por

campo elétrico e separado por m/z no analisador de massa, ou então é selecionado de acordo com uma relação m/z previamente determinada e fragmentado em um processo denominado *em tandem* (MS2 ou MS/MS). Finalmente, os íons passam pelo detector, que é conectado a um computador com programas para análise de dados (May, 2011).

Corretamente aplicada, a proteômica fornece aos pesquisadores “inventários proteicos celulares” em momentos específicos, tornando-se ferramenta ideal para a documentação das modificações proteicas fruto de determinada doença, condição ou tratamento (Arrell et al, 2001). A triagem proteica em larga escala, possibilitada pela análise proteômica, permite a execução de estudos sobre expressão proteica impossíveis de serem realizadas utilizando-se somente as técnicas clássicas de biologia molecular, as quais possibilitam a análise da expressão de somente uma ou poucas proteínas, em determinado momento (Vercauteren et al., 2007).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

As proteínas têm papel fundamental na gênese, regulação e manutenção de diferentes ações celulares. Quando alguma alteração, seja por influência externa ou interna ocasiona o mau funcionamento das proteínas, os danos celulares podem ser irreversíveis.

Considerando que a proteômica oferece inúmeras possibilidades para o entendimento dos diferentes processos celulares, e que o estresse oxidativo pode ocasionar danos irreversíveis para as células, torna-se muito importantes estudos que ajudem a entender como diferentes abordagens terapêuticas podem modular a expressão proteínas que estão diretamente envolvidas na geração de estresse oxidativo.

Objetivos

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tratamento com sildenafil no proteoma mitocondrial de células do fígado de camundongos espontaneamente dislipidêmicos (*apoE knockout*).

3.2 Objetivos específicos

Numa visão sequencial da investigação, este trabalho teve como objetivos específicos após o tratamento com sildenafil:

- Avaliar o perfil lipídico plasmático dos animais.

Nas células do fígado os objetivos foram identificar e quantificar marcadores intracelulares para:

- Concentração do ânion superóxido;
- Concentração do peróxido de hidrogênio;
- Concentração do óxido nítrico;
- Concentração de peroxinitrito;
- Indução de apoptose.

Paralelamente, ainda com as células do fígado, os objetivos foram:

- Padronizar e validar metodologia para enriquecimento/isolamento de mitocôndrias;
- Avaliar o perfil do proteoma mitocondrial dos animais, utilizando eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos, isogênicos, *knockout* para a apolipoproteína E (apoE $-/-$) os quais se tornam espontaneamente dislipidêmicos. Também foram utilizados os animais controle da linhagem C57BL/6, neste trabalho referidos como C57.

Todos os animais foram obtidos no Biotério de Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFES (07/2010). Os camundongos foram criados e mantidos com acesso a ração e água *ad libitum*, em ambiente com ciclo claro/escuro 12/12h com temperatura e umidade controladas (22 ± 2 °C e 60%, respectivamente).

4.2 Grupos experimentais

A partir da 8^a até a 18^a semana de idade, os animais apoE $-/-$ receberam dieta *western type* (Rhoster) contendo 41% de calorias em forma de lipídeos e 1,5% de colesterol, a fim de acelerar o processo de desenvolvimento da dislipidemia. Para investigar a influência do tratamento com sildenafil, entre a 16^a e 18^a semanas, os animais apoE $-/-$ foram subdivididos em 2 grupos:

- Os tratados com sildenafil por via oral na dose de 40mg/Kg/dia (grupo SILDENAFIL);
- Animais apoE $^{-/-}$ que receberam apenas veículo por via oral (grupo APOE).

Os animais controle da linhagem C57 receberam dieta comum para roedores (Labina).

4.3 Obtenção das amostras e análises

O esquema a seguir sintetiza as etapas experimentais bem como os protocolos desenvolvidos para as análises das amostras.

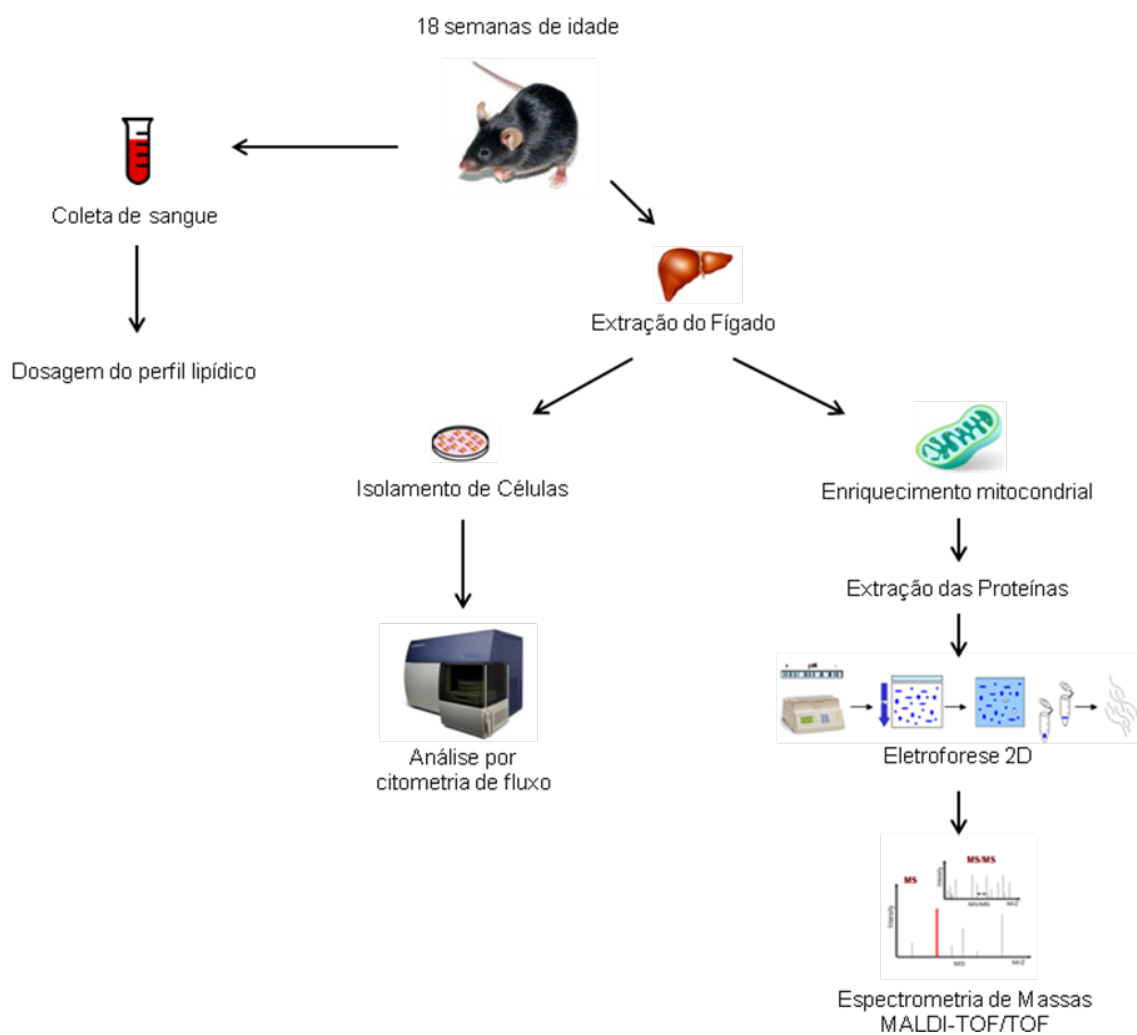


Figura 4: Representação esquemática das etapas experimentais desenvolvidas. Ao atingirem 18 semanas de idade, os camundongos tiveram amostras de sangue coletadas para dosagens dos lipídeos plasmáticos. O fígado foi extraído para a identificação/dosagem de ROS intracelulares e a análise o proteoma mitocondrial.

4.3.1 Coleta de sangue e dosagem do perfil lipídico

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, Cristália) por via intraperitoneal (i.p.). Após a exposição cirúrgica do fígado e do coração (laparotomia seguida de toracotomia), foi obtido acesso intraventricular esquerdo, para coleta de sangue. As amostras coletadas foram imediatamente transferidas para tubos contendo heparina e em seguida, centrifugados a 800 g por 10 minutos. O plasma foi separado do concentrado de hemácias e armazenado a - 20 °C até o momento das análises. O colesterol plasmático, os triglicerídeos, a lipoproteína de baixa densidade (HDL) e a lipoproteína de alta densidade (LDL) foram dosadas utilizando conjuntos de dosagem colorimétricas (Bioclin) seguindo a metodologia do fabricante. A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foi estimada subtraindo o HDL e o LDL do colesterol total.

4.3.2 Isolamento de células do fígado

De maneira sequencial ao procedimento descrito no item 4.3.1, após a coleta de sangue o acesso intraventricular esquerdo foi utilizado para perfusão com 10 mL de solução salina 0,9 % m/v a fim de retirar o excesso de sangue contido no fígado antes de sua retirada completa. A amostra foi então fragmentada com tesoura, sobre placa de vidro em banho de gelo. Aos fragmentos foi adicionado 1 mL de tripsina (Gibco), transferidos para tubos de polipropileno com fundo cônico, agitados em agitador tipo vortex por 10 segundos e incubados por 30 minutos a 37 °C sobre mesa de agitação circular a 200 rotações por minuto. O material foi filtrado em malha de nylon de 70 µm e em seguida, lavado 3 vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) pH = 7,4 a 1100 g por 10 minutos (Rodrigues et al, 2013).

4.3.3 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio

Para verificar os níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio (ROS), os níveis do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do peroxinitrito ($\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$) e do óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) foram determinados nas amostras por citometria de fluxo.

Para um N = 6 animais por ensaio, após o isolamento, alíquotas de células do fígado foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Para estimativa da quantidade citoplasmática de $\bullet\text{O}_2^-$, foi adicionado dihidroetídeo (DHE) numa concentração final de 160 ηM , e para estimativa de H_2O_2 foi adicionado 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) numa concentração de 20 mM, ambos foram mantidos ao abrigo da luz por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas e ressuspensas em PBS e mantidas a 4 °C até o momento da aquisição dos dados. As amostras utilizadas como controle positivo para reação com DHE e DFC, foram incubadas por 5 minutos com doxorrubicina (10 ηM , concentração final) ou peróxido de hidrogênio (50 mM, concentração final) respectivamente.

O DHE atravessa livremente a membrana celular alcançando o citoplasma. Ao entrar em contato com $\bullet\text{O}_2^-$, sofre uma reação de oxidação liberando o etídeo, o qual é capaz de se ligar ao DNA da célula causando a amplificação da fluorescência na cor vermelha (Porto et al, 2015).

O DCFH-DA é um éster não fluorescente, lipofílico que facilmente atravessa a membrana plasmática. Dentro da célula, esterases citosólicas desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) o qual, devido a sua polaridade, fica confinado no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio (principalmente o peróxido de hidrogênio) oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde. Desta forma, a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos

metabólitos oxidativos produzidos pelas células, em particular H_2O_2 (Lunardi et al, 2006).

Já o diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA) foi utilizado para estimar a biodisponibilidade do óxido nítrico. Semelhantemente ao DCFH-DA, o DAF-2 DA é degradado por esterases intracelulares, formando o DAF2, o qual na presença do $\bullet NO$ é convertido em triazol fluoresceína (DAF-2T). Esta molécula ao ser excitada com luz na faixa de 450 nm, emite luz verde. Para este ensaio, o DAF-2 DA (2 mM concentração final) foi adicionado à suspensão de células isoladas do fígado e incubado à 37 °C por 180 minutos ao abrigo da luz. Como controle positivo, foi utilizado o nitroprussiato de sódio a 10 μM de concentração final (Dias et al, 2014).

As espécies altamente reativas ($\bullet ONOO^-/\bullet OH^-$) foram coradas pelo corante HPF (5 μM) por 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. Como controle positivo, as amostras foram incubadas com nitroprussiato de sódio e 10 μM de doxorrubicina (Setsukinai et al, 2003). Após a marcação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para posterior aquisição no citômetro de fluxo.

4.3.4 Análise da viabilidade celular e apoptose

A utilização da citometria de fluxo, através do uso simultâneo da anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do iodeto de propídio (IP), permite a distinção entre a apoptose e a necrose. A anexina V tem afinidade nanomolar para a fosfatidilserina, e quando conjugada com o FITC permite a quantificação células em apoptose. Por outro lado, a utilização do iodeto de propídio permite a marcação das células em que há perda da integridade da membrana, uma vez que se intercala na dupla cadeia do DNA emitindo fluorescência, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática íntegra. Neste sentido, pela exposição simultânea à anexina V e ao IP é possível a

discriminação de quatro grupos: (i) células viáveis, ou seja, não marcadas pela anexina V nem pelo IP; (ii) células em apoptose inicial, marcadas apenas pela anexina V; (iii) células em apoptose tardia/necrose, e portanto marcadas pela anexina V, bem como pelo IP; (iv) e células em necrose, apenas marcadas pelo IP (Valente, 2011).

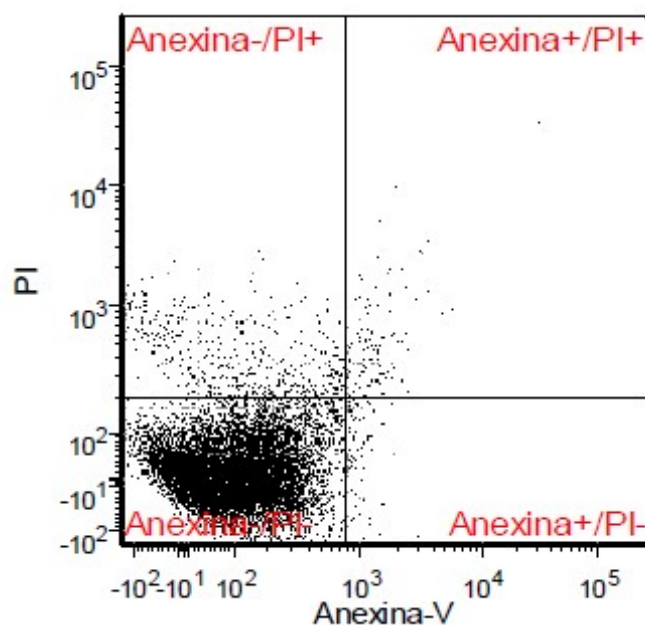


Figura 5: Análise do nível apoptose utilizando as marcações com anexina V e iodeto de propídeo. Gráfico típico representando células negativas para ambos marcadores.

Nesta análise, foi utilizado o reagente *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*® (BD Pharmingen), de acordo com as orientações do fabricante.

4.3.5 Enriquecimento de mitocôndrias das células do fígado de camundongos

O fracionamento subcelular bem como a validação desta técnica foram conduzidos de acordo com o método descrito por (Dimauro et al, 2012), com algumas adaptações.

De maneira sequencial ao procedimento descrito no item 4.3.2, após a coleta de sangue, o acesso intraventricular esquerdo foi utilizado para perfusão com 10 mL de tampão de isolamento (250 mM de sacarose, 50 mM de TRIS-HCl, 5 mM de cloreto de magnésio, pH = 7,4) a fim de retirar o excesso de sangue contido no fígado antes de retirada completa do órgão. Foi então realizada sua fragmentação com tesoura e adicionado 2 mL de tampão de isolamento contendo coquetel de inibidor de proteases (1% v/v, Sigma). Os fragmentos foram homogeneizados com auxílio de pistilo de polipropileno acoplado a um homogenizador automático durante 30 segundos a 500 rotações por minuto. Este homogenato foi mantido em gelo por 30 minutos para decantação. Após esse período, o material foi agitado vigorosamente em agitador tipo vortex por 15 segundos e em seguida centrifugado a 800 g por 15 minutos a 4 °C, originando um precipitado (P₁) composto por núcleos e detritos celulares (descartados) e um sobrenadante (S₁) que foi recuperado. S₁ foi centrifugado a 11000 g por 10 minutos a 4 °C, dando origem ao sobrenadante S₂ contendo majoritariamente a fração citosólica, e a um precipitado P₂ de conteúdo mitocondrial. Ao S₂ foi adicionado para precipitação das proteínas, acetona 100% e mantido a - 20 °C por 1 hora. O precipitado proteico do citosol (P₄) foi obtido após centrifugação a 12000 g por 5 minutos a 4 °C.

