PRISCILA CAMILLO TEIXEIRA

Análise proteômica no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica: alterações no metabolismo energético cardíaco

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Edecio Cunha-Neto

São Paulo

2009

"Se a ciência é a constelação de fatos, teorias e métodos coletados na literatura, então os cientistas são os indivíduos que têm se esforçado, com sucesso ou não, para contribuir com um ou outro elemento desta particular constelação."

Thomas S. Kuhn

Aos meus pais, por terem me dado a chance de participar desta experiência fascinante que é a vida,

A toda a minha família que sempre me deram muita força e coragem para vencer mais esta etapa,

Aos pacientes do Instituto do Coração, que são verdadeiros exemplos de vida...

Agradecimentos

A elaboração de uma tese de doutorado é uma trajetória de amadurecimento científico e pessoal. Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta trajetória.

Em primeiro lugar, e especialmente, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Edecio Cunha Neto; pela confiança depositada em mim e em meu trabalho, acompanhando e incentivando meu progresso na pesquisa. Muito obrigada pela sua dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, por me receber no Instituto do Coração, pelas discussões, críticas e sugestões nas reuniões de grupo, e por ser um exemplo de professor, cientista e administrador.

A toda a Equipe de Transplante do Instituto do Coração, Prof. Dr. Noedir Stolf, Dr. Alfredo Fiorelle, Dr. José Lima, e em especial ao Dr. Ronaldo Honorato, pela indispensável ajuda na obtenção das amostras. Obrigada pelas discussões e por dar um sentido especial ao meu trabalho.

À querida amiga Andréia Kuramoto, pela amizade, dedicação e por sempre estar ao meu lado, ajudando, incentivando, ouvindo...

Aos meus queridos amigos Leo K. Iwai, Angelina Bilate e Kellen Faé, que mesmo à distância tiveram participação fundamental no progresso deste trabalho, sempre dispostos a ajudar, verdadeiros companheiros.

A Dra. Veronica Coelho e Dra Luiza Guilherme, por todas as discussões e sugestões.

Aos professores Dr. Francisco Laurindo, Dra Ana Carla Goldberg e ao Dr. Fernando Bacal, pelas valiosas sugestões feitas a este trabalho durante minha qualificação, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do grupo de Chagas e HIV, Camila, Daniela, Susan, Luciana, Sandra, Natalie, Simone, Adriana, e em especial a Eliane por toda sua ajuda, convívio e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia (InCor) e do Laboratório de Alergia (FMUSP), que não me atrevo a citar nomes, pois todos são muito especiais para mim. Grandes companheiros neste meu trajeto ao longo do doutorado.

Ao Seu Jair, Douglas, Sônia, Gisele, Neuzeti, Tânia pela atenção, paciência e por toda a ajuda administrativa.

Aos amigos da GE Healthcare, em especial a Paula, Maurício e Michael, pela colaboração e por sempre me apoiarem, oferecendo suporte na análise proteômica.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Vascular (InCor), Célio, Denise, Vítor, Angélica, Maria, Luciana, sempre dispostos a ajudar. Obrigado pela amizade.

Ao Dr. Luis Benvenutti e a todos do Serviço de Anatomia e Patologia (InCor) por toda ajuda com a análise histopatológica.

Ao Dr. Hanno Langen e ao Dr. Everson Nogoceke por me darem a oportunidade de realizar parte deste trabalho nos Laboratórios de Medicina Molecular (MML) da Empresa Hoffmann-La Roche (Basiléia, Suíça). Obrigada pela atenção, apoio e valiosas discussões.

Ao Dr. Axel Ducret, do Setor de Espectrometria de Massa do MML, por não apenas colaborar com meu trabalho, mas também me acolher como sua aluna. Pela sua dedicação, orientação e ensinamentos, muito obrigada.

Ao meu grande amigo Vilem Guryca e à minha querida amiga Annette Schell-Steven do MML que sempre estiveram dispostos a me ajudar nos momentos de necessidade.

Aos amigos do Setor de Espectrometria de Massa do MML, Sabine Kux Geijtenbeek, Daniel Roeder e Peter Berndt, por toda a ajuda na identificação das proteínas.

Aos colegas Jens Lamerz e Franz Roos, do Setor de Bioinformática do MML, pela grande ajuda no planejamento dos experimentos e análise estatística dos resultados; e ao Nikolaos Berntenis pela sua imensa paciência e ajuda na bioinformática.

Aos colegas Angelique Augustin e David Ávila, do Laboratório de Sinalização Celular do MML, pela ajuda e colaboração nos experimentos de “reverse phase protein array”, que não foram inclusos neste trabalho, mas que renderam bons resultados.

Às amigas Patrícia e Jaqueline, pelo alegre convívio durante minha estadia no MML. Obrigada pelas importantes discussões na hora do café.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Departamento de Bioquímica (IQ-USP), e a Dra. Janice Onuki por me abrirem as portas para o mundo da ciência. Obrigada por acreditarem em mim.

A todos os amigos do Laboratório de Lesões em Biomoléculas (IQ-USP), pela amizade e convívio durante meus anos de iniciação científica.

Às Instituições: Instituto do Coração e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudo para que eu pudesse me dedicar à pós-graduação.

A meus pais, pela orientação e exemplo que recebo durante toda a vida, e pelo imenso suporte para que eu pudesse cumprir mais esta importante etapa em minha vida.

Aos meus irmãos, Rogério e Marcelo, e às minhas cunhadas, Ingrid e Carla, pelo amor, carinho e suporte em todas as horas.

Aos meus sobrinhos Gustavo, Gabriela, Cuilherme e Vitor, pela alegria.