Paralelamente, P₂ foi lavado 3 vezes com tampão de isolamento a 11000 g por 10 minutos a 4 °C dando origem ao precipitado P₃ rico em mitocôndrias, o qual foi ressuspenso em tampão de armazenamento (1 mM de EDTA; 50 mM de TRIS-HCl; 0,5 % v/v Triton X-100; e coquetel de inibidor de proteases). As amostras foram submetidas a 3 ciclos de sonicação em banho de gelo de 10

segundos com intervalos de 30 segundos. Em seguida, armazenadas a - 20 °C até o momento das análises. A seguir, o fluxograma do protocolo descrito:

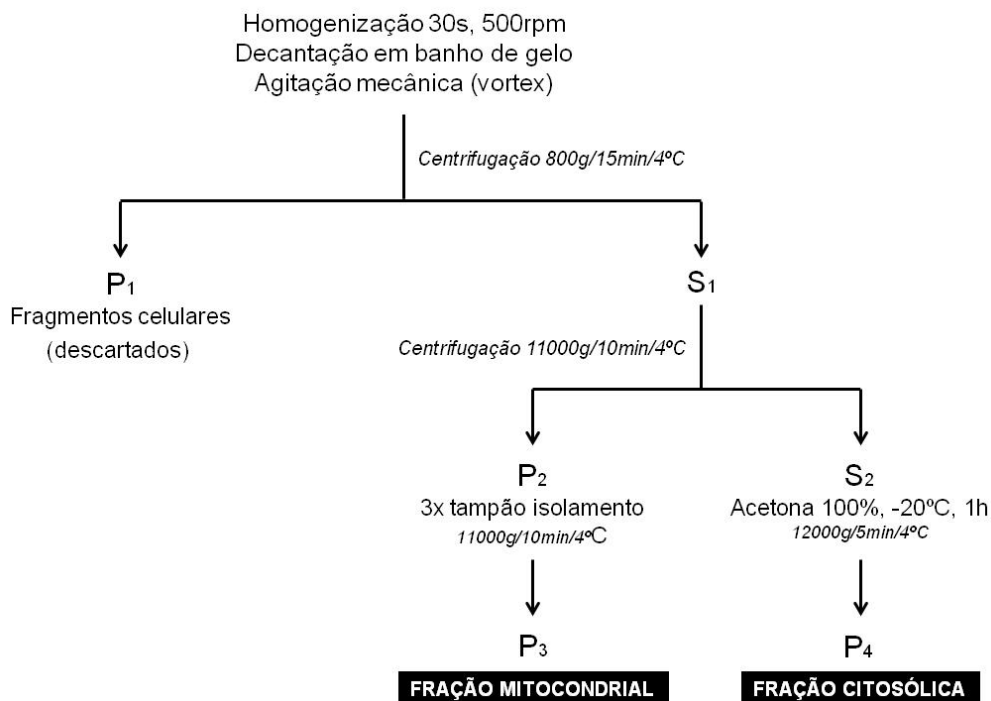


Figura 6: Fluxograma do enriquecimento de mitocôndrias das células do fígado de camundongos. O esquema mostra as etapas de centrifugações em sequencia até a obtenção das alíquotas ricas em mitocôndria.

O conteúdo proteico das frações P₃ e P₄ enriquecidas com proteínas citosólicas e mitocondriais respectivamente, foi dosado utilizando 2-D *Quant Kit* (GE LifeSciences) conforme metodologia do fabricante.

4.3.6 Validação do fracionamento subcelular por *Western Blot*

Para a validação do fracionamento subcelular, a pureza das frações derivadas da mesma amostra das células do fígado de camundongos foi verificada por proteínas chamadas *house-keeper* (HK). Amostras proteicas contendo 25 µg por fração (citosólica e mitocondrial) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em gradiente de 10-20% num sistema Mini-Protean Gel (Bio-Rad) e, em seguida, transferidas durante 12h a 24 V e 4 °C para uma membrana de nitrocelulose (GE LifeSciences).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 2h com TBS-T (TRIS 20 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0,1%) com adição de 5% m/v leite desnatado. Em seguida foram realizadas 3 etapas de lavagens com TBS-T (10 min sob agitação). O reconhecimento das proteínas na membrana foi realizado através de incubação por 12h a 4 °C de anticorpos monoclonais para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 1:5000 - Santa Cruz Biotechnologies) e Citocromo c (Cox-IV subunidade IV, 1:2000 - MitoSciences), as quais são proteínas HK para citosol e mitocôndria respectivamente. Após mais 3 etapas de lavagens com TBS-T (10 min sob agitação), o anticorpo secundário (1:5000, Cell Signaling) foi diluído em TBS-T com 5% m/v de leite desnatado e incubado na membrana por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 2 vezes por 10 minutos com TBS-T e mais 2 vezes por 10 minutos com TBS (TBS-T sem Tween 20). As proteínas foram detectadas por uma reação de quimiluminescência, utilizando Kit ECL (GE LifeSciences).

Finalmente, as membranas foram colocadas em foto documentador sensível à quimiluminescência (Bio-rad) para revelação das marcações.

4.3.7 Eletroforese Bidimensional (2DE)

- *Primeira dimensão - Focalização Isoelétrica (FIE)*

Inicialmente, as amostras enriquecidas com mitocôndrias foram submetidas à lise das organelas por sonicação em 3 ciclos de 10 segundos com intervalos de 30 segundos, em banho de gelo. Em seguida as amostras foram submetidas a uma etapa de retirada de impurezas indesejáveis (*2D Clean Up* - GE LifeSciences) a fim de obter uma melhor resolução na separação das proteínas.

Para a focalização isoelétrica foram utilizados géis em tira (*Strips*, GE Healthcare), de 11 cm com gradiente não linear de pH de 3 a 11. Alíquotas contendo 320 µg de proteína das amostras enriquecidas com mitocôndrias, foram diluídas em tampão de reidratação (*DeStreak*, GE LifeSciences) contendo 0,2 % v/v de anfólitos (*Bio-Lyte 3-10 Buffer*, Bio-Rad) para um volume final de 250 µL. As alíquotas então foram transferidas para bandejas de reidratação e as *strips* colocados sobre estas, por um período de 30 minutos até total incorporação no gel. Em seguida as *strips* foram cobertas com óleo mineral (Bio-Rad) e mantidas por um período de 18 horas (reidratação passiva) e então realizada a FIE (1ª etapa: 250 V por 15 minutos; 2ª etapa: acúmulo gradual de voltagem, por rampa linear, até 8000 V por 2 horas; 3ª etapa: acúmulo de 20000 Volts/Hora; 4ª etapa: 500 V por 4 horas) em um sistema Protean IEF Cell (Bio-Rad) a 20 °C, respeitando a corrente máxima de 50 mA/gel.

Após o término da focalização isoelétrica, as proteínas no gel foram submetidas à redução e alquilação de acordo com Andrade et al, (2008). O processo consistiu de incubação seqüenciada com: (i) tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS e 0,002 % de azul de bromofenol) contendo 125 mM de DTT, durante 15 minutos; e (ii) tampão de equilíbrio contendo 125 mM de iodoacetamida durante 15 minutos.

- *Segunda dimensão - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

A segunda dimensão da eletroforese, foi realizada de acordo com Laemmli (1970) num sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare) com gel de separação de poliacrilamida a 12,5 %. O gel de separação foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida em água (29,2:0,8 %), contendo 0,1 % de SDS p/v, 0,1 % de persulfato de amônio p/v, 0,1 % de TEMED v/v e 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8. As *strips* contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidos para superfície do gel e seladas com agarose 0,5 % (preparada em tampão Tris/Glicina/SDS). A eletroforese foi conduzida a 20 mA/gel por 30 minutos e, em seguida a 40 mA/gel até o término da corrida em tampão Tris-HCl 0,025M, glicina 0,2M contendo 0,1% de SDS pH 8,3.

Decorrido o tempo da eletroforese, os géis foram retirados das placas e corados com solução de Coomassie coloidal Brilliant Blue G-250, Bio-Rad (H_3PO_4 2 % v/v; CH_3OH 20 % v/v; NH_4SO_3 10% p/v; Coomassie 0,05 % p/v) por 5 dias sob agitação constante. Após a coloração, o excesso da solução de corante foi retirado com água ultrapura Milli-Q, por 24 horas.

4.3.8 Aquisição, processamento e análise das imagens dos géis

Para obtenção das imagens, os géis de poliacrilamida foram digitalizados utilizando escaner ImageScanner III (GE Life Sciences) no modo de transmissão calibrado. Para cada grupo (C57, APOE e SILDENAFIL) foram obtidos 4 géis, correspondentes a cada animal do grupo (C57 1-4; APOE 1-4; e SILDENAFIL 1-4) totalizando 12 imagens, as quais foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences). A variação experimental foi determinada por meio da análise de correlação (*scatter plot*) dentro do conjunto de imagens obtidas

de cada grupo. A autenticidade dos *spots* foi validada por inspeção visual e editada quando necessário. A intensidade de cada *spot* foi normalizada em porcentagem de volume:

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

Onde:

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

Após a inspeção manual, os *spots* marcados nas imagens dos géis foram submetidos à análise de correspondência (*match spot*) para que sua intensidade fosse comparada apenas com o *spot* correspondente dos demais grupos experimentais (figura 7).

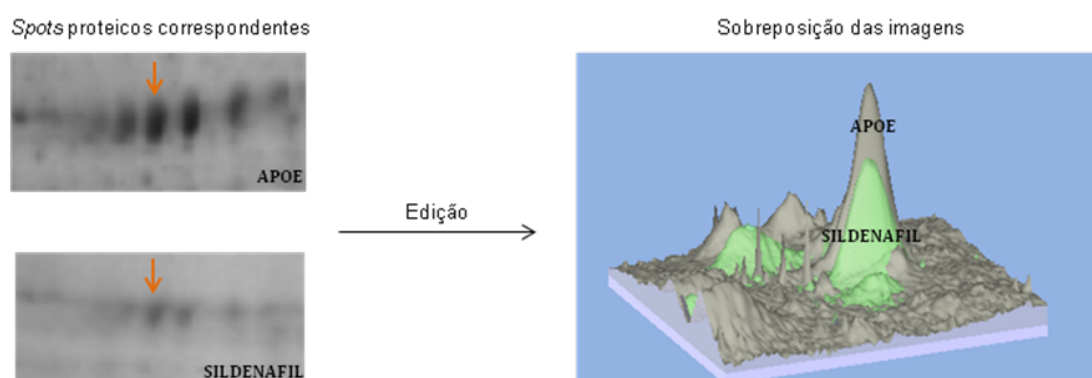


Figura 7: Esquema representativo da análise e edição dos spots correspondentes - *match spot* - entre os grupos experimentais.

4.3.9 Digestão dos *spots* de interesse e extração dos peptídeos

As frações dos géis contendo os *spots* de interesse, selecionados conforme item anterior, foram manualmente removidas do gel, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico, e descoradas por 3 lavagens de 15 minutos com 400 μL de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25 mM 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 (CentriVap concentrator - LABCONCO). As frações foram reidratadas com 10 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ μL de tripsina grau espectrometria de massa (Promega) e mantidas por 30 minutos em banho de gelo para incorporação da solução. Para manter as frações úmidas durante a hidrólise triptica, 20 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados, e a mistura foi incubada por 14 horas a 37°C.

Em seguida, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e as frações do gel foram submetidas a duas lavagens sucessivas com 30 μL de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (30 minutos cada, sob agitação), para completa remoção dos fragmentos tripticos. As soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido até aproximadamente 10 μL , por concentração a vácuo. Posteriormente, as amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Os fragmentos da hidrólise enzimática foram eluídos da resina com 8 μL de solução 50% de acetonitrila, contendo 0,1% de TFA (Vergote et al., 2005).

4.3.10 Espectrometria de massa e pesquisa em banco de dados

As amostras foram preparadas para aquisição dos espectros de massa em sistema de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight/Time of Flight* (MALDI-TOF/TOF). Para isso, alíquotas de 0,3 μL de cada amostra previamente digerida e dessalinizada conforme descrição no item anterior, foram aplicadas em placa anchorship 600 (Bruker Daltonics). Logo em seguida, sobre as amostras foi aplicado o volume de 0,3 μL de solução saturada da matriz de CHCA (5mg/mL de matriz em acetonitrila 50% / TFA 0,1%) para incorporação às amostras e posterior co-cristalização à temperatura ambiente.

O espectrômetro de massa Autoflex IIIITM (Bruker Daltonics), foi operado no modo positivo/refletor. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de peptídeos *Peptide Calibration Standard II*, a qual estavam contidos: 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) $m/z = 3147,47$. Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS.

Os dados adquiridos de cada *spot* proteico (MS e MS/MS) foram investigados no banco de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante (NCBIprot) com interface compartilhada com o software MASCOT®. Os parâmetros selecionados para as buscas foram: Peptídeos trípticos com ausência de um único fragmento; Taxonomia de *Mus musculus*; Carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável; Valores de massa monoisotópica; Carga do peptídeo 1+; Tolerância de 0,4 Da na massa do MS e do MS/MS. Os resultados encontrados após a pesquisa no MASCOT® foram exportados e cruzados com o banco de dados UniProt para confirmação.

4.3.11 Análise da interação entre as proteínas

As proteínas identificadas foram carregadas na base de dados STRING (<http://string-db.org>), utilizado para verificar as possíveis interações proteína-proteína existentes. Para essa busca, foram utilizados os números das entradas - fornecidos pelo banco de dados no Uniprot. A busca foi parametrizada como "múltiplas proteínas", *score* de interação mínima de 0,900 de confiança, e vinculadas ao organismo *Mus musculus*. As proteínas que apresentaram interação entre si, foram agrupadas de acordo com suas funções e localização, e as que não apresentaram interação foram excluídas.

4.3.12 Análises estatísticas

Os dados apresentados nesse trabalho, são expresso como média \pm EPM. As diferenças entre as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de pós teste de Tukey, e foram consideradas significativas quando a confiança no resultado foi acima de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Perfil lipídico plasmático

Os animais *knockout* para a apolipoproteína E, os quais receberam a dieta aterogênica por 10 semanas, apresentaram alteração significativa em todos os parâmetros analisados do perfil lipídico, tanto os animais do grupo APOE quanto do grupo SILDENAFIL (tabela 1). Para o grupo APOE, as concentrações plasmáticas médias de triglicerídeos, colesterol total, LDL e VLDL foram 5, 14, 6 e 36 vezes maior que aquelas observadas para o grupo C57, respectivamente. Como esperado, houve uma redução de ~ 50% na concentração plasmática de HDL, na comparação entre os grupos APOE e C57. Os animais do grupo SILDENAFIL apresentaram perfil lipídico plasmático semelhante ao dos animais do grupo APOE e, portanto, o fator tratamento não alterou os parâmetros analisados.

Tabela 1: Perfil lipídico plasmático. Valores apresentados como média \pm EPM em mg/dL. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C57.

Lipídeos	C57	APOE	SILDENAFIL
Triglicerídeos	69,75 \pm 7,7	229,0* \pm 19,2	241,5* \pm 18,0
Colesterol total	87,50 \pm 5,2	1278*,0 \pm 63,2	1367,0* \pm 172,2
Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	32,25 \pm 3,6	178,8* \pm 6,2	182,8* \pm 2,7
Lipoproteína de alta densidade (HDL)	42,25 \pm 4,0	19,50* \pm 1,0	20,75* \pm 3,0
Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)	31,13 \pm 6,2	1090,0* \pm 63,2	1174,0* \pm 172,2

5.2 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em células isoladas do fígado de camundongos

A determinação dos níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio em células isoladas do fígado de camundongos, foi realizada por meio da citometria de fluxo. Foi detectada a elevação de ~82%, ~59% e ~53% na intensidade dos marcadores DHE ($\cdot\text{O}_2^-$), DCF (H_2O_2) e HPF ($\cdot\text{ONOO}^-/\cdot\text{OH}^-$) respectivamente, nos animais do grupo APOE, quando comparados com o grupo controle. Foi observado também que essas intensidades para os animais do grupo SILDENAFIL, são similares aquelas encontradas no grupo C57, sugerindo que o tratamento com sildenafil previne o aumento/produção do ânion superóxido, do peróxido de hidrogênio e do peroxinitrito nos camundongos dislipidêmicos (figura 8 A, B e D, respectivamente). Ao comparar com o grupo C57, não foram observadas alterações na intensidade do marcador DAF para os grupos APOE e SILDENAFIL (figura 8C), cujo marcador é correspondente aos níveis intracelulares de óxido nítrico.