Ao meu fiel amigo Lucky, que esteve, literalmente, ao meu lado em todos os minutos da escrita deste trabalho.

Ao meu grande amigo e companheiro de toda esta jornada, Thomas. Obrigada pelo carinho, atenção, paciência e suporte incondicional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

E a Deus, principalmente...

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução 1

1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da doença de Chagas 1

1.2. Miocardite na patogenia da Cardiomiopatia Chagásica Crônica 5

1.2.1. Citocinas inflamatórias na doença de Chagas 5

1.3. Cardiomiopatias de etiologia não inflamatória 8

1.4. Hipertrofia de cardiomiócitos na insuficiência cardíaca 10

1.5. Metabolismo energético na insuficiência cardíaca 12

1.6. Análise proteômica em doenças cardiovasculares 16

2. Objetivos 19

3. Materiais e Métodos 20

3.1. Reagentes 20

3.2. Amostras de miocárdio humano 20

3.3. Extratos protéicos 21

3.4. Análise Proteômica 23

3.4.1. Eletroforese bidimensional 23

3.4.1.1. Primeira dimensão 23

3.4.1.2. Segunda dimensão 25

3.4.1.3. Coloração dos géis bidimensionais 26

3.4.2. Aquisição das imagens dos géis bidimensionais 27

3.4.3. Análise dos géis bidimensionais 27

3.4.4. Processamento dos “spots” para identificação protéica 29

3.4.5. Análise por espectrometria de massas..... 29

3.4.6. Identificação das proteínas 31

3.4.7. Análise funcional de proteínas 31

3.5. Análise da expressão protéica por “Western Blotting”..... 32

3.6. Análise da expressão de RNAm por RT-PCR em tempo real 33

3.6.1. Extração de RNA e transcrição em cDNA..... 33

3.6.2. Reação de RT-PCR em tempo real 34

3.6.3. Cálculo da eficiência de amplificação dos primers utilizados 36

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão em amostras de miocárdio 37

3.8. Análise histopatológica das amostras de miocárdio..... 37

3.9. Medida da atividade enzimática da creatina quinase 38

3.10. Análise estatística..... 39

4. Resultados 40

4.1. Caracterização das amostras de miocárdio humano..... 41

4.1.1. Análise histopatológica das amostras de miocárdio..... 44

4.1.2. Microscopia eletrônica das amostras de miocárdio 46

4.2. Identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica..... 49

4.2.1. Separação de proteínas por eletroforese bidimensional 49

4.2.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massas 50

4.2.3. Proteínas identificadas e sua classificação funcional..... 52

4.2.4. Validação de proteínas por “Western-Blotting” 59

4.3. Análise da expressão protéica diferencial no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e de indivíduos sem cardiomiopatia 60

4.3.1. Identificação protéica por espectrometria de massa..... 65

4.3.2. Análise das proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia. 66

4.3.3. Análise de padrões na expressão protéica diferencial 79

4.4. Estudo de alterações de enzimas envolvidas no metabolismo energético no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatia 87

4.4.1. Análise da expressão protéica diferencial de enzimas envolvidas no metabolismo energético por eletroforese bidimensional convencional 87

4.4.2. Análise da expressão protéica diferencial de enzimas envolvidas no metabolismo energético por "Western-Blotting" 93

4.4.3. Análise da expressão do RNA mensageiro de enzimas do metabolismo energético no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatia 98

4.4.4. Análise da atividade enzimática da Creatina Quinase no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatia 104

5. Discussão 106

5.1. Caracterização das amostras de miocárdio 106

5.2. Identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica 108

5.2. Análise da expressão protéica diferencial no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia 112

5.2.1. Proteínas estruturais e contráteis 114

5.2.2. Resposta ao estresse e apostose 116

5.2.3. Resposta imune 121

5.2.4. Metabolismo energético 123

5.2.4.1. Glicólise 123

5.2.4.2. Beta-oxidação 125

5.2.4.3. Ciclo de Krebs 127

5.2.4.4 . Fosforilação oxidativa 128

5.2.4.5 . Complexo da creatina quinase 132

5.2.4.6 . Outros processos metabólicos 133

5.3. Metabolismo energético / Produção e translocação de ATP..... 135

6. Conclusões 143

7. Anexos 146

8. Referências Bibliográficas 234

Apêndice

Lista de Figuras

Figura 1. Curvas de sobrevida de portadores de insuficiência cardíaca conforme etiologia, de origem chagásica, isquêmica ou dilatada idiopática. 4

Figura 2. Modulação da expressão do fator natriurético atrial (ANF), em cardiomiócitos fetais, por IFN-gama e MCP-1. 7

Figura 3. Metabolismo energético do coração. 13

Figura 4. Miocárdio de um paciente com CCC (CCC-03), apresentando dilatação, intensa fibrose e trombo. 44

Figura 5. Análise histopatológica do tecido cardíaco de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatias.. 46

Figura 6. Ultraestrutura do cardiomiócito na microscopia eletrônica da parede lateral do ventrículo esquerdo de um paciente com CCC, um com CDI e um com CI e de um indivíduo sem cardiomiopatia. 48

Figura 7. Géis bidimensionais de miocárdios de pacientes com CCC. 50

Figura 8. Espectro de massa do produto da fragmentação tríptica de um “spot”, com a lista de PMF usada para a identificação protéica em banco de dados.* 51

Figura 9. Classificação funcional das proteínas identificadas no miocárdio de pacientes com CCC. 56

Figura 10. Distribuição dos “spots”/proteínas por função, considerando o número de proteínas distintas identificadas, o número total de “spots” identificados e o volume (massa) que as proteínas representam na função. 58

Figura 11. Validação de algumas proteínas identificadas por “Western-Blotting” em amostras de 6 pacientes com CCC. 59

Figura 12. Gráfico mostrando a distribuição por idade dos pacientes, cujas amostras de miocárdio faram utilizadas para os experimenros de análise proteômica diferencial. 60

Figura 13. Esquema mostrando possíveis comparações entre os grupos de pacientes.. 61

Figura 14. Imagem representativa de um gel bidimensional com marcação fluorescente das amostras. 63

Figura 15. Imagens do gel bidimensional preparativo. 64

Figura 16. Diagramas de Venn representando a ocorrência de “spots” diferencialmente expressos comuns ou únicos nas relações entre grupos de pacientes com CCC em comparação com grupo de indivíduos sem cardiomiopatias. 69

Figura 17. Diagramas de Venn representando a ocorrência de “spots” diferencialmente expressos comuns ou únicos nas relações entre grupos de pacientes com cardiomiopatias em comparação com de grupo indivíduos sem cardiomiopatias. 69

Figura 18. Diagramas de Venn representando a ocorrência de proteínas diferencialmente expressas comuns ou únicas nas relações entre grupos de pacientes com cardiomiopatias em comparação com grupo de indivíduos sem cardiomiopatias.. 71

Figura 19. Análise da expressão diferencial da proteína creatina quinase M.Os gráficos mostram a diferença de expressão de três isoformas da proteína creatina quinase M.. 79

Figura 20. Resultados do cálculo PCA no conjunto de proteínas diferencialmente expressas. 82

Figura 21. Resultados do cálculo PCA no conjunto de proteínas diferencialmente expressas, excluindo “spots” com expressão extrema. 83

Figura 22. Resultado da análise de padrões (“Hierarchical Cluster”), considerando as proteínas diferencialmente expressas. 85

Figura 23. Resultado da análise de padrões (“Hierarchical Cluster”), considerando as proteínas diferencialmente expressas, excluindo “spots” com expressão extrema. ... 86

Figura 24. Géis bidimensionais de amostras de pacientes com CCC, CDI, e CI e de indivíduos sem cardiomiopatia (N). 88

Figura 25. Análise da expressão protéica diferencial da proteína creatina quinase M. 90

Figura 26. Análise da expressão protéica diferencial da proteína aconitase 2, mitocondrial. 91

Figura 27. Análise da expressão protéica diferencial da proteína ATP sintase, cadeia alfa. 92

Figura 28. Eletroforese unidimensional das amostras utilizadas nos experimentos de “Western-Blotting”. 93

Figura 29. “Western-blotting” das proteínas ATP sintase alfa, ATP sintase beta, creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B e GAPDH, utilizada como marcador endógeno, de cinco amostras de cada grupo. 94

Figura 30. Análise da expressão diferencial das proteínas ATP sintase alfa e ATP sintase beta nas amostras de miocárdio. 95

Figura 31. Análise da expressão diferencial das proteínas creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B nas amostras de miocárdio. 96

Figura 32. A.) Curva de dissociação, para confirmar especificidade do produto amplificado. B.) Curva de amplificação, para cálculo da eficiência. C.) Gráfico de eficiência., ... 100

Figura 33. Quantificação relativa da expressão de RNAm de enzimas do metabolismo energético. 102

Figura 34. Análise da atividade enzimática da creatina quinase total..... 104

Figura 35. Esquema mostrando de maneira simplificada algumas vias metabólicas envolvidas na geração de ATP, ressaltando as que podem estar alteradas no miocárdio de pacientes com CCC, gerando uma depleção na produção de ATP.....141

Figura 36. Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica.....142

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes cujas amostras de miocárdio foram utilizadas no estudo. 42

Tabela 2. Amostras de miocárdio humano (ventrículo esquerdo) utilizadas nos experimentos. 43

Tabela 3. Proteínas identificadas no miocárdio de pacientes com CCC. 52

Tabela 4. Distribuição dos "spots" identificados por função. 57

Tabela 5. Número de "spots" diferenciais nas correlações entre grupos de cardiopatas e grupo de indivíduos sem cardiomiopatia, utilizando o teste *t* (p<0,01). 67

Tabela 6. Número de "spots" diferenciais nas correlações apenas entre os grupos de cardiopatas, utilizando o teste *t* (p<0,01). 67

Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de pacientes com CCC, CI e CDI em comparação com o miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. 72

Tabela 8. Análise estatística da expressão protéica diferencial das proteínas ATP sintase alfa e ATP sintase beta. 95

Tabela 9. Análise estatística da expressão protéica diferencial das proteínas creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B. 97

Tabela 10. Características dos "primers" utilizados. 98

Tabela 11. Análise estatística da medida da atividade enzimática da creatina quinase 105

Resumo

Teixeira PC. *Análise proteômica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica: Alterações no metabolismo energético cardíaco* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 247p