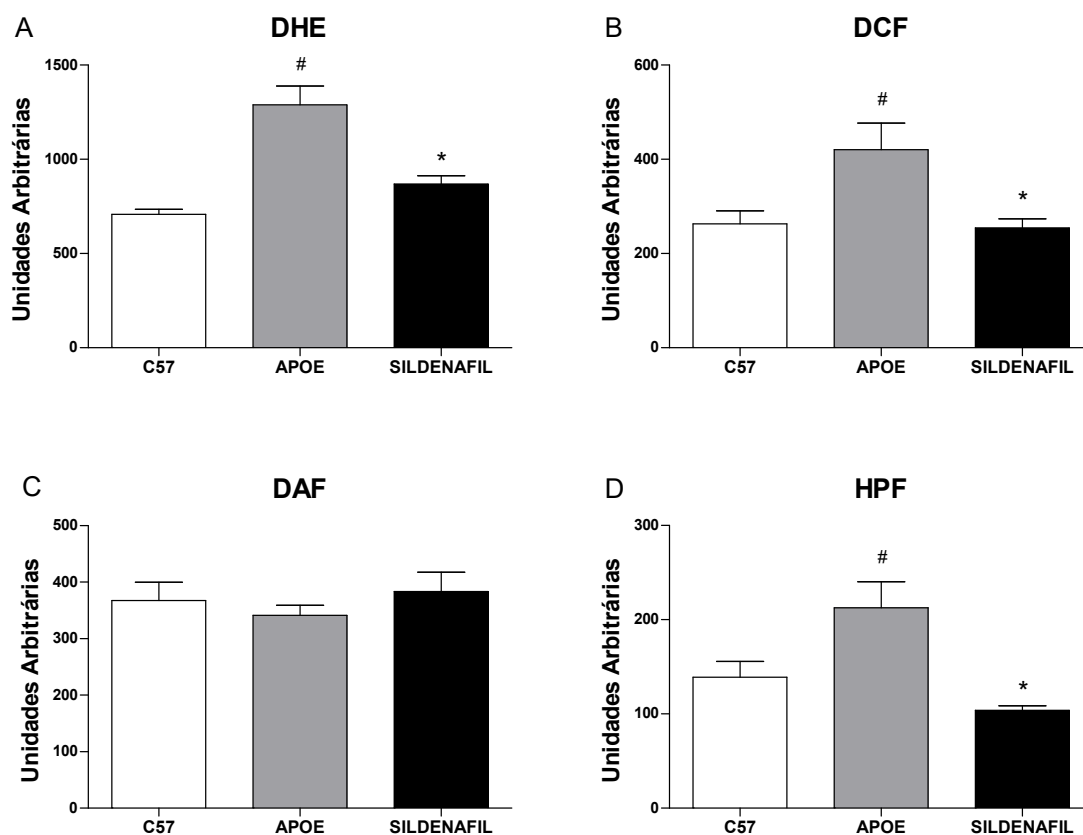


Figura 8: Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Os níveis $\cdot\text{O}_2^-$ (A), H_2O_2 (B), NO (C) e $\cdot\text{ONOO}^-/\cdot\text{OH}^-$ (D) foram estimados, por citometria de fluxo, em células isoladas a partir do fígado de camundongos, num total de 10000 eventos. Os dados são apresentados como a média de unidades arbitrárias \pm EPM. [#] $p < 0,05$ comparado com o grupo controle e ^{*} $p < 0,05$ comparado com o grupo APOE.

5.3 Análise da viabilidade celular e apoptose

O processo apoptótico está intimamente relacionada com o estresse oxidativo e, conseqüentemente, o desempenho da células em questão em

executar suas atividades fim. A tabela 2 mostra os resultados obtidos na análise por citometria de fluxo utilizando o *Annexin V kit*, como descrito no item 4.3.4.

Em comparação com os animais do grupo C57, houve uma redução na porcentagem de células viáveis nos animais do grupo APOE ($96,78 \pm 0,54\%$ versus $81,39 \pm 2,86\%$). Concomitantemente, a porcentagem de células em estágio de apoptose inicial aumentou de $2,02 \pm 0,18\%$ no grupo C57 para $18,73 \pm 2,16\%$ no grupo APOE. Houve ainda uma redução no percentual de células em necrose no grupo APOE ($0,06 \pm 0,02\%$), quando comparado com o grupo C57 ($0,44 \pm 0,06\%$).

Tabela 2: Viabilidade celular e apoptose. Os dados são expressos como média \pm EPM da porcentagem das células analisadas.

Estágio	C57	APOE	SILDENAFIL
Células viáveis	$96,78 \pm 0,54$	$81,39 \pm 2,86^{**}$	$97,64 \pm 0,44$
Apoptose inicial	$2,02 \pm 0,18$	$18,73 \pm 2,16^{**}$	$1,31 \pm 0,34$
Apoptose tardia	$0,76 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,61$	$0,58 \pm 0,10$
Necrose	$0,44 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,02^{**}$	$0,46 \pm 0,09$

Os animais do grupo SILDENAFIL não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os animais controle (C57), indicando que o tratamento com o sildenafil pode impedir que as células dos animais dislipidêmicos iniciem o processo de apoptose. A figura 9 mostra a distribuição típica das células em cada condição experimental.

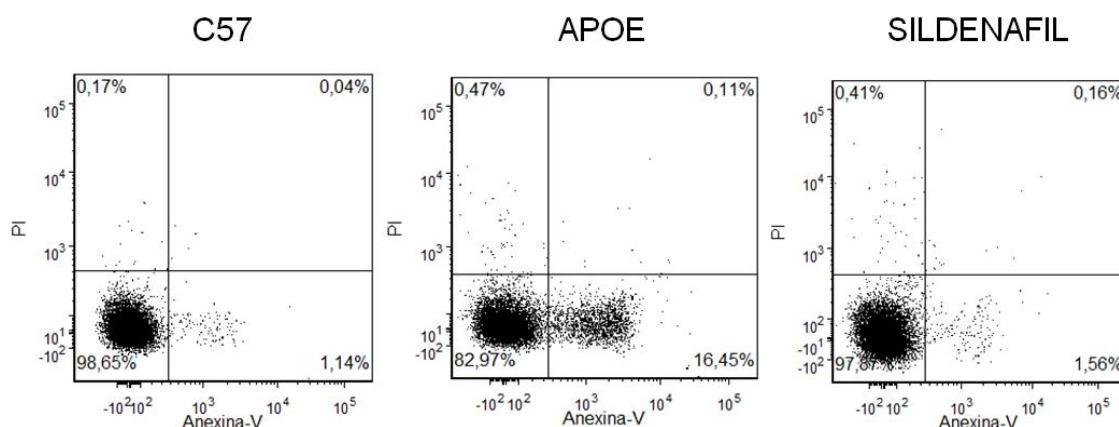


Figura 9: Gráfico tipo *dot plot* típico das marcações das células para apoptose. Cada painel representa o padrão de marcação referente a uma replicata biológica de cada grupo. A marcação negativa para anexina V e PI representa as células viáveis; marcação positiva para anexina V representa as células em apoptose inicial; marcação positiva para PI, necrose; e marcação positiva para anexina V e PI, apoptose tardia.

5.4 Validação do fracionamento subcelular por *Western Blot*

Anteriormente a análise do proteoma mitocondrial das células do fígado dos camundongos, a efetividade do processo de enriquecimento das mitocôndrias foi avaliado. A qualidade das amostras - extratos proteicos obtidos das mitocôndrias - foi avaliada pela imuno-deteção por *western blot* da GAPDH (enzima exclusivamente citosólica) e da Cox-IV (proteína exclusivamente mitocondrial).

O painel a esquerda da figura 10 mostra que, houve o reconhecimento da Cox-IV apenas nas amostras correspondentes as mitocôndrias (raia M), indicando que não houve perda das organelas durante o processo de enriquecimento, já que não houve o mesmo reconhecimento nas amostras correspondentes ao conteúdo citoplasmático (raia C). De maneira complementar, o painel a direita da figura 10, mostra que houve o reconhecimento da GAPDH apenas nas amostras correspondentes ao conteúdo citoplasmático (raia C). Portanto, o protocolo de

fracionamento subcelular descrito no item 4.3.5, foi considerado satisfatório para a análise proteômica.

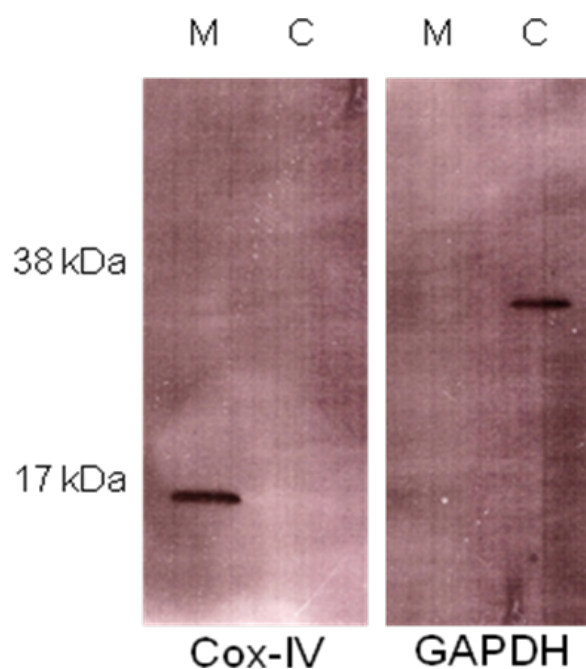


Figura 10: Validação do enriquecimento de mitocôndrias por *Western Blot*. Foram utilizados 15 μ g de cada amostra (M = mitocondrial e C = citosólica) para a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas separadamente com anticorpos *house-keeping*, para cada subfração celular (Cox-IV para fração mitocondrial e GAPDH para fração citosólica).

5.5 Análise comparativa dos géis bidimensionais

De maneira preliminar, as proteínas extraídas após o enriquecimento mitocondrial, foram submetidas à separação por eletroforese bidimensional em sistema de mini-gel com *strips* de 7cm e gradiente de pH não-linear entre 3 e 10. Esta etapa teve como finalidade a padronização das condições experimentais posteriormente utilizadas, bem como a verificação da homogeneidade das

amostras dentro de cada grupo. Os resultados mostraram alta homogeneidade entre as amostras dentro do mesmo grupo além de alta reprodutibilidade do protocolo da 2DE estabelecido (dados não apresentados).

Para a análise proteômica diferencial entre os grupos experimentais, foram obtidos 10 géis de 11x11cm: 2 géis do grupo C57, 4 géis do grupo APOE e 4 géis do grupo SILDENAFIL, correspondendo às replicatas biológicas. O grupo C57 foi analisado com 2 géis em função de uma situação fortuita, onde os outros 2 géis do grupo, foram descartados após uma extensa ruptura mecânica, inviabilizando as suas digitalizações. Assim, considerando a alta homogeneidade observada na etapa prévia e também a alta correlação entre os perfis dos 2 géis digitalizados (0,991), foi possível assumir a reprodução fiel de cada gel com uma replicata técnica.

Alíquotas de 320 µg foram eletrofocalizadas e em seguida resolvidas em gel SDS-PAGE 12,5%. A análise dos géis pelo software *Image Master 2D Platinum* v7.05, detectou em média 304 *spots* proteicos no grupo C57, 175 no grupo APOE e 118 no grupo SILDENAFIL. A figura 11 mostra as imagens digitalizadas. O gel com maior número de *spots* foi considerado o gel *master*, o qual teve o seu perfil utilizado como padrão de comparação com os demais perfis do grupo analisado. Em função das diversas etapas de processamento das amostras, o cálculo do coeficiente de correlação entre cada gel é importante para garantir a homogeneidade do grupo em análise sendo que, quanto mais próximo de 1, maiores são as semelhanças entre as imagens. As equações da regressão linear correlacionando os *spots* estão na tabela 3.

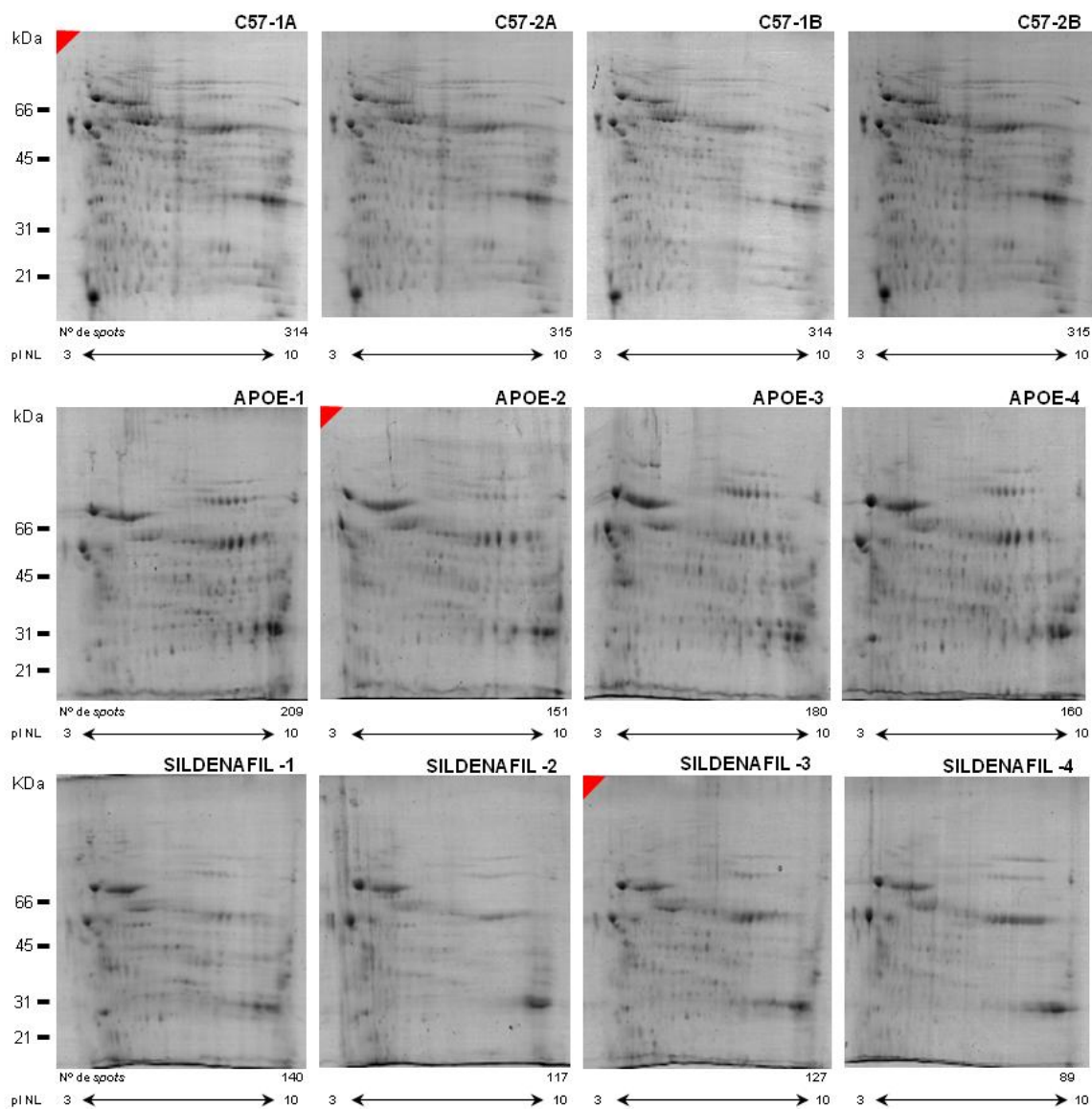


Figura 11: Perfil proteico da fração enriquecida com mitocôndrias a partir das células do fígado de camundongos. Aliquotas de 320 µg de proteínas solúveis foram focalizadas em *IPG strip* pH não linear de 3-10 de 11 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12%. Os valores posicionados a esquerda das imagens representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão. O triângulo vermelho indica a imagem utilizada como referência (gel *master*).

Tabela 3: Análise da reprodutibilidade das imagens dos géis intragrupos. As imagens dos géis foram relacionadas com a imagem de referência (gel *master*) de cada grupo.

Relação entre os géis	Equação	Coef. de correlação
C57-1 x C57-2	$y = 0,99x - 0,011$	0,991
APOE-2 x APOE-1	$y = 0,753x + 0,198$	0,933
APOE-2 x APOE-3	$y = 0,71x + 0,456$	0,931
APOE-2 x APOE-4	$y = 1,2x - 0,556$	0,953
SILDENAFIL-3 X SILDENAFIL-1	$y = 0,595x + 0,267$	0,910
SILDENAFIL-3 X SILDENAFIL-2	$y = 1,06x + 0,103$	0,895
SILDENAFIL-3 X SILDENAFIL-4	$y = 0,923x + 0,136$	0,895

A análise de fatores foi utilizada como ferramenta para a delimitação dos grupos a partir das imagens obtidas dos géis. Nesta figura, os géis são representados pelos vetores em azul e os *matches* são representados pelas cruzes vermelhas. A proximidade entre os vetores indica que estes, provavelmente, pertencem ao mesmo grupo ou população. A distância entre vetores e, principalmente, seu posicionamento em quadrantes distintos, indica maior probabilidade de diferença entre esses vetores (géis). Como mostra a figura 12, as linhas representativas dos géis das amostras do grupo APOE (correspondentes aos vetores V) encontram-se em um quadrante diferente dos vetores dos grupos C57 (vetores C) e SILDENAFIL (vetores T). A disposição dos vetores indica que, o tratamento com sildenafil pode contribuir para um padrão de expressão/produção de proteínas mitocondriais semelhante ao perfil encontrado para os animais do grupo controle.