A patogênese da Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) ainda é assunto de intenso debate. A CCC apresenta intenso infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, onde os linfócitos T infiltrantes produzem citocinas inflamatórias, como IFN-gama e TNF-alfa. Adicionalmente, pacientes com CCC apresentam um pior prognóstico quando comparados aos portadores de outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória, como a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) e a cardiomiopatia isquêmica (CI), sugerindo que mecanismos inflamatórios participam da patogênese e evolução da doença. Além disso, evidências anteriores de nosso grupo indicaram alterações do metabolismo energético na CCC. Neste trabalho, comparamos a expressão protéicado miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatias, com foco em proteínas relacionadas ao metabolismo energético celular. Para a identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC, utilizamos a técnica de separação por eletroforese bidimensional, e a identificação das proteínas foi feita por espectrometria de massa. A maioria dos “spots” identificados corresponde a proteínas estruturais ou proteínas do metabolismo, principalmente do metabolismo energético. Foram identificadas também proteínas envolvidas na apoptose, em processos imunes e de resposta ao

estresse. A análise da expressão protéica diferencial, utilizando marcação fluorescente, nos permitiu analisar o padrão de expressão das proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e de indivíduos sem cardiomiopatias, dentro de um total de 683 spots e 230 proteínas distintas identificadas. Observamos que o padrão de expressão protéica do miocárdio de pacientes com CCC é o mais distinto em relação ao padrão de expressão protéica presente no miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias; e que o padrão de expressão das proteínas presentes no miocárdio de pacientes com CI é o que mais se assemelha ao padrão de indivíduos sem cardiomiopatias. Encontramos várias proteínas com expressão alterada em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias, as quais desempenham papéis fundamentais em processos envolvidos na patologia de doenças cardiovasculares como apoptose (ex. catepsina D e Akt2), estresse oxidativo (ex. catalase), estresse do retículo endoplasmático (ex: proteína dissulfito isomerase), remodelamento cardíaco (ex: gelsolina) e outros. A análise individual das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de cardiomiopatia também mostrou que o miocárdio de pacientes com CCC apresenta expressão reduzida de várias proteínas mitocondriais associadas ao metabolismo energético – nas vias da glicólise, ciclo de Krebs, beta-oxidação, na fosforilação oxidativa, e do complexo creatina-quinase - em comparação com miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. Embora algumas dessas alterações tenham sido compartilhadas com a CDI, e em menor grau com a CI, observamos que os pacientes CCC apresentam o maior comprometimento do sistema creatina quinase, incluindo sua atividade enzimática. Também observamos que componentes do complexo enzimático da ATP sintase encontram-se reduzidos

em amostras de pacientes com CCC em comparação aos indivíduos sem cardiomiopatia. Observamos também aumento de expressão de proteínas de stress – incluindo estresse oxidativo, associadas à apoptose, e ao sistema imune no miocárdio de pacientes CCC, além da subunidade do imunoproteasomo e de proteínas associadas à degradação protéica. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a diminuição de expressão das proteínas essenciais à geração de ATP, o aumento da expressão de proteínas associadas à apoptose e de proteínas do sistema imune no miocárdio de pacientes com CCC em comparação aos pacientes CI e CDI podem estar relacionados à pior evolução da CCC. Nossa análise de padrões de expressão protéica identificou conjuntos de proteínas capazes de discriminar as amostras de miocárdio por etiologia. Isto poderá auxiliar no diagnóstico e na descoberta de biomarcadores periféricos de cardiomiopatias, bem como ajudar na elucidação dos mecanismos de desenvolvimento da doença e de alterações estruturais / moleculares do miocárdio em resposta à inflamação crônica.

Descritores: 1. Cardiomiopatia Chagásica; 2. Insuficiência Cardíaca; 3. Cardiomiopatia dilatada; 4. Miocardite; 5. Metabolismo Energético; 6. Proteômica.

Summary

Teixeira PC. *Proteomic Analysis in the myocardium from patients with Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: Alterations in the cardiac energy metabolism* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 247p

The pathogenesis of Chagas disease cardiomyopathy (CCC) is still controversial. CCC is characterized by an intense cardiac inflammatory infiltrate; infiltrating T lymphocytes produce inflammatory cytokines such as IFN-gamma and TNF-alpha. Patients afflicted by CCC display a worse prognosis when compared to patients afflicted by non-inflammatory cardiomyopathies such as idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC) and ischemic cardiomyopathy (IC), suggesting that inflammatory mechanisms play a role in the pathogenesis and progression of the disease. In addition, previous evidence from our group suggested the presence of energy metabolism changes in CCC. In the present work, we compared the protein expression profile of the myocardium of patients with CCC, IDC, IC, and non-cardiomyopathic subjects, with focus on energetic metabolism-related proteins. We used bidimensional electrophoresis to analyze the protein expression profile in the myocardium of patients afflicted by CCC, and proteins were identified by mass spectrometry. The majority of spots were identified as structural proteins or metabolism proteins, especially of energy metabolism. We were also able to identify apoptosis-, immune system- and stress response-related proteins. Using fluorescent labeling, we analyzed the differential expression profile in the myocardium of CCC,

IDC and IC patients, from a total of 683 spots and 230 distinct proteins identified. We observed that the protein expression profile of CCC patients is the most distinct when compared to non-cardiomyopathic subjects. On the other hand, the protein expression profile of IC patients is similar, at some extent, to the expression profile of non-cardiomyopathic patients. We also found altered expression of proteins related to apoptosis (e.g. cathepsin D and Akt2), oxidative stress (e.g. catalase), endoplasmic reticulum stress (e.g. disulfilte isomerase protein), cardiac remodeling (e.g. gelsolin) among CCC, IDC and IC patients when compared to non-cardiomyopathic patients. Most of these proteins, if not all, play fundamental roles in the pathogenesis of cardiovascular diseases. We also showed that the myocardium of patients afflicted by CCC display altered expression of several mitochondrial proteins associated to energy metabolism – in the glycolysis, Krebs cycle, beta-oxidation, oxidative phosphorylation, and creatine kinase complex when compared to non-cardiomyopathic subjects. Although some of these changes were shared with IDC samples, and, to a lesser extent, with CI samples, Western blot analysis demonstrated that CCC samples showed the most extreme reduction in protein expression of the creatine kinase system, including its enzymatic activity. We also observed with Western blot analysis that proteins from the ATP synthase complex (subunits alpha and beta) showed decreased expression in myocardium of CCC patients when compared to non-cardiomyopathic subjects and when compared to IC patients. We also observed an increase in the protein expression of stress proteins, including those involved in the oxidative stress response, those associated to apoptosis, and immune system proteins in CCC myocardium, along with increased expression of the immunoproteasome subunit and proteins associated to protein

degradation. Taken together, our results suggest that diminished expression of proteins fundamental for ATP generation, increased expression of apoptosis-associated proteins and immune system proteins in the myocardium of CCC patients when compared to IC and IDC patients may be associated to CCC progression. The analysis of the protein expression profile has identified groups of proteins whose expression pattern is able to discriminate the myocardium samples by etiology. This may help to find novel peripheral biomarkers of CCC and other cardiomyopathies, as well as in the understanding of mechanisms of disease progression and structural/molecular alterations of the inflamed myocardium.