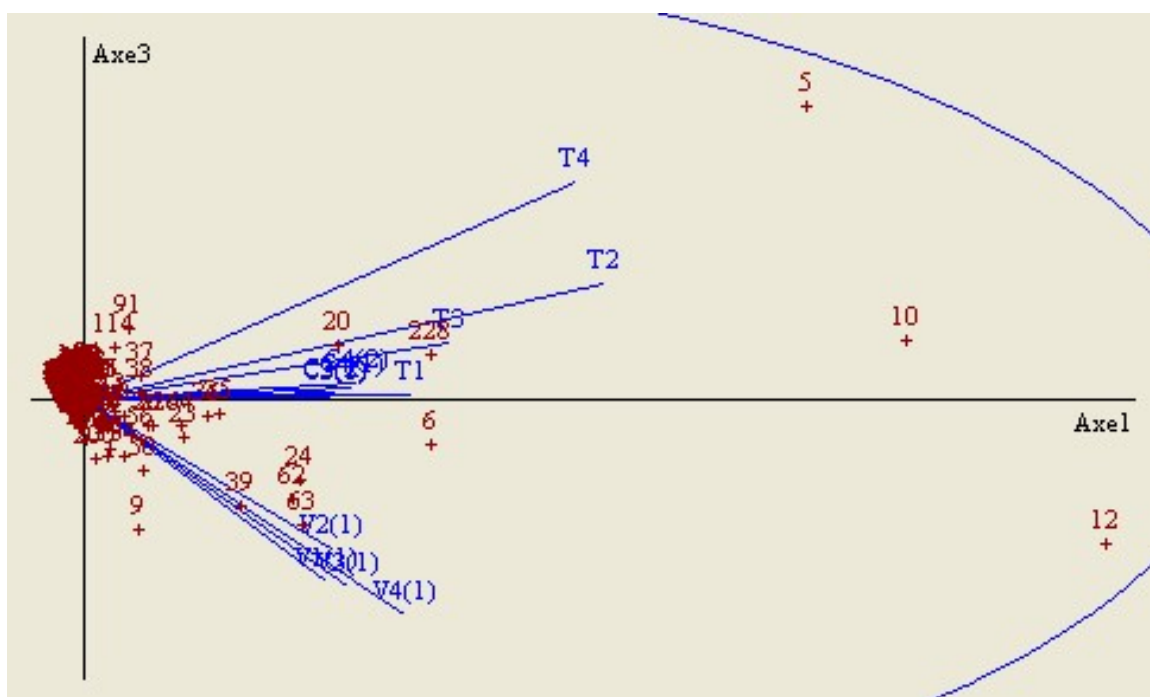


Figura 12: Análise de fatores. Gráfico de projeção dos géis analisados para delimitação dos grupos experimentais. Os vetores C, V e T representam respectivamente os grupos C57, APOE e SILDENAFIL.

5.6 Identificação das proteínas

Para a análise proteômica comparativa entre os grupos foram considerados os seguintes critérios para a análise da diferença na intensidade relativa de um *spot*: detecção de forma consistente em todos os grupos, em todas as replicadas experimentais de cada grupo e diferença estatística ($p \leq 0,05$) na comparação das médias dos volumes dos *spots* em ao menos 2 grupos. Utilizando esses critérios, foram detectados diferenças de intensidade em 30 *spots*, os quais foram extraídos dos géis e processados para identificação por espectrometria de massa. Adicionalmente, foram retirados e processados 7 *spots* proteicos de alta

intensidade visualizados apenas do grupo C57, e 1 *spot* presente apenas nos grupos C57 e SILDENAFIL, totalizando 38 análises de massa.

Dentre os 30 *spots* com diferenças entre os grupos, a análise de massa em sistema MALDI-TOF/TOF revelou a identidade de 24 *spots* gerando um total de 11 proteínas distintas, já que em alguns casos, a mesma proteína foi identificada em mais de um *spot*. Seis *spots* não obtiveram resultado em função da quantidade de material ser insuficiente para detecção. Além disso, dos 7 *spots* exclusivos do grupo C57, 5 proteínas distintas foram identificadas. Para o *spot* presente apenas nos grupos C57 e SILDENAFIL, uma proteína foi encontrada. Em nenhum caso, mais de uma proteína foi identificada no mesmo *spot*. Aleatoriamente, 3 *spots* proteicos de cada grupo foram retirados e analisados separadamente a fim de confirmar a análise de correspondência (*match*) realizada no *software* de análise das imagens, os quais foram identificados para as mesmas proteínas, dando maior consistência para os *matches* entre os géis.

A combinação dos espectros de massa resultantes (MS e MS/MS) foi utilizada na identificação das proteínas, por meio de busca no banco de dados do NCBIInr pelo software MASCOT[®]. As informações obtidas foram cruzadas com o banco de dados UniProt. A figura 13 mostra o mapa bidimensional dos *spots* identificados com seus respectivos números de identificação. Para os *spots* com intensidade significativamente diferentes entre os grupos foram identificadas: albumina (*spots* 2 e 3), anexina (30), arginase (21, 22), calreticulina (10), catalase (17, 18), dissulfeto isomerase (11, 12, 15, 16, 23), proteína de choque A5 - HSP A5 (1), transferrina (4, 6, 7, 8, 9), urato oxidase (26, 27, 28) e *vitamin D binding - VDBP*. (13, 14). As proteínas encontradas exclusivamente no grupo C57 foram: beta-actina (19, 20), glicogênio fosforilase (5), *major urinary protein 17 - MUP 17* (31), *major urinary protein 21 - MUP 21* (29) e regucalcina (24, 25). A proteína identificada apenas nos grupos C57 e SILDENAFIL foi identificada como catepsina B (32). As tabelas 4 e 5 reúnem informação das proteínas identificadas.

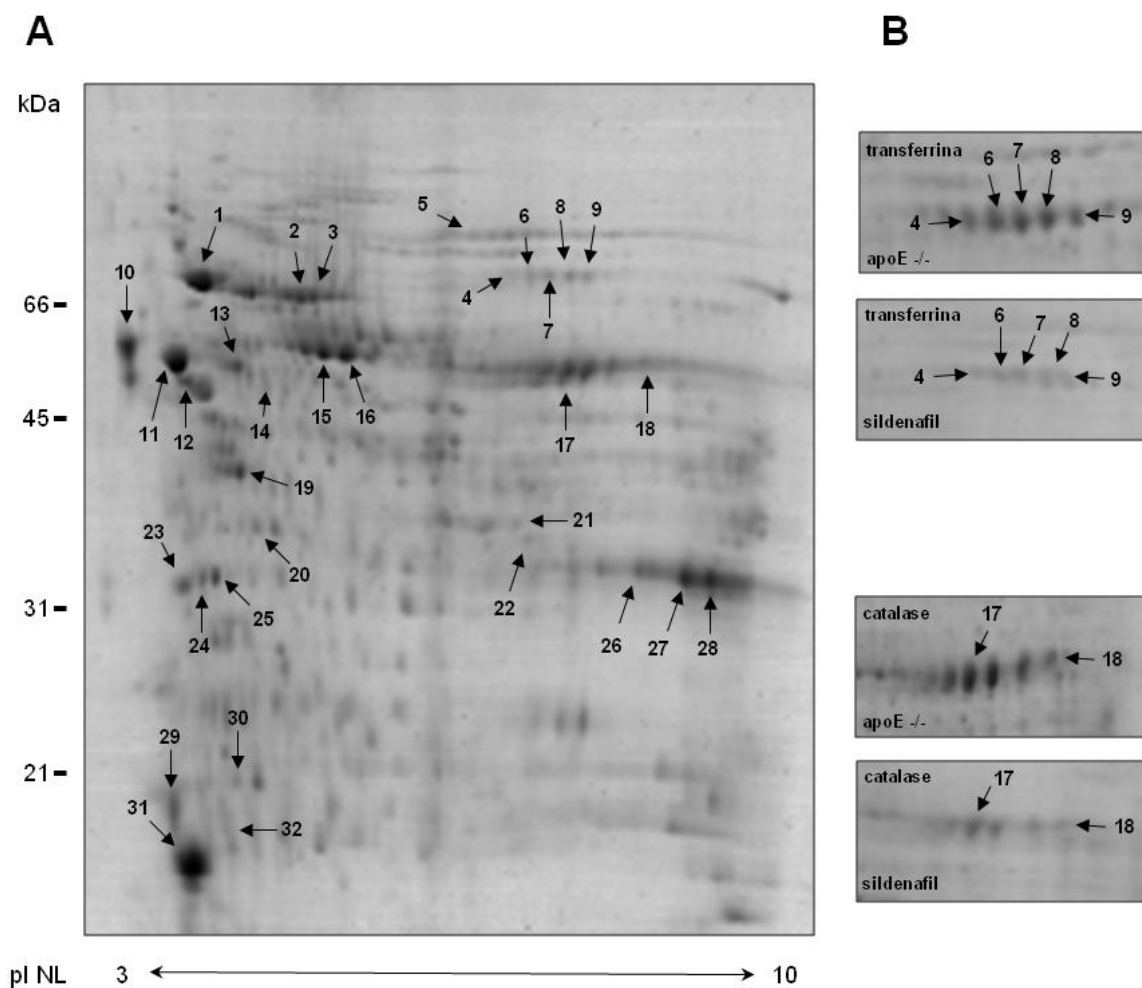


Figura 13. Gel bidimensional típico. (A) Mapa bidimensional representativo do perfil das expressas pelos camundongos do grupo C57 nas amostras enriquecidas com mitocôndrias. (B) Magnitude das expressão diferencial da transferrina e da catalase entre os grupos APOE e SILDENAFIL.

Tabela 4: Identidade dos spots proteicos expressos nos grupos experimentais, por MS e MS/MS. Homologia com a taxonomia *Mus musculus*.

Spot I.D.	Sequência de Peptídeos Identificada	Proteína	Nº do acesso	% de cobertura	Score	pl (teórico)	MM Da (teórica)
1	FEELNMDLFR SDIDEIVLVGGSTR AKFEELNMDLFR ITPSYVAFTPEGER KSDIDEIVLVGGSTR IINEPTAAAIAYGLDKR VTHAVVTPAYFNDAQR DNHLLGTFDLTGIPPAPR KVTHAVVTPAYFNDAQR IEIESFFEGEDFSETLTR	HSPA5 <i>Heat Shock Protein A5</i>	CAA05361.1	17	1255	5,1	72547
2, 3	HPDYSVSLLLR APQVSTPTLVEAAR RHPDYSVSLLLR LGEYGFQNAIVR DVFLGTFLYEYSR LPCVEDYLSAILNR RPCFSALTVDETYVPK ENPTTFMGHYLHEVAR + Oxidação (M) AADKDTCFSTEGPNLVTR	Albumina	NP_033784.2	19	917	5,75	70700
4, 6, 7, 8, 9	WCALSHLER LYLGHNYVTAIR KPVVDQYEDCYLAR DFASCHLAQAPNHVVSR	Transferrina	AAH08559.1	8	332	6,38	70928
5	DYYFALAHTVR LHSFVSDDIFLR	Glicogênio Fosforilase	AAG00588.1	2	152	6,63	97825

10	<p>LFPGLDQK VHVIFNYK KVHVIFNYK GQTLVVQFTVK EQFLDGDWNTNR HEQNIDCGGGYVK IKDPDAAKPEDWDER IDNSQVESGSLEDDWDFLPPKK CKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVK</p>	Calreticulina	NP_031617.1	27	730	4,33	48136
11, 12, 15, 16, 23	<p>FFPASADR VDATEESDLAQQYGVR QFLLAEEAIDDIPFGITSNSGVFSK TGPAATTLSDTAAAESLVSSEVTVIGFFK</p>	Dissulfeto Isomerase	BAE24642.1	15	441	4,77	57419
13, 14	VPTANLENVLPLAEDFTEILSR	<i>VDBP</i> Vitamin D binding Protein	NP_032122.1	4	160	5,37	53725
17, 18	<p>LFAYPDTHR LAQEDPDYGLR NFTDVHPDYGAR FNSANEDNVTQVR DAILFPSFIHSQK GAGAFGYFEVTHDITR LGPNYLQIPVNCYPYR GPLLVQDVVFTDEMAHFDR FYTEDGNWDLVGNNTPIFFIR</p>	Catalase	NP_033934.2	24	918	8,1	60043
19, 20	<p>AVFPSIVGR SYELPDGQVITIGNER IWHHTFYNELR</p>	Beta-actina	NP_031824.1	2	53	5,78	39446
21, 22	<p>DIVYIGLR TGLLSGLDIMEVNPTLGK + Oxidação (M) STVNTAVALTLACFGTQR VSVVLGGDHSLAVGSISGHAR DHGDLAFVDVPNDSSSQIVK</p>	Arginase	NP_031508.1	26	319	6,51	34957

24, 25	DGLNAEGLLR LWVACYNGGR WDTVSNQVQR VAVDAPVSSVALR HQGSLYSLFPDHSVK	Regucalcina	BAE27192.1	19	318	5,27	33896
26, 27, 28	DVDFEAIWGAVR RDVDFEAIWGAVR NIETFAMNICEHFLSSFNVHTR + Oxidação (M)	Urato Oxidase	EDL11965.1	17	289	8,74	23554
29	ENIIDLTNVNR NFNVEQISGYWFSIAEASDER NFNVEQISGYWFSIAEASDEREK	MUP 21 <i>Major Urinary Protein 21</i>	EDL31162.1	18	406	4,49	21389
30	SEIDLFNIR GTVTDFPGFDGR	Anexina 5	AAH03716.1	6	136	4,83	35773
31	FAQLCEEHGILR DGETFQLMGLYGR DGETFQLMGLYGR + Oxidação (M) INGEWHTIILASDKR TDYDNFLMAHLINEK + Oxidação (M) LFLEQIHVLENSLVK AGEYSVTYDGFNTFTIPK	MUP 17 <i>Major Urinary Protein 17</i>	DAA06311.1	50	631	4,89	20651
32	GENHCGIESEIVAGIPR	Catepsina B	NP_031824.1	5	72	5,57	38168

Tabela 5: Dados das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos C57, APOE e SILDENAFIL.

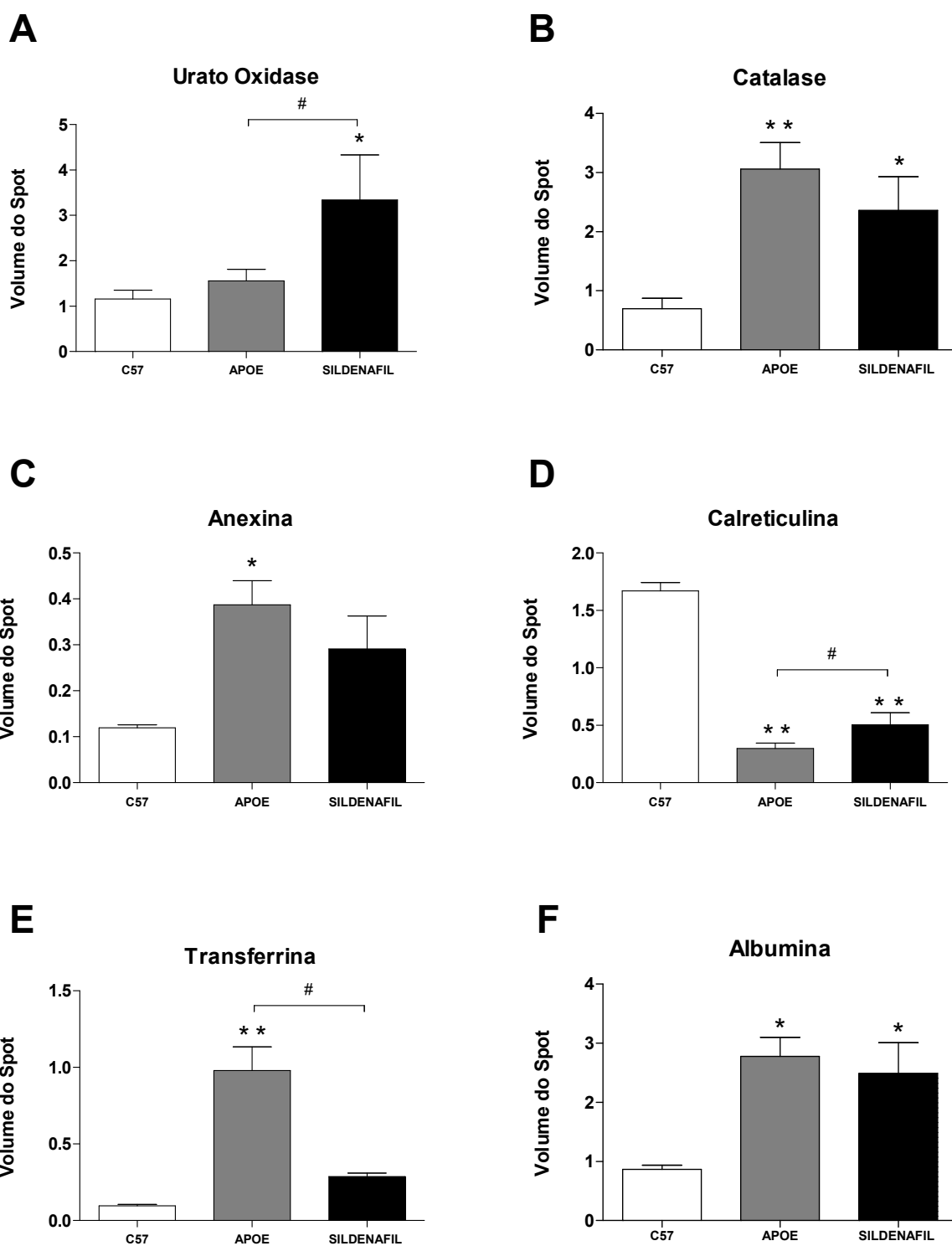
Spot I.D.	Proteína	C57 x APOE (%)	APOE x TRAT (%)	Processo Biológico	Função Molecular	Localização Principal
1	HSP A5 <i>Heat Shock Protein A5</i>	+39,4	+27,2	Regulação negativa de apoptose	Dobramento proteico	Mitocôndria; Reticulo endoplasmático
2, 3	Albumina	+220,1	-10,4	Manutenção da localização celular da mitocôndria	<i>Binding</i> molecular	Secretada
4, 6, 7, 8, 9	Transferrina	+914,3	-70,7	Regulação positiva de fosforilação	Ligação / Transporte	Secretada
5	Glicogênio fosforilase	<i>exclusivo C57</i>		Metabolismo do glicogênio	Catálise	Citosol
10	Calreticulina	-83,2	+96,9	Senescência celular	Chaperona	Mitocôndria; Reticulo endoplasmático
11, 12, 15, 16, 23	Dissulfeto Isomerase	-14,9	+54,5	Homeostase redox	Chaperona	Reticulo endoplasmático
13, 14	VDBP <i>Vitamin D binding Protein</i>	+46,9	+89,5	Metabolismo da vitamina D	Transporte / armazenamento	Secretada

17, 18	Catalase	+339,4	-22,9	Catabolismo do H ₂ O ₂ Resposta ao estresse oxidativo	Oxirredutase	Mitocôndria; Peroxisomo
19, 20	Beta-actina	<i>exclusivo C57</i>		Organização de membrana Agregação plaquetária	ATP binding NO sintase binding	Citoesqueleto
21, 22	Arginase	+208,1	+9,1	Resposta ao peróxido de hidrogênio Ciclo na uréia	Catálise	Membrana externa mitocondrial; Citosol
24, 25	Regucalcina	<i>exclusivo C57</i>		Senescência celular Regulação negativa de apoptose Homeostase de Cálcio	Catálise	Mitocôndria; Citosol
26, 27, 28	Urato Oxidase	+48,6	+93,8	Oxidação do ácido úrico	Oxirredutase	Peroxisomos
29	MUP 21 <i>Major Urinary Protein 21</i>	<i>exclusivo C57</i>		Estabilização de feromônios	Transporte	Secretada
30	Anexina 5	+224,5	-24,80	Regulação negativa da coagulação	Anticoagulante	Membrana plasmática
31	MUP 17 <i>Major Urinary Protein 17</i>	<i>exclusivo C57</i>		Estabilização de feromônios	Transporte	Secretada
32	Catepsina B	<i>não identificada no grupo APOE</i>		Proteólise	Catálise	Lisossomo

Após a identificação, os *spots* referentes as mesmas proteínas tiveram os volumes somados com a finalidade de se obter o real quantitativo. Os animais do grupo APOE (espontaneamente dislipidêmicos), apresentaram aumento significativo na intensidade relativa a 5 proteínas: catalase (339,4%), anexina (224,5%), transferrina (914,3%), albumina (220,1%) e arginase (208,1%). Por outro lado, foi evidenciada a redução de 83,2% no *spot* referente à calreticulina. Vale ressaltar que o *spot* referente à catepsina B não foi identificado neste grupo, sugerindo que a dislipidemia impede a expressão desta proteína, ou ao menos reduz a expressão a níveis abaixo dos mínimos detectáveis pela metodologia empregada neste trabalho.

Após o tratamento com sildenafil, foi possível observar para os animais deste grupo, um aumento significativo da média do volume dos *spots* correspondentes à urato oxidase (93,8%), calreticulina (96,9%), HSP A5 (27,2%) e VDBP (89,5%), bem como a redução do *spot* da transferrina (-70,7%). É importante salientar que, mesmo sem diferença estatística, houve uma considerável redução para a catalase (-22,9%) e para a anexina (-24,8%), quando comparadas às médias do grupo APOE. Os dados acima descritos, são apresentados na tabela 5 e na figura 14.

As proteínas identificadas também foram analisadas no programa STRING, uma ferramenta de bioinformática usada para obter possíveis interações existentes proteína-proteína. Os resultados dessa análise são representados pela figura 15, a qual mostra a rede de interações das proteínas, agrupadas (clusterizadas) de acordo com suas classificações funcionais.



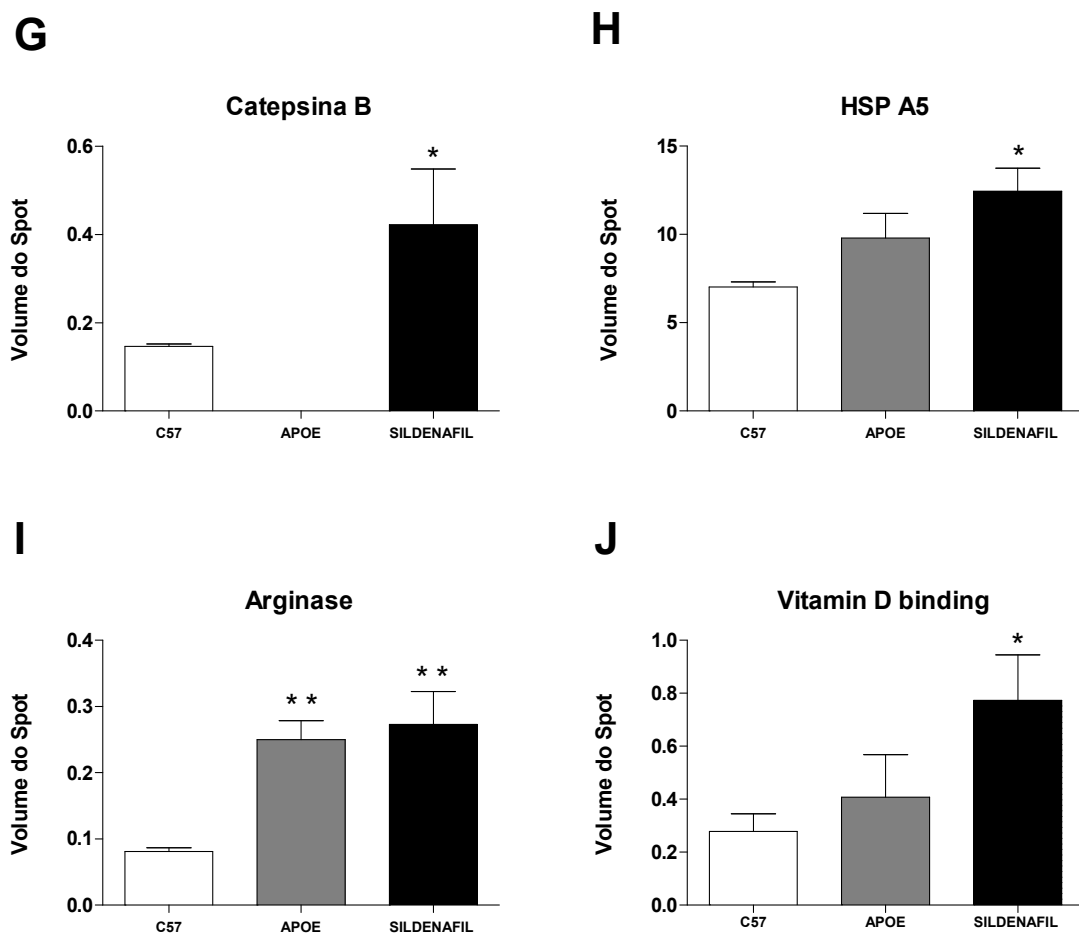


Figura 14: Perfil de intensidade dos spots proteicos. Os volumes de todos os spots identificados para a mesma proteína foram somados e as médias entre os grupos comparadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com o grupo C57 e # $p < 0,05$ comparado com o grupo APOE.

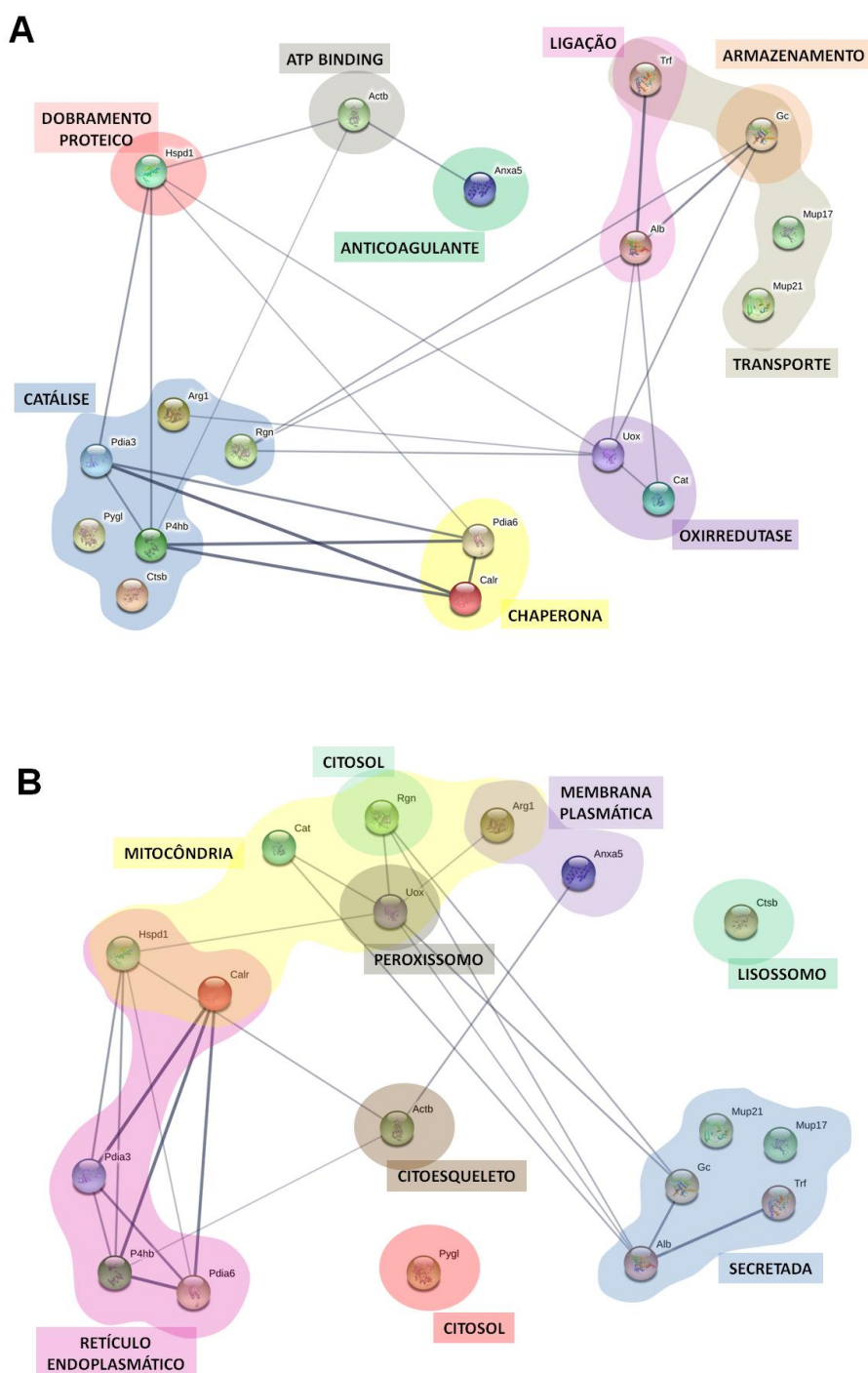


Figura 15: Rede de interação das proteínas identificadas. As proteínas foram categorizadas e agrupadas de acordo com sua função celular (A) e suas localização nos compartimentos subcelulares (B). As linhas finas representam apenas uma interação e as linhas grossas representam mais de uma interação. Rgn = regucalcina; Cat = catalase; Arg1 = arginase 1; Anxa5 = anexina A5; Uox = urato oxidase; Ctsb = catepsina B; Calr = calreticulina; Hspd1 = HSPA5; Actb = beta-actina; Pda3 e Pda6 = dissulfeto isomerase A3 e A6; Alb = albumina; Trf = transferrina; Gc = *vitamin D binding protein*; Pygl = glicogênio fosforilase.

Discussão

6 DISCUSSÃO

As vantagens da utilização dos inibidores seletivos da fosfodiesterase 5 (PDE5) são bem conhecidas. Inicialmente no tratamento da disfunção erétil masculina e da hipertensão pulmonar, e nos últimos anos, novas abordagens farmacológicas foram descritas para essa classe de fármacos, como a utilização na hipertensão arterial sistêmica - principalmente para o sildenafil - o primeiro e o mais estudado inibidor desta enzima (Vasquez et al, 2016). O potencial dessa droga como antioxidante tem sido estudado pelo nosso grupo de pesquisa e, grande parte de nossos esforços, tem sido concentrado na compreensão dos mecanismos pelos quais este fármaco reestabelece o equilíbrio redox, ou previne o seu desbalanço.

Na busca pela elucidação dos mecanismos fisiológicos, é necessário considerar que mudanças fenotípicas podem ser correlacionadas com alterações no perfil proteico, e as abordagens proteômicas são consideradas poderosas ferramentas para avaliar alterações de forma global no remodelamento proteico, seja no contexto fisiológico ou patológico (Mitra et al, 2015; Cieniewski-Bernard et al, 2008). Assim, diversos trabalhos que utilizam técnicas proteômicas, buscam aprofundar o conhecimento sobre as alterações no conjunto de proteínas (proteomas) de duas formas principais: utilizando modelos animais que desenvolvem naturalmente alguma disfunção e/ou avaliando alterações proteicas no curso temporal da progressão de doenças (Silbiger et al, 2011; Cieniewski-Bernard et al, 2008).

Utilizados neste trabalho, os camundongos *knockout* para a apolipoproteína E, são extensamente empregados em ensaios experimentais como modelo animal que mimetiza as dislipidemias observadas para os humanos. Esta alteração metabólica é capaz de induzir, dentre outras coisas, uma severa disfunção mitocondrial, caracterizada pela extensa produção de espécies reativas de oxigênio (Paradies et al, 2014). Dessa forma, com o objetivo de identificar alterações no padrão de expressão de proteínas mitocondriais nas células do fígado dos camundongos apoE *knockout*, foi realizada análise proteômica comparativa por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa, entre os animais com, e sem o tratamento com sildenafil.

A presença das dislipidemias nos animais utilizados neste trabalho foi confirmada e caracterizada pela medida dos parâmetros lipídicos plasmáticos. De acordo com Bonomini e colaboradores, em 2010, a dislipidemia, principalmente alteração no VLDL, é tipicamente associada aos camundongos apoE *knockout* e de fato, isso foi confirmado por nossos resultados uma vez que foi evidenciado o aumento de aproximadamente 36 vezes nos níveis plasmáticos dessa lipoproteína. Também foi evidenciado um aumento nos níveis do LDL (14 vezes), o colesterol total (6 vezes) e os triglicerídeos (6 vezes), em comparação com os do grupo controle (tabela 1). Vale ressaltar que as alterações observadas no modelo utilizado, já estão bem estabelecidas e descritas na literatura - inclusive pelo nosso grupo de pesquisa (Leal et al, 2015; Balarini et al, 2013) validando, portanto, o modelo animal empregado.

Como descrito anteriormente, as dislipidemias apresentam repercussões patológicas em diversos órgãos e sistemas, e essas alterações plasmáticas estão intimamente relacionadas com o estresse oxidativo. Neste trabalho além das características dislipidêmicas, também foi evidenciado elevação da produção intracelular de ROS, nas células do fígado camundongos apoE *knockout*, evidenciando que o fígado destes animais está exposto a um grande estresse oxidativo.

A análise da produção de ROS pelas células do fígado dos camundongos espontaneamente dislipidêmicos mostrou um acentuado aumento intracelular do ânion superóxido, do peróxido de hidrogênio e do peroxinitrito (figura 8A, 8B e 8D respectivamente). O desequilíbrio entre a formação das espécies reativas de oxigênio e os sistemas antioxidantes celulares - desbalanço redox - caracteriza o estado de estresse oxidativo, sendo esta condição, extremamente prejudicial à célula (Paradies et al, 2014). De forma semelhante, Rodrigues e colaboradores em 2013 mostraram que, em camundongos apoE *knockout*, houve um aumento do ânion superóxido nas células mononucleares quando comparado com os animais controle, parâmetro este, também analisado por citometria de fluxo.