Descriptors: 1. Chagas Cardiomyopathy; 2. Heart Failure; 3. Cardiomyopathy, dilated; 4. Myocarditis; 5. Energy Metabolism; 6. Proteomics.

1. Introdução

Cardiomiopatias são doenças do músculo cardíaco que podem ser resultado de diversos processos, como defeitos genéticos, danos ao cardiomiócito, ou infiltração do tecido. Sendo assim, as cardiomiopatias são resultados de danos diretos a elementos celulares do coração, em especial os cardiomiócitos, e processos que são externos às células como deposição anormal de substâncias na matriz extracelular. A cardiomiopatia dilatada é freqüentemente observada como via final comum de várias cardiomiopatias, podendo evoluir para a insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca pode ser vista como um distúrbio progressivo resultando da perda da função de cardiomiócitos e declínio da capacidade de contratilidade do coração, devido a alterações moleculares e estruturais, ou seja, o remodelamento cardíaco (1). Neste trabalho, estudaremos alterações na parede lateral do ventrículo esquerdo de pacientes com cardiomiopatias dilatadas, em especial a Cardiomiopatia Chagásica Crônica, em estágio terminal da insuficiência cardíaca.

1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da doença de Chagas

A Doença de Chagas (Tripanosomíase Americana) causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Apesar de diversos programas de controle do vetor, a doença de Chagas é uma causa significante de morbidade e mortalidade em muitos países da América do Sul e

Central, onde se estima que 10 milhões de pessoas possam estar infectadas (2). Uma importante característica desta doença é o acometimento cardíaco na fase crônica, causa principal de morbidade e mortalidade em cerca de 10-40 % dos indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* (3, 4). Em virtude disso, muito se tem pesquisado sobre a sua patogênese.

A evolução natural da cardiomiopatia chagásica pode ser dividida em fases aguda e crônica, segundo estudos clínicos e experimentais. A fase aguda pode durar de 4 a 12 semanas e caracteriza-se anatomopatologicamente por uma miocardite de intensidade variável e parasitismo evidente (5). Cerca de 10 % dos infectados podem apresentar variadas manifestações clínicas em função da intensidade da miocardite. Desses, 10 % apresentaram expressão clínica grave com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva (6, 7).

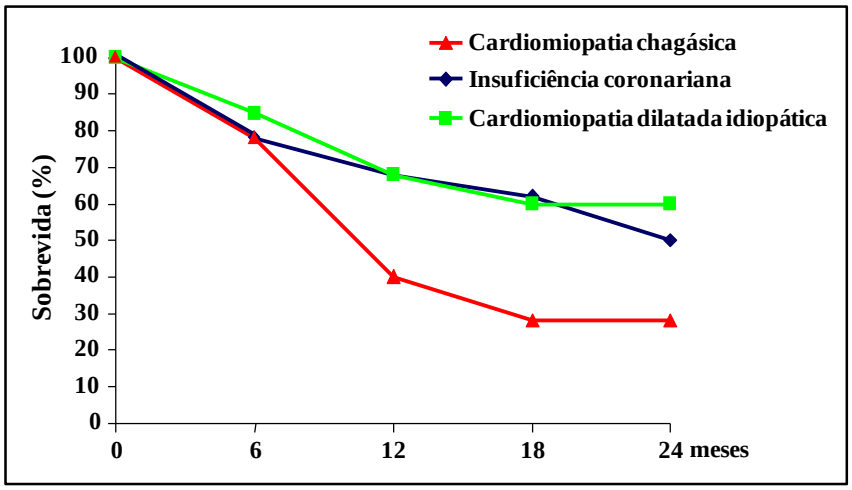
Após a fase aguda, interpõe-se longo período, que pode variar de duas a três décadas ou perdurar durante toda a vida do indivíduo, onde as manifestações clínicas permanecem ausentes (8). Entretanto, cerca de 30 % dos pacientes infectados pelo protozoário desenvolve a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) até 30 anos após a infecção inicial, enquanto que o restante permanece assintomático, na chamada forma indeterminada (9).

A CCC é uma cardiomiopatia inflamatória que pode ser acompanhada por bloqueios parciais ou totais, arritmia e tromboembolismo (5). Aproximadamente 1/3 dos indivíduos com alterações cardíacas acabam por desenvolver cardiomiopatia dilatada grave (associada ou não à forma arritmogênica). Esses pacientes podem manifestar insuficiência cardíaca congestiva, responsável pelo elevado número de internações e alta mortalidade (52 % em cinco anos) (10).