Não foram observadas alterações no perfil lipídico plasmático dos animais tratados com sildenafil ao compará-los com os animais sem tratamento. Estes resultados, em conjunto com os descritos em trabalhos anteriores (Rodrigues et al,

2013; Balarini et al, 2013; Dessault et al, 2009), sugerem que até onde se conhece, o sildenafil não é capaz de alterar os níveis dos lipídeos plasmáticos. Por outro lado, os camundongos que receberam o tratamento com sildenafil, apresentaram grande redução na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, indicando que o sildenafil é capaz de prevenir a produção de ROS ou reestabelecer o equilíbrio redox das células analisadas.

Em 2011, Suski e colaboradores descreveram algumas alterações no perfil proteico mitocondrial de células de fígado de camundongos apoE *knockout*, quando comparados com seus respectivos controles (camundongos da linhagem C57). Da mesma forma, foi possível observar em nosso trabalho uma mudança no padrão de expressão proteica mitocondrial das células do fígado dos camundongos apoE *knockout*, entretanto alguns dados podem ser considerados inéditos, uma vez que não foram descritos previamente.

Alguns trabalhos demonstram que ocorre um aumento da atividade da xantina oxidase (XO) no estado dislipidêmico, tanto em humanos quanto em animais (Berry et al, 2004; Janssen, 1993; Povia, 1984). A xantina oxidase - que está envolvida no metabolismo de nucleotídeos purínicos - é uma flavoenzima que contém um átomo de molibdênio e quatro centros ferro-enxofre em seu grupo prostético. Esta enzima catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina ($\text{hipoxantina} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{xantina} + \text{NADH}$) e sucessivamente a xantina em urato/ácido úrico ($\text{xantina} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 = \text{urato/ácido úrico} + \text{H}_2\text{O}_2$). Esta enzima possui dois domínios catalíticos podendo atuar tanto como desidrogenase como oxidase. Sabe-se que em condições fisiológicas essa enzima atua como desidrogenase (XDH), mas sobre determinados estímulos, (p. ex. hiperlipidemia, inflamação, hipóxia), a sua forma desidrogenase é alterada para a forma oxidase (Berry et al, 2004).

Em mamíferos, a XO é primariamente sintetizado no fígado, e o mecanismo de modificação da xantina desidrogenase - induzida por lipídeos - pode ser de forma irreversível após proteólise ou reversível através de oxidação dos grupos sulfidril (Yamaguchi et al, 2007). O gene promotor da XO é ativado por citocinas inflamatórias (Chow et al, 1994; Terao et al, 1992), as quais podem ser estimuladas pelo processo inflamatório hepático induzido pela dieta *western type* (esteatose hepática não-alcoolica) (Ludwig et al, 1997). Assim, é tentador especular que a dieta

western type desencadeou o processo inflamatório hepático, com subsequente transcrição da XO, todavia, é necessário considerar que a inflamação é também um processo intimamente relacionado com o estresse oxidativo (Schröder et al, 2006), sendo esta condição, capaz de promover a conversão da XDH para XO, o que pode contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio.

Numa condição em que a atividade da XO está aumentada, há por consequência o aumento da produção de ácido úrico (AU) que, apesar de ainda ser controverso, tem sido sugerido possuir uma ação pró-oxidante. Entretanto, inicialmente acreditava-se que o AU possuía ação antioxidante baseada em sua reação com o peroxinitrito atuando, portanto, como ROS *scavenger*. Entretanto, essa reação pode dar origem ao aminocarbonil, um composto altamente reativo e citotóxico, (Santos et al, 1999), o qual apresenta alta capacidade de oxidação de lipídeos, principalmente fosfolipídeos de membrana e das LDLs. A ação pró-oxidante do AU também tem sido relacionada com sua capacidade de aumentar a atividade da NADPH oxidase (Sautin e Johnson, 2008), o que pode explicar, ao menos em parte, o aumento intracelular das espécies reativas de oxigênio nas análises realizadas nesse trabalho.

Além da reação com peroxinitrito, o ácido úrico também pode ser degradado pela urato oxidase (Uox), enzima presente em grande parte dos mamíferos mas não em humanos. A atividade desta enzima pode ser considerada antioxidante, uma vez que a degradação do AU pela Uox impede os efeitos pró-oxidantes descritos acima ao dar origem a um composto de baixa reatividade e alta solubilidade, a alantoína (Sautin e Johnson, 2008; Santos et al, 1999).

Interessantemente, em nossa análise proteômica, foi observado *up-regulation* da Uox nos camundongos apoE *knockout* tratados com sildenafil, quando comparados com os animais do grupo sem tratamento (grupo APOE, figura 13A). Esse achado pode sugerir a capacidade do sildenafil em reduzir os níveis intracelulares de ROS, pode estar relacionado com o aumento da expressão da Uox, apresentando portanto, ação antioxidante (figura 16). Além disto, como descrito por Balarini e colaboradores (2013), a diminuição do estresse oxidativo induzido pelo tratamento com sildenafil, pode ser associado ao aumento da biodisponibilidade intracelular do cGMP - devido à inibição da PDE5 - levando a uma redução da

atividade da NADPH oxidase, diminuindo portanto os níveis do ânion superóxido. Dessa forma, a redução dos níveis intracelulares de ROS observadas pela citometria de fluxo neste trabalho (figura 8), pode se relacionar com o tratamento com sildenafil tanto via redução da atividade de NADPH oxidase, quanto pela indução da expressão da urato oxidase.

Classicamente, a urato oxidase é encontrada nos peroxissomos (figura 15), a presença desta enzima nas amostras mitocondriais usadas neste trabalho, pode ser justificada considerando que o protocolo de usado foi de enriquecimento de uma fração (mitocondrial), e é esperado que a amostra enriquecida contenha contaminantes de outros compartimentos subcelulares, o que também já foi encontrado por Dimauro et al, 2012.

Após as etapas de enriquecimento, foi possível evidenciar pela análise por *western blot*, que as amostras eram majoritariamente compostas por mitocôndrias e livres de contaminação, ao menos em grande escala, de moléculas de origem citoplasmática (figura 10), sendo esse protocolo portanto, considerado satisfatório e usado para as análises do proteoma mitocondrial.

Além das enzimas descritas acima que podem estar associadas com o estresse oxidativo, nossa análise comparativa do proteoma mitocondrial também revelou que, os animais do grupo APOE apresentaram intensidade dos *spots* referentes a enzima catalase, 3 vezes maior quando comparados com os animais do grupo C57 (figura 13B, tabela 4). Esses resultados estão em acordo com Rindler e colaboradores (2013), que observaram em mitocôndrias de cardiomiócitos de camundongos, aumento da expressão e atividade da catalase, 24h após os animais se alimentarem com a dieta *western type*, padrão este que permaneceu por 30 semanas (mesmo período de oferta da dieta). Os autores concluíram que o aumento da catalase foi uma resposta antioxidante aos altos níveis de H_2O_2 após a ingestão de lipídeos da dieta, já que a catalase degrada o peróxido de hidrogênio em $H_2O + O_2$. De forma similar, no presente trabalho foi evidenciado aumento da catalase nos camundongos que receberam oferta da dieta *western type* por 10 semanas (da 8ª a 18ª semana de vida para os grupos APOE e SILDENAFIL), aumento este, que pode ser sugerido como uma tentativa de retornar o equilíbrio redox, uma vez que houve aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular. Este dado e a hipótese

vão ao encontro aos resultados observados para as células do fígado pelas análises por citometria de fluxo (figura 8B).

No grupo de animais que receberam o tratamento com sildenafil (grupo SILDENAFIL), a análise proteômica mostrou que houve redução na intensidade dos *spots* referentes a catalase em aproximadamente 23% em comparação ao grupo APOE (figura 8B, tabela 4). Considerando que o sildenafil induz aumento da expressão urato oxidase e provavelmente, reduz a formação de ROS ao degradar o ácido úrico e, que ao elevar os níveis de cGMP, pode levar a uma redução da atividade de NADPH oxidase e assim reduzir os níveis de $\bullet\text{O}_2^-$, a redução da expressão da catalase é um resultado esperado, uma vez que o tratamento foi capaz de reduzir os níveis das ROS, logo do seu substrato, o H_2O_2 .

O peróxido de hidrogênio apesar de não ser um radical livre, apresenta alta capacidade reativa, podendo ser deletério aos sistemas biológicos de diversas maneiras (Rindler et al, 2013). Por exemplo, a reação de Fenton (Fe^{2+} a Fe^{3+}) converte o H_2O_2 em radical hidroxila ($\bullet\text{OH}^{\cdot}$), podendo causar danos estruturais no DNA, em lipídeos e em proteínas. O H_2O_2 também é substrato para a enzima mieloperoxidase, dando origem a uma molécula altamente reativa, o ácido hipocloroso (Hazen e Heinecke, 1997), todavia, em níveis considerados baixos, o peróxido de hidrogênio apresenta funções fisiológicas relevantes como a sinalização celular (Salmeen et al, 2003) e efeito proliferativo (Loo et al, 2011).

O consumo de H_2O_2 pelas enzimas glutathiona peroxidase, peroxirredoxina e catalase, devem ser pronta e seletivamente reguladas a fim de limitar os efeitos nocivos do peróxido de hidrogênio e permitir seus efeitos fisiológicos (Rindler et al, 2013). Diferentemente ao observado para glutathiona peroxidase e peroxirredoxina, a baixa afinidade da catalase pelo H_2O_2 , pode embasar a sua indução em situações específicas como a dieta rica em lipídeos (Manta et al, 2009). Essa diferença faz da catalase a enzima ideal para o consumo do H_2O_2 quando este é encontrado em níveis considerados tóxicos, permitindo às outras duas enzimas a regulação em condições fisiológicas (Rindler et al, 2013). Essas informações estão em acordo com cenário observado nesse trabalho, onde foi possível detectar níveis elevados de peróxido de hidrogênio intracelular (figura 8B) e aumento da expressão da catalase (figura 13B).

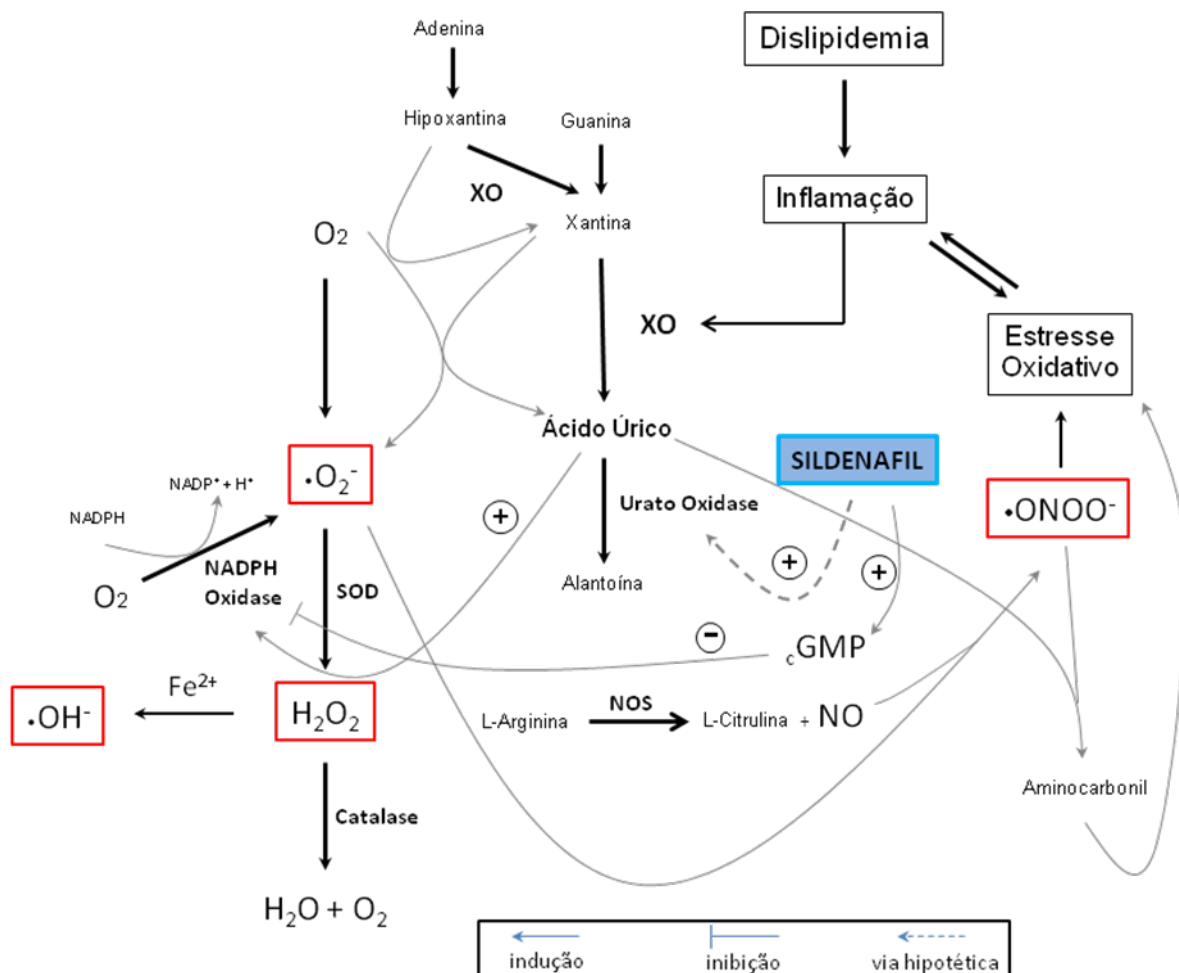


Figura 16: Vias de formação de ROS e a participação do sildenafil. Após o tratamento com sildenafil, houve aumento da expressão da urato oxidase, enzima que degrada o ácido úrico em alantoína, composto de baixa reatividade, apresentando possivelmente efeito antioxidante.

Como já mencionado, neste contexto oxidativo as ROS são capazes de gerar diversos efeitos nocivos à célula, como o dano ao DNA. Em 2013, Rodrigues e colaboradores mostraram que, camundongos apoE *knockout* apresentaram extensivo aumento na fragmentação do DNA tanto de células mononucleares quando em células do fígado, dano este, associado ao aumento da produção de ROS. Dessa forma, ao considerar que o aumento da produção de ROS é associado à fragmentação do DNA, e este dano é vinculado como um dos principais fenômenos desencadeadores da apoptose (Hengartner, 2000), é possível compreender os resultados apresentados na tabela 1, os quais mostram um elevado número de células em apoptose.

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas maneiras diferentes: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), e esta interação é capaz de ativar uma via de sinalização onde diversas proteínas-chave participam: a via das caspases (Budihardjo et al, 1999). A via intrínseca é ativada por situações de estresse intracelular como a privação de fatores de crescimento, hipóxia, ativação de oncogenes, danos ao DNA e aumento de ROS, este último fator evidenciado no presente trabalho (figura 8). Estes diversos sinais que são desencadeados pelas mais variadas condições, convergem para a mitocôndria (Hengartner, 2000).

Quando sinais de morte celular alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água presente no espaço entre as membranas é internalizada para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma (Desagher e Martinou, 2000). Além disso, o colapso do $\Delta\psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (Kroemer e Reed, 2000), o que leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$ (Green e Kroemer, 2004).

A partir do início do processo de apoptose intrínseca, onde ocorrem mudanças estruturais e funcionais das membranas da mitocôndria, há a exposição de fosfolípídeos carregados negativamente, principalmente a fosfatidilserina. Esse processo deixa essas moléculas susceptíveis à interação com proteínas que são atraídas por essas regiões carregadas negativamente, as anexinas (Degrelle et al, 2017). As anexinas fazem parte de uma família de proteínas solúveis compostas por 12 isoformas, e como citado, tem como característica principal a sua ligação a regiões da membrana celular que estão carregadas negativamente, numa maneira dependente de Ca^{2+} (Gerke e Moss, 2002).

Também observamos modulação no *spot* referente a anexina A5 no grupo APOE, que também apresentou elevação no número de células em apoptose (tabela 2). O aumento da anexina A5 pode ser explicado em função do provável aumento da oferta de regiões carregadas negativamente expostas no processo apoptótico, e dessa forma, maior formação de complexos com a anexina A5. Essa hipótese ganha consistência considerando que o tratamento com sildenafil, leva a diminuição do estresse oxidativo pelas razões já abordadas e também há diminuição de células em apoptose quando comparado com o grupo APOE (tabela 2). Assim, com a menor oferta de sítios de ligação para a anexina A5, menor é a formação dos complexos com as regiões negativas e, conforme observado nos resultados deste trabalho, menor foi a detecção da anexina A5 no grupo SILDENAFIL (figura 13C). Essa redução, ainda que não significativa em termos estatísticos, mostra uma tendência de reestruturação da composição mitocondrial das células do fígado após o tratamento, sendo portanto, um dado com relevância fisiológica.

Foi também observado neste trabalho, um padrão distinto de expressão entre os grupos experimentais de duas proteínas, envolvidas na regulação intracelular de Ca^{2+} , a regucalcina e a calreticulina.

A regucalcina é extensamente produzida pelo fígado e pelo córtex renal de ratos, e sua transcrição é estimulada pelo aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} (Shimokawa e Yamaguchi, 1992). Sua localização já foi descrita para diversos compartimentos subcelulares, inclusive a mitocôndria (Yamaguchi et al, 2008). Como proteína reguladora da homeostase intracelular de Ca^{2+} , ela possui papel central no controle de algumas funções, como a inibição de proteínas quinases e fosfatases

indicando um papel regulatório na transdução de sinal intracelular (Koruta e Yamaguchi, 1998). Em 2005, Nakagawa e colaboradores descreveram para a regucalcina uma ação inibidora de apoptose em células dos rins de ratos. Os autores observaram que o aumento a expressão da regucalcina induziu o aumento da expressão do mRNA da Bcl-2, uma proteína inibidora de apoptose.

Neste trabalho a regucalcina foi encontrada apenas no grupo C57 (animais controle, tabela 4), sugerindo um *down-regulation* e/ou não expressão desta proteína nos grupos APOE e SILDENAFIL.

Este resultado está em consonância com a baixa porcentagem do estado apoptótico observada no grupo C57. Especular uma relação no grande número de células em apoptose no grupo APOE e a regucalcina não ter sido detectada para esses animais, seria cientificamente imprudente. De fato, análises mais detalhadas são necessárias para entender esse fenômeno, uma vez que o tratamento com sildenafil diminuiu o número de células em apoptose mas a regucalcina também não foi identificada nas mitocôndrias dos animais desse grupo.

A calreticulina é uma chaperona, primariamente produzida no retículo endoplasmático, a qual está envolvida com o armazenamento e a homeostase de Ca^{2+} . Embora seja comum assumir que a calreticulina é uma proteína exclusiva do retículo, tem sido encontrada em outros compartimentos subcelulares, como citosol (Labriola et al, 2010), núcleo (Holaska et al, 2001) e nas mitocôndrias (Zhang et al, 2014; Shan et al, 2014). Em ambos os trabalhos que descreveram a calreticulina na mitocôndria, os autores associaram o aumento da expressão dessa proteína com a disfunção mitocondrial observada nos experimentos realizados, via inibição da STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), uma molécula relacionada com a atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons e a permeabilidade das membranas mitocondriais (Szczepek et al, 2012).

Em nosso trabalho, os animais do grupo APOE, os quais apresentam aumento na produção de ROS, número de células em apoptose e possivelmente exista uma disfunção mitocondrial associada, apresentaram redução de mais de 80% na expressão da calreticulina, quando comparados com os animais do grupo C57 (tabela 4). Este resultado vai de encontro ao descrito por Zhang (2014) e Shan

(2014), ao relacionarem o aumento da expressão da calreticulina à disfunção mitocondrial. É necessário considerar que, os fenômenos observados pelos autores citados, foram descritos em mitocôndrias de cardiomiócitos de ratos e, apesar de se tratar da mesma proteína e organela, não é possível assumir os mesmos efeitos para tecidos diferentes e animais de espécies distintas. Assim os resultados, merecem mais investigações para se entender a participação dessa proteína no desenho experimental proposto nesse trabalho.

Dentre as diversas participações fundamentais que a mitocôndria possui nos processos fisiológicos, uma das mais importantes é o metabolismo do ferro, uma vez que nesta organela, ocorre a síntese dos grupamentos Fe-S (*iron-sulfur clusters*, ISCs) os quais são grupos prostéticos de várias proteínas (Dailey e Meissner, 2013). Os ISCs participam, por exemplo, da cadeia transportadora de elétrons como transportadores entre os complexos I, II e III (Rouault e Tong, 2008) e no ciclo do ácido cítrico como cofator enzimático (Mena et al, 2015).

Após a absorção intestinal do ferro na forma Fe^{2+} , o metal é em seguida transportado - em sua forma Fe^{3+} - no plasma pela transferrina, uma glicoproteína de aproximadamente 70 KDa, que é sintetizada e secretada principalmente pelo fígado (para uma revisão, consulte Grotto HZW, 2008). A internalização do ferro para as células ocorre após a ligação da transferrina com seus receptores de membrana (Tf-R) com subsequente endocitose do complexo Fe-Tf. Os íons Fe^{3+} podem ser difundidos do endossoma e incorporados à ferritina para um armazenamento seguro ou ser carregado para a mitocôndria através de alguns mecanismos (Mena et al 2015). Um dos principais é chamado de *kiss-and-run*, onde ocorre a direta interação do endossoma com a membrana mitocondrial e posterior liberação dos íons férricos para a organela (Sheftel et al., 2007).

Um recente trabalho publicado por Ke e colaboradores (2017), descreve que, em cultura de células, o aumento da oferta de ferro foi responsável pelo aumento do número de células em apoptose e também o aumento da produção de ROS. Os autores também evidenciaram que a oferta exacerbada do metal desencadeou a via intrínseca da apoptose, associada com uma disfunção mitocondrial. Além disso, em humanos, algumas condições clínicas são associadas às dislipidemias (condição característica dos camundongos apoE *knockout*): a esteatose hepática não

alcoólica, síndrome metabólica e hiperferritinemia. Esta tríade tem sido descrita como síndrome metabólica de sobrecarga de ferro (DIOS - *Dysmetabolic Iron Overload Syndrome*) (Dongiovanni et al, 2011).

No presente trabalho foi observada alteração significativa na expressão da transferrina no grupo APOE (nove vezes maior comparado com o grupo C57, tabela 4 e figura 13E). Considerando o descrito acima, nossos resultados - aumento da transferrina - vão ao encontro da literatura já que os camundongos apoE *knockout* apresentam uma dislipidemia bem estabelecida e esta é intimamente relacionada com a esteatose hepática não alcoólica e síndrome metabólica. Além disso, o aporte aumentado de ferro para a mitocôndria pode contribuir significativamente para a produção de ROS, por meio da reação de Fenton, a qual dá origem ao radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), altamente citotóxico.

O aumento da detecção da transferrina na amostras com enriquecimento mitocondrial, pode ser explicado pelo mecanismo de carregamento de ferro *kiss-and-run* (figura 17A), citado anteriormente, o qual ocorre uma interação direta do endossomo repleto de transferrina (Tf), com a mitocôndria.

Levando em consideração as informações descritas por Ke e colaboradores (2017) e as geradas no presente trabalho, podemos inferir que o aumento da transferrina nos animais do grupo APOE, pode estar relacionado com o aumento da produção de ROS e do número de células em apoptose neste grupo, por meio do possível aumento do aporte de Fe para as mitocôndria (figura 17B). Claramente, estudos voltados para o completo entendimento dos mecanismos de transporte intracelular de Ferro, bem como o envolvimento da transferrina no cenário dislipidêmico, são necessário para a elucidação dos mecanismos que envolvem os benefícios fisiológicos alcançados com o tratamento com sildenafil.

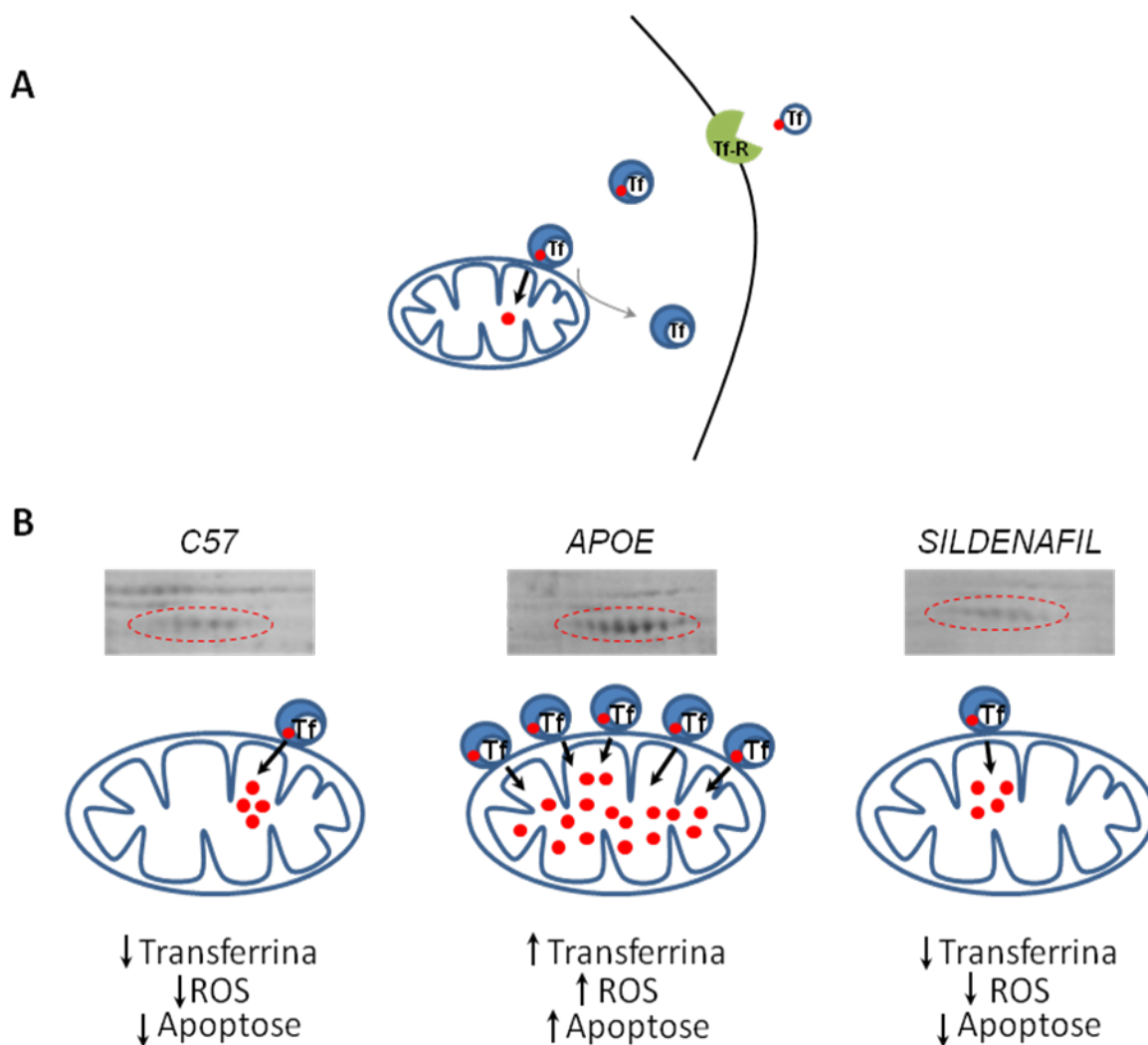


Figura 17: Mecanismo *kiss-and-run* e a intensidade da transferrina nos grupos experimentais.

(A) Após o reconhecimento da transferrina pelo seu receptor de membrana, o complexo é internalizado iniciando o mecanismo *kiss-and-run*, o qual envolve a interação direta do endossomo com a mitocôndria, a fim de carrear o ferro do meio extracelular para a organela. (B) Nos animais dislipidêmicos (APOE), foi possível observar o significativo aumento na expressão da transferrina (*spots* proteicos correspondentes para a Tf, em destaque na linha pontilhada em vermelho) em comparação com os animais sadios (C57). Após o tratamento com sildenafil, a expressão da transferrina retornou aos níveis dos animais C57. As esferas vermelhas representam os íons Fe. Os círculos azuis representam os endossomos com o complexo Fe-Tf. Tf-R = receptor de transferrina.

Embora o protocolo de enriquecimento mitocondrial tenha sido considerado satisfatório e várias informações relevantes foram geradas pela análise proteômica, alguns achados foram inesperados e/ou contraditórios.

Já foi evidenciado que o aumento de albumina plasmática é capaz de induzir apoptose intrínseca (via mitocondrial) em células do túbulo proximal de ratos (Erkan et al, 2007). Em 2014, Ruggiero e colaboradores mostraram que a albumina, quando ligada a lipídeos, é capaz de sofrer endocitose com subsequente liberação dos ácidos graxos no interior na célula, induzindo o aumento da β -oxidação. Este processo leva ao aumento da produção de ROS e exaustão do sistema antioxidante celular, desencadeando a via apoptótica. Considerando essas informações, o aumento da albumina observado no grupo APOE é coerente com o descrito por Ruggiero e colaboradores (2014), embora seja importante salientar que, provavelmente não há participação da albumina no reequilíbrio redox obtido após o tratamento com sildenafil, uma vez que não houve diferença entre os grupos de animais com e sem tratamento (figura 13F).

Diversos trabalhos descrevem o aumento da expressão da catepsina B em processos patológicos como o traumatismo crânio-encefálico (Hook et al, 2015), na doença de Chagas (Doyle et al, 2007), e na fibrose hepática (Holsinger et al, 2010). No presente trabalho, foi observada ausência da catepsina B nos animais no grupo APOE (figura 13G), enquanto que, controversamente, Suski et al. (2011) numa abordagem proteômica semelhante, evidenciaram o aumento significativo dessa enzima nos camundongos apoE *knockout* quando comparados com os animais C57.

Adicionalmente, três proteínas apresentaram maior expressão durante a dislipidemia e o tratamento com sildenafil não foi capaz de reestabelecer o padrão de expressão: HSP A5 (*heat shock protein A5*), arginase-1 e a *vitamin D binding protein*.

As proteínas de choque (HSPs) são consideradas como biomarcadores de processos patológicos (Roos e Romagnolo, 2012). A redução da expressão da HSP A5, HSP 90B1 e HSP E1, já foram associadas à redução de estresse no retículo endoplasmático, resposta inflamatória e produção de ROS (Cooney et al, 2012). Os resultados obtidos mostram que, o grupo de animais dislipidêmicos apresenta uma

tendência de aumento da HSP A5 quando comparados com os animais do grupo C57 e, interessantemente, no grupo SILDENAFIL onde foi observada a redução da produção de ROS e número de células em apoptose, também houve aumento da expressão da HSP A5 (figura 13H).

Para a enzima arginase, são descritas duas isoformas, 1 e 2. Ambas catalisam a mesma reação porém, diferenciam-se na distribuição entre os tecidos e na localização dos compartimentos subcelulares (Munder, 2009).

Arginase-1 é expressa principalmente no fígado, sendo uma das enzimas do ciclo da ureia, o qual possui etapas tanto no citosol quanto na mitocôndria (Jenkinson et al, 1996). Em função da participação dessa enzima ocorrer no citosol, sua identificação nas amostras com enriquecimento mitocondrial, pode ser considerado um achado surpreendente. O aumento de sua expressão já foi associado a estímulos antiinflamatórios, degradando a L-arginina até gerar colágeno e poliaminas, compostos que estão relacionados com o reparo tecidual, proliferação celular e transporte transmembrana (Munder, 2009). O padrão de expressão observado para a arginase-1 após a 2DE, se mostrou inconclusivo onde teve sua expressão aumentada tanto no grupo APOE quanto no SILDENAFIL, quando comparados com o grupo C57 (figura 13I).

A *vitamin D binding protein* (VDBP) é uma proteína, da superfamília da albumina, que é produzida principalmente pelos hepatócitos. Além de sua função mais conhecida (a do transporte plasmático da vitamina D), a VDBP também já foi relacionada ao transporte de ácidos graxos e endotoxinas, efeito quimiotático sobre neutrófilos, ativação de macrófagos e o sequestro de actina em tecidos injuriados (Wookey et al, 2017). De maneira semelhante à HSP A5, a VDBP apresentou uma tendência de aumento de expressão do grupo APOE e um significativo aumento no grupo de animais tratados com sildenafil (figura 13J). É possível que exista relação dessa proteína no contexto desse estudo, uma vez que ela participa do transporte de ácidos graxos. Contudo, seria demasiadamente prematuro inferir alguma participação nos fenômenos aqui observados sem os devidos experimentos comprobatórios.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que, além do ponto de vista da homeostase celular, ocorrem também diferenças em termos de remodelamento proteico mitocondrial dos animais apoE *knockout*, com e sem tratamento com sildenafil. Os dados produzidos podem auxiliar na compreensão de mecanismos moleculares envolvidos em algumas alterações fisiopatológicas observadas na dislipidemia, bem como os efeitos benéficos do tratamento com sildenafil.

Considerações finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi demonstrado que a dislipidemia - condição característica dos camundongos apoE *knockout* - foi capaz de induzir uma provável disfunção mitocondrial nas células do fígado, caracterizada pelo aumento da produção intracelular de ROS (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito) e aumento do número de células em apoptose. Nesse contexto, também foi evidenciado que a dislipidemia induziu alterações no proteoma mitocondrial, as quais se relacionam com o estresse oxidativo.