O acometimento ventricular pode ser global e difuso ou pode ser mais acentuadamente localizado, com a presença da característica lesão de ponta. A função sistólica é a principal alteração, embora a função diastólica também seja anormal (11). São observados aumento dos volumes e diâmetros sistólico e diastólico e redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Esses valores apresentam correlação com o quadro clínico, e assim, os pacientes portadores da cardiomiopatia podem ser divididos em três classes: cardiopatas leves (classe I), moderados (classe II) e graves (classe III). Pacientes em classe I podem apresentar volumes normais ou pouco aumentados, com fração de ejeção normal ou pouco reduzida (63,4±7,8); os em classe II apresentam volumes pouco ou moderadamente aumentados com fração de ejeção pouco ou moderadamente reduzida (51,3±13,0) e os em classe III, volumes muito aumentados e fração de ejeção bastante reduzida (31,0±9,4) (11, 12).

Na anatomia patológica do coração de pacientes chagásicos crônicos que faleceram pela insuficiência cardíaca, pode-se observar dilatação das câmaras cardíacas e aumento acentuado do peso do coração (13). A lesão anatômica macroscópica mais característica é o aneurisma apical que foi documentado em 52% de 1078 pacientes (14). Trombose mural ou tromboembolismo foram identificados em 44% dos 1345 casos estudados (15). A principal característica histopatológica da CCC é a presença da miocardite crônica responsável pela destruição progressiva das fibras miocárdicas, na virtual ausência de antígenos do parasita. Em função da intensa miocardite, observa-se substituição por fibrose reparativa e conseqüente remodelamento ventricular. A fibrose destaca-se como componente fundamental do processo de desorganização funcional e estrutural cardíaca, que culmina na falência do órgão. (8, 16, 17).

Alguns trabalhos sugerem que a insuficiência cardíaca de etiologia chagásica possa ter pior prognóstico com sobrevida até 50 % mais curta quando comparada a de outras etiologias, como a cardiomiopatia isquêmica (CI) e a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) (10, 18, 19) (Figura 1).



Bocchi E et al. Arq Bras Cardiol 1994; 63: 523

Figura 1. Curvas de sobrevida de portadores de insuficiência cardíaca conforme etiologia, de origem chagásica, isquêmica ou dilatada idiopática.O eixo x indica o tempo após o primeiro atendimento ambulatorial.

Graças a programas de saúde pública, a transmissão vetorial está sendo controlada em diversos países da América Latina, como é o caso do Brasil. Entretanto, mesmo que se bloqueie completamente a transmissão vetorial, persistirá o problema dos 2-3 milhões de pacientes acometidos de CCC em nosso País, além das pessoas atualmente na forma indeterminada que virão a desenvolver sintomas cardíacos. Como as drogas anti-*T. cruzi* são pouco eficazes em evitar a progressão das lesões cardíacas da CCC (20), o tratamento da CCC é apenas sintomático. Em pacientes com insuficiência cardíaca refratária, o único tratamento disponível é o

transplante cardíaco. A ausência de alternativas de tratamento é conseqüência do conhecimento limitado que se tem da patogênese das lesões crônicas e da biologia do parasita.

1.2. Miocardite na patogenia da Cardiomiopatia Chagásica Crônica

A característica patológica mais evidente em lesões cardíacas de pacientes com CCC é a presença de uma miocardite difusa, com um processo de intensa remodelação miocárdica e fibrose, com danos a cardiomiócitos (21, 22). O infiltrado inflamatório na CCC seria o possível efetor dos danos ao tecido, sendo composto por macrófagos (50%), células B (10%) e células T (40%) (23), com uma predominância de 2:1 de células T $CD8^+$ sobre células T $CD4^+$ (24, 25). Histiócitos e células endoteliais do tecido cardíaco de pacientes com CCC apresentam expressão aumentada de moléculas HLA de classe I e de classe II, ICAM-1 e selectina-E, enquanto que os cardiomiócitos expressam níveis elevados de HLA de classe I, provavelmente em resposta à produção local de citocinas inflamatórias (24-26).

1.2.1. Citocinas inflamatórias na doença de Chagas

Citocinas inflamatórias desenvolvem um papel central na infecção pelo *T. cruzi*. A resposta inata disparada pelo patógeno, envolvendo a produção de citocinas proinflamatórias do tipo Th1 (IFN-gama, TNF-alfa, IL-1, IL-2, Il-6 e IL-8) (27) e quimiocinas (IP-10, RANTES, MIP-1 alfa, MIP-1 beta e MCP-1/CCL2) (28), é essencial para o controle da infecção aguda. Âncoras glicosilfosfatidilinositol da

membrana do *T. cruzi* estimulam a síntese de citocinas proinflamatórias por macrófagos pela ativação de "Toll like receptors" (TLR) dependentes do adaptador MyD88 (29-31). Camundongos deficientes em MyD88, em citocinas / receptores inflamatórios (IFN-gama, IL-12, TNFR1), ou em moléculas efetoras induzidas por citocinas (como a iNOS, "inducible nitric oxide synthase") foram altamente susceptíveis à infecção aguda por *T. cruzi* (31, 32). Citocinas inflamatórias não apenas são essenciais para a sobrevida durante a fase aguda da infecção, mas também se acredita que pacientes chagásicos estejam cronicamente expostos ao estímulo do parasita para a produção de citocinas inflamatórias, sendo estas encontradas em níveis aumentados no plasma e coração na doença de Chagas crônica (26, 33-35).

Nosso grupo e outros evidenciaram que pacientes com CCC apresentam um aumento no número de células produtoras de citocinas do tipo Th1 em comparação com pacientes assintomáticos. A análise em células mononucleares do sangue periférico mostrou que a freqüência de células produtoras de IFN-gama, após estímulo por fito-hemaglutinina, foi significantemente maior em pacientes com CCC do que em pacientes da forma indeterminada (26). Estudos mostraram que células mononucleares sanguíneas de pacientes com CCC quando expostas a lisados do *T. cruzi* apresentaram freqüência aumentada de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-gama (36). Corroborando a importância do IFN-gama e citocinas inflamatórias na patogênese da CCC, foi observado que células mononucleares do infiltrado inflamatório cardíaco produzem IFN-gama, TNF-alfa, IL-6 e IL-15; no entanto, houve pouca ou nenhuma produção de IL-4 e IL-10 (22, 25, 26).

Resultados recentes de nosso grupo, utilizando "microarray de cDNA", indicaram que diversos genes induzíveis por IFN-gama encontravam-se com

expressão aumentada em miocárdio de pacientes com CCC, mas não em pacientes com CDI, ambos em estágio terminal, em comparação a miocárdio de indivíduos em cardiomiopatias (37). Análises, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real, mostraram que citocinas induzidas por IFN-gama, como MCP-1/CCL2, IP-10 e MIG, estavam seletivamente mais expressas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (37). Além disso, alguns genes induzíveis por IFN-gama, não necessáriamente relacionados ao processo inflamatório, também estavam mais expressos no tecido cardíaco de pacientes com CCC (HSP cardiovascular 27kD, receptor de angiotensina II e proteína ligadora de ácidos graxos 5). Adicionalmente, o gene SERCA Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, envolvido no metabolismo cardíaco de cálcio e encontrado com expressão reduzida em miocárdio com CCC, é reprimível por IFN-gama, sugerindo que o IFN-gama poderia modular diretamente a expressão gênica em cardiomiócitos. A exposição de cardiomiócitos em cultura obtidos de camundongos recém-nascidos ao IFN-gama apenas ou em combinação com MCP-1 aumentou em 15 e 400 vezes, respectivamente, a expressão do fator natriurético atrial (ANF), envolvido na hipertrofia e falência cardíaca (figura 2).

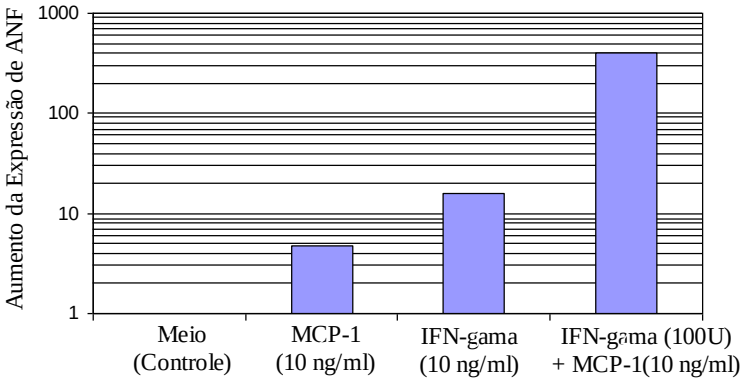


Figura 2. Modulação da expressão do fator natriurético atrial (ANF), em cardiomiócitos fetais, por IFN-gama e MCP-1.

Estes dados sugerem que a ação patogênica do IFN-gama produzido no miocárdio de pacientes com CCC, isoladamente ou em combinação com quimiocinas por ele induzidas, pode ser devida a sua capacidade de alterar a expressão gênica em cardiomiócitos, com importantes repercussões na indução do programa hipertrófico.

Dados do nosso grupo e da literatura mostraram que tanto pacientes com CCC como pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas apresentam níveis plasmáticos de TNF-alfa e MCP-1 maiores do que os de indivíduos saudáveis; sendo que os níveis de TNF-alfa e MCP-1 são ainda mais elevados entre os pacientes com CCC grave (34, 35).

Estudos já relacionaram o TNF-alfa e outras citocinas inflamatórias à hipertrofia, sugerindo que a inflamação miocárdica crônica poderia contribuir para a progressão da CCC. Camundongos transgênicos com maior expressão de MCP-1/CCL2 ou TNF-alfa no coração desenvolveram hipertrofia e dilatação (38, 39). Estudos também mostraram que MCP-1 pode induzir a produção de IL-1 beta e IL-6 por cardiomiócitos (40), e que IL-1 beta e o TNF-alfa podem induzir resposta hipertrófica em cardiomiócitos em cultura (41-43).

1.3. Cardiomiopatias de etiologia não inflamatória

Dados obtidos nos Estados Unidos da América indicam que 25% dos casos de insuficiência cardíaca são causados pela forma idiopática de cardiomiopatia. A cardiomiopatia dilatada idiopática é uma entidade clínica caracterizada pela dilatação

ventricular progressiva e redução da função ventricular esquerda ou biventricular, sem doenças associadas que possam explicar a alteração cardíaca (44).

A doença é tipicamente diagnosticada entre os 18 e 50 anos de idade, podendo atingir também crianças e idosos, atingindo em maior proporção homens. 25% dos casos são relacionados à transmissão genética, enquanto a maior parte restante são casos esporádicos. Nos casos esporádicos, supõe-se que fatores genéticos associados a alterações imunológicas e fatores infecciosos agiriam de forma sinérgica, levando ao quadro clínico heterogêneo. Dentre os possíveis fatores infecciosos, foi observado que o vírus coxsakie B estaria especialmente relacionado (45). Existem diversas hipóteses propondo mecanismos de lesão celular a partir da infecção viral, seja por lesão viral direta, por mecanismos imuno-mediados ou autoimunes (46).

O prognóstico varia conforme o grau de disfunção miocárdica e de complicações como arritmias e fenômenos tromboembolíticos. As arritmias são freqüentes e quando associadas à baixa função ventricular possuem correlação com risco de morte súbita (44).