O tratamento com sildenafil foi capaz de prevenir e/ou reduzir a produção intracelular das ROS que se apresentaram elevadas nos animais sem tratamento, bem como reduziu o quantitativo de células em apoptose. Além disso, o sildenafil induziu: (i) aumento da expressão da urato oxidase, enzima com potencial antioxidante; (ii) redução da transferrina, que ao reduzir a oferta de Fe, contribui para a redução do estresse oxidativo mitocondrial.

Os resultados obtidos nesse trabalho trazem avanços no conhecimento das alterações no proteoma mitocondrial, particularmente o das células do fígado de camundongos apoE *knockout*. Considerando que as análises proteômicas são estudos descritivos, as hipóteses discutidas permitem direcionar estudos complementares para o entendimento completo dos mecanismos envolvidos no balanço redox.

Referências

8 REFERÊNCIAS

Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emami B, Fooladian F, Zafari K, 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. **Comp Biochem Physiol.** 135, 331-336, 2003.

Almeida LS, Barboza JR, Freitas FP, Porto ML, Vasquez EC, Meyrelles SS, Gava AL, Pereira TM. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in wistar rats. **Hum Exp Toxicol.** 35(11):1194-1202, 2016.

Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirde P, Romanha, AJ. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi resistance to Benznidazole. **J Proteome Res,** 7(6):2357-67, 2008.

Antunes MV, Lazzaretti C, Gamargo GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev Bras Cien Farm.** 44(2):279-87, 2008.

Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, Kellner R, Kubicek M, Lottspeich F, Maser E, Mewes HW, Meyer HE, Mullner S, Mutter W, Neumaier M, Nollau P, Nothwang HG, Ponten F, Radbruch A, Reinert K, Rothe G, Stockinger H, Tarnok 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):816-32, 2009.

Arab S, Gramolini AO, Ping P, Kislinger T, Stanley B, Van Eyk J, Ouzounian M, MacLennan DH, Emili A, Liu PP. Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. **J Am Coll Cardiol.** 48(9):1733-41, 2006.

Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. **Circ Res.** 88(8):763-73, 2001.

Balarini CM, Leal MA, Gomes IBS, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mice. **J Transl Med.** 11(5):120-28, 2013.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minin VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr.** 23(4):629-43, 2010.

Bernardes FP, Batista AT, Porto ML, Vasquez EC, Campagnaro BP, Meyrelles SS. Protective effect of sildenafil on the genotoxicity and cytotoxicity in apolipoprotein E-deficient mice bone marrow cells. **Lipids Health Dis.** 27:100-07, 2016.

Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **J Physiol.** 555:589-606, 2004.

Bonomini F, Filippini F, Hayek T, Aviram M, Rezzani R. Apolipoprotein E and its role in aging and survival. **Exp Gerontol.** 45(2):149-57, 2010.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 15:269-90, 1999.

Chow CW, Clark M, Rinaldo J, Chalkley R. Identification of the rat xanthine dehydrogenase/oxidase promoter. **Nucleic Acids Res.** 22:1846-1854, 1994.

Cieniewski-Bernard C, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Proteomic analysis in cardiovascular diseases. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 35(4):362-66, 2008.

Cooney JM, Barnett MP, Brewster D, Knoch B, McNabb WC, Laing WA, Roy NC. Proteomic analysis of colon tissue from interleukin-10 gene-deficient mice fed polyunsaturated fatty acids with comparison to transcriptomic analysis. **J Proteome Res.** 11:1065-77, 2012.

Cuchel M, Bloedon M, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A, Millar JS, Ikewaki K, Siegelman ES, Gregg RE, Rader DJ. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. **N Engl J Med.** 352(2):148-56, 2007.

Dailey HA, Meissner PN. Erythroid heme biosynthesis and its disorders. **Cold Spring Harb Perspect.** 3(4):124-42, 2013.

Dias AT, Rodrigues BP, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **J Transl Med.** 6(12):35-43. 2014.

Decano JL, Mattson PC, Aikawa M. Macrophages in vascular inflammation: Origins and Functions. **Curr Atheroscler Rep.** 18(6):34-41, 2016.

Degrelle SA, Gerbaud P, Leconte L, Ferreira F, Pidoux G. Annexin-A5 organized in 2D-network at the plasmalemma eases human trophoblast fusion. **Sci Rep.** 8(7):744-55, 2017.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 10:369-76, 2000.

Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **Res Notes.** 20(5):513-18, 2012.

Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and the metabolic syndrome: A promising therapeutic target. **J Hepatol.** 55:920-32, 2011.

Doyle PS, Zhou YM, Engel JC, Mckerrow JH. A cysteine protease inhibitor cures Chagas disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrob Agents Chemother.** 51:3932-9, 2007.

Erkan E, Devarajan P, Schwartz GJ. Mitochondria are the major targets in albumin-induced apoptosis in proximal tubule cells. **J Am Soc Nephrol.** 18:1199-1208, 2007.

Fahning BM, Dias AT, Oliveira JP, Gava AG, Porto ML, Nogueira BV, Campagnaro BP, Pereira TM, Vasquez EC, Balarini CM, Meyrelles SS. Sildenafil improves vascular endothelial structure and function in renovascular hypertension. **Curr Pharm Biotechnol**. 16(9):823-31, 201

Fang Y, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**. 18(10):872–79, 2002.

Fields S. Proteomics in genomeland. **Science** 2001;291(80):1221-4.

Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. **Physiol Rev**. 82:331-371, 2002.

Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/>. Acesso em: 31.abr.2016.

Gomes FS. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Rev Nutr**, 20(5):537-48, 2007.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**.4(12):3665-85, 2004.

Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**. 66:39–63, 2002.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**. 305:626-29, 2004.

Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **J Mol med**. 83(5):329-42, 2005.

Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev Bras Hematol Hemot**. 30(5):390-97, 2008.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and artery disease. **N Engl J Med.** 352(16):1685-95, 2005.

Hazen SL, Heinecke, JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. **J. Clin Invest.** 99:2075-81, 1997.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature.** 407:770-76, 200.

Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J. Calreticulin is a receptor for nuclear export. **J Cell Biol.** 152:127-140, 2001.

Holsinger LDC, Dener J, Green M, Booth R, Dalrymple S. Efficacy of a reversible cathepsin B inhibitor in a rodent model of liver fibrosis and human pharmacokinetic profile. **Hepatology.** 52:1128A, 2010.

Hook G, Jacobsen JS, Grabstein K, Kindy M, Hook V. Cathepsin B is New Drug Target for Traumatic Brain Injury Therapeutics: Evidence for E64d as a promising lead drug candidate. **Front Neurol.** 6:178-185, 2015.

Janssen M, de Jong, JW, Pasini E, Ferrari R. Myocardial xanthine oxidoreductase activity in hypertensive and hypercholesterolemic rats. **Cardioscience.** 4:25–29; 1993.

Jawien J, Gajda M, Wolkow P, Zuranska J, Olszanecki R, Korbut R. The effect of montelukast on atherogenesis in apoE/LDLR - double knockout mice. **J Phys and Pharmacol.** 59(3):633–9, 2008.

Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 114:107-132, 1996.

Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 7(6):391-403, 2006.

Jeon GS , Nakamura T, Lee JS, Choi Wj, Ahn SW, Lee KW, Sung JJ, Lipton AS. Potencial effect of S-nitrosylate protein disulfide isomerase on mutant SOD1 aggregation and neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. **Mol Neurobiol.** 49:796-806, 2014.

Ke JY, Cen WJ, Zhou XZ, Li YR, Kong WD, Jiang JW. Iron overload induces apoptosis of murine preosteoblast cells via ROS and inhibition of AKT pathway. **Oral Dis.** Epub ahead of print. 2017.

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):231-43, 1975.

Kohda Y, Gemba M. Modulation by cyclic AMP and phorbol myristate acetate of cephaloridine-induced injury in rat renal cortical slices. **Jpn J Pharmacol.** 85, 54-59, 2001.

Koruta H, Yamaguchi M. Inhibitory eddect of calcium protein regucalcin on protein kinase C in rat renal cortex cytosol. **Biol Pharm Bull.** 21(4):315-18, 1998.

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med.** 6:513-16, 2000.

Labriola CA, Conte IL, Lopez M, Medus L, Parodi AK, Caramelo JJ. Endoplasmic reticulum calcium regulates the retrotranslocation of Trypanosoma cruzi calreticulin to the cytosol. **Plos One.** 5(10):75-87, 2010.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227(15):680-85, 1970.

Leal MA, Balarini CM, Dias AT, Porto ML, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. **Curr Pharm Biotechnol.** 16(6):517-30, 2015.

Loo AE, Ho R, Halliwell B. Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. **Free Radic Bio. Med** 51:884-892, 2011.

Ludwig J, McGill DB, Lindor K. D. Review: nonalcoholic steatohepatitis. **J Gastroenterol Hepatol**. 12:398-03, 1997.

Lunardi F, Lima JHC, Assreuy J. Comparative study of respiratory burst by phorbol ester and zymosan in humans granulocytes. *Clin Biochem*.

Manta B, Hugo M, Ortiz C, Ferrer-Sueta G, Trujillo M, Denicola A. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. **Arch Biochem Biophys**. 484:146-154, 2009.

May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K. Instruments and methods in proteomics. **Methods Mol Biol**. 696:3-26, 2011.

McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of the heart: unraveling disease. **Circ Res**. 98(3):309-21, 2006.

Mena P, Urrutia J, Lourido F, Carrasco CM, Nunez MT. Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. **Mitochondrion**. 21:92-105, 2015.

Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 140(2):251–255, 2005.

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

Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **Brit J Pharmacol.** 158,638-51, 2009.

Munro D, Trenberg JR. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators os oxygen species. **J Exp Biol.** 220(7): 1170-80, 2017.

Nakagawa T, Yamaguchi M. Overexpression of regucalcin suppresses apoptotic cell death in cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells: Change in apoptosis-related gene expression. **J Cell Biochem.** 96:1274-1285, 2005.

Nasser ALM. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 32(2): 275-79, 2011.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem.** 250(10):4007-21, 1975.

Oliveira BM, Coorssen JR, Martins-de-Souza D. 2DE: the phoenix of proteomics. **J Proteomics.** 104:140-50, 2014.

Oliveira MC, Schoffen JPF. Oxidative Stress Action in Cellular Aging. **Braz Arch Biol Technol.** 53(6):1333-42, 2010.

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol.** 20(39):14205-18, 2014.

Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Ministério da Saúde, Brasil. 2011. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agen-cia-saude/16008-3-4-milhoes-habitantes-tem-pelo-menos-uma-doenca-cronica>>. Acesso em: 31.abr.2016.

Percário S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. **Rev Nutr.** 23(2):259-67, 2010.

Porto ML, Lima LCF, Pereira TMC, Nogueira BV, Tonini CL, Campagnaro BP, Meyrelles SS, Vasquez EC. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. **Lipids Health Dis.** 10:155-164, 2011.

Porto ML, Rodrigues BP, Menezes TN, Ceschim SL, Casarini DE, Gava AL, Pereira TM, Vasquez EC, Campagnaro BP, Meyrelles SS. **J Biomed Sci.** 24(3):135-48, 2015.

Povoa HJr, Sa LD, Lessa VM. Xanthine oxidase and triglycerides in serum of patients with hyperlipoproteinemia, type IV. **Biomed Biochim Acta.** 43:1201-03; 1984.

Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng MJ, Cromwell WC, Lachmann RH, Gaudet D, Tan JL, Chasan-Taber S, Tribble DL, Flaim JD, Crooke ST. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet.** 375(9719):998-1006, 2010.

Raja SG, Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. **Ann Thorac Surg.** 78(4):1496–1506, 2004

Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI, Kinter M. High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. **J Biol Chem.** 288(3):1979-90, 2013.

Rodrigues BP, Campagnaro BP, Balarini CM, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids Health Dis.** 28(12):128-35, 2013.

Roos B, Romagnolo D. Proteomic Approaches to Predict Bioavailability of Fatty Acids and Their Influence on Cancer and Chronic Disease Prevention. **J Nutr.** 142(7):1370S-1376S, 2012.

Rotilio D, Della-Corte A, D'imperio OM, Colleta W, Marcone S, Silvestri C, Giordano L, Di Michele M, Donati MB. Proteomics: bases for protein complexity understanding. **Thromb Res.** 129(3):257-62, 2012.

Rouault TA, Tong WH. Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. **Trends Genet.** 24:398-407, 2008.

Ruggiero C, Elks CM, Kruger C, Cleland E, Addison K, Noland RC, Stadler K. Albumin-bound fatty acids but not albumin itself after redox balance in tubular epithelial cells and induced a peroxide-mediated redox-sensitive apoptosis. **Am J Physiol Renal Physiol.** 306(8):896-906, 2014.

Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK, Barford D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. **Nature.** 423:769-773, 2003.

Santos CX, Anjos EI, Augusto O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. **Arch Biochem Biophys.** 372:285-294, 1999.

Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.** 27(6):608-19, 2008.

Schröder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in apoE knockout mice fed a western-type diet. **Free Radic Biol Med.** 1(41):1353–60, 2006.

Setsunikai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescent probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **J Biol Chem.** 278(5):3170-5, 2003.

Shan H, Wei J, Zhang M, Lin L, Yan R, Zhu Y, Zhang Q. Calreticulin is localized at mitochondria of rat cardiomyocyte and affected by furazolidona. **Mol Cell Biochem.** 397:125-130, 2014.

Shargorodsky M, Debby O, Matas Z, Zimlichman R. Effect of long-term treatment with antioxidants (vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10 and selenium) on arterial compliance, humoral factors and inflammatory markers in patients with multiple cardiovascular risk factors. **Nutr Metab.** 6(7):55-61, 2010.

Sheftel AD, Zhang AS, Brown C, Shirihai OS, Ponka P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. **Blood.** 110:125-132, 2007.

Shimokawa N, Yamaguchi M. Calcium administration stimulates the expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in rat liver. **FEBS Lett.** 305:151-154, 1992.

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

Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Front Physiol.** 3:441, 2011.

Suski M, Olszanecki R, Madej J, Toton-Zuranska J, Niepsuj A, Jawien J. Proteomic analysis of changes in protein expression in liver mitochondria in apoE knockout mice. **J Proteomics.** 74(6):887-93, 2011.

Szczepanek K, Chen Q, Larner AC, Lesnfsky EJ. Cytoprotection by the modulation of mitochondrial electron transport chain: the emerging role of mitochondrial STAT3. **Mitochondrion.** 12:180-189, 2012.

Terao M, Cazzaniga G, Ghezzi P, Bianchi M, Falciani F, Perani P, Garattini E. Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. regulation of its transcript by interferons in vivo. **Biochem J.** 283 (3):863-870, 1992.

Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **Int J Mol Sci.** 14(2):3325-42, 2013.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive species of oxygen. **J Physiol.** 552(2):335-44, 2003.

Valente, SCM. Marcação da anexina V para imagem funcional da apoptose celular. Dissertação de mestrado. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

Van Eyk JE. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. **Circ Res.** 108(4):490-8, 2011.

Vasquez EC, Gava AL, Graceli JB, Balarini CM, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS. Novel therapeutic targets for phosphodiesterase 5 inhibitors: current state-of-the-art on systemic arterial hypertension and atherosclerosis. **Curr Pharm Biotechnol.** 17(4):347-64, 2016.

Vasquez EC, Peotta VA, Meyrelles SS. Cardiovascular autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Cell Physiol Biochem.** 29(5-6):635-46, 2012.

Vercauteren FG, Arckens L, Quirion R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids.** 33(3):405-14, 2007.

Vergote D, Bouchut A, Sautier 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.

Wanatabe MM. Medida das atividades da dissulfeto isomerase proteina: uma análise crítica. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Wasinger, VC, Cordwell, SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis.**16(7)1090-1094, 1995.

Wookey AF, Chollangi T, Yong HEJ, Kalionis B, Brennecke SP, Murthi P, Georgiou HM. Placental Vitamin D-Binding Protein Expression in Human Idiopathic Fetal Growth Restriction. **J Pregnancy.** 25(3):512-531, 2017.

Yamagushi M, Takadura Y, Nakagawa T. Regucalcin Increases Ca²⁺-ATPase Activity in the Mitochondria of Brain Tissues of Normal and Transgenic Rats. **J Cell Biochem.** 104(3): 795-804, 2008.

Zhang H, Young KK, Govindarajan A, Baba A, Binnie M, Ranieri VM, Liu M, Slutsky AS. Effect of adrenoreceptors on endotoxin-induced cytokines and lipid peroxidation in lung explants. **Am J Respir Crit Care Med.** 160, 1703-10, 1999.

Zhang M, Wei J, Li Y, Shan H, Yan R, Zhang Q, Xue J. Novel distribution of calreticulin to cardiomyocyte mitochondria and its increase in a rat model of dilated cardiomyopathy. **Biochem Biophys Res Comm.** 499(1): 62-8, 2014.