Na fisiopatologia da cardiopatia isquêmica dois processos estão implicados: a oferta e a demanda de oxigênio pelo miocárdio. A isquemia miocárdica ocorre quando há desequilíbrio na oferta e na demanda de oxigênio. Por outro lado, duas situações alteram a oferta de oxigênio para o miocárdio: a isquemia e a hipoxemia. Em algumas condições, o comprometimento da oferta de oxigênio é secundário à diminuição do fluxo sanguíneo, sendo essa a fisiopatologia da maioria dos casos de infarto agudo do miocárdio e dos episódios de angina instável (47). Em outras situações, como a hipertrofia ventricular, o aumento na demanda de oxigênio é o

principal responsável pela isquemia miocárdica. Além disso, o sinergismo desses dois mecanismos é o principal fator na determinação de isquemia nos casos de angina crônica estável. O grau de obstrução da artéria responsável pelo episódio agudo, a ocorrência de lesões em outros vasos e o grau de circulação colateral são os determinantes mais importantes da diminuição da oferta; a pressão arterial sistêmica, a freqüência cardíaca, e a hipertrofia e contratilidade ventricular são as variáveis mais importantes na determinação da demanda de oxigênio. Apesar da contribuição de todos esses fatores na determinação da isquemia miocárdica, a doença aterosclerótica coronária é o fator mais importante na fisiopatogenia da cardiopatia isquêmica. A isquemia crônica pode resultar na morte de cardiomiócitos, remodelamento ventricular, fibrose, e dilatação do ventrículo esquerdo, podendo evoluir para a insuficiência cardíaca (48).

1.4. Hipertrofia de cardiomiócitos na insuficiência cardíaca

Como mencionado anteriormente, hipertrofia de cardiomiócitos foi observada em biópsias endomiocárdicas do ventrículo direito ou esquerdo de pacientes com CCC, CDI e CI (21). A hipertrofia do miocárdio é um dos primeiros eventos a ocorrer no desenvolvimento clínico da insuficiência cardíaca e um importante fator de morbidade e mortalidade. Em resposta a uma variedade de estímulos mecânicos/hemodinâmicos (sobrecarga de pressão/volume), hormonais (angiotensina II, endotelina 1, hormônio tireoidiano), e patológicos (TNF-alfa, interleucina 1-beta), o coração se adapta ao aumento da demanda de trabalho cardíaco pelo aumento da

massa muscular através do início da resposta hipertrófica. Os cardiomiócitos respondem ao estresse bioquímico através de diversos processos que levam à hipertrofia (41).

A chamada hipertrofia cardíaca fisiológica, que ocorre em atletas de elite, está associada ao aumento proporcional do comprimento e largura dos cardiomiócitos. Por outro lado, a síntese de sarcômeros em série caracteriza a hipertrofia excêntrica que ocorre em pacientes com cardiomiopatia dilatada, com um aumento relativamente maior no comprimento que na largura dos cardiomiócitos (49).

Análises dos aspectos celulares e moleculares da hipertrofia em cardiomiócitos em cultura mostraram que durante a hipertrofia ocorre um aumento no tamanho da célula na ausência de proliferação, um aumento da expressão de genes embrionários e um acúmulo de proteínas contráteis (49). Um aumento na expressão dos genes fetais (cadeia pesada de beta-miosina, alfa-actina e fator natriurético atrial - ANF) ocorre concomitantemente à diminuição de expressão da cadeia pesada de alfa-miosina e da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (41). Adicionalmente, nosso grupo observou, através de análise de “microarray”, que amostras de miocárdio de pacientes com CCC e com CDI apresentavam aumento de expressão gênica de ANF, e das proteínas sarcoméricas alfa-actina de músculo cardíaco esquelético, alfa-actina de músculo liso, cadeia leve de miosina-2, cadeia pesada de miosina cardíaca, cadeia pesada de miosina de músculo liso, e teletonina em comparação a indivíduos normais, demonstrando expressão gênica do perfil hipertrófico/embrionário (37).

1.5. Metabolismo energético na insuficiência cardíaca

O coração é altamente dependente de energia proveniente da mitocôndria para suas atividades contráteis e metabólicas. As mitocôndrias representam 30% do volume total dos cardiomiócitos e produzem 90% da energia celular através da geração de ATP.

O metabolismo energético cardíaco contém três principais componentes (figura 3). O primeiro é a utilização do substrato, consistindo da captação do substrato, ácidos graxos ou glicose, da quebra destes componentes pela beta-oxidação ou glicólise, e da utilização dos intermediários metabólitos resultantes do ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico). Em adultos, a energia é obtida primariamente pela oxidação de ácidos graxos. O segundo componente é a fosforilação oxidativa, produção de energia pela cadeia respiratória mitocondrial. A fosforilação do ADP por este mecanismo produz o fosfato de alta energia ATP, o qual é a fonte direta de energia para todas as reações com consumo de energia do coração. E o terceiro componente é a transferência e utilização do ATP pelas miofibrilas, mediado pelo sistema da creatina quinase. Neste, a creatina quinase mitocondrial catalisa a transferência da ligação fosfato de alta energia do ATP para a creatina formando a fosfocreatina e ADP. A fosfocreatina é uma molécula menor que o ATP e se difunde rapidamente da mitocôndria para as miofibrilas, onde a creatina quinase miofibrilar catalisa a produção do ATP a partir da fosfocreatina. A creatina livre difunde novamente para a mitocôndria.

Uma importante função do sistema da creatina quinase é agir como um tampão energético. Quando a demanda de energia supera a produção, o nível de

fosfocreatina cai, mantendo o nível de ATP, aumentando o nível do ADP livre. O aumento na quantidade de ADP livre estimula a produção de ATP pelo complexo da ATP sintase, no entanto, inibe a função de muitas enzimas intracelulares, causando uma falha nos mecanismos de contração do coração (50, 51).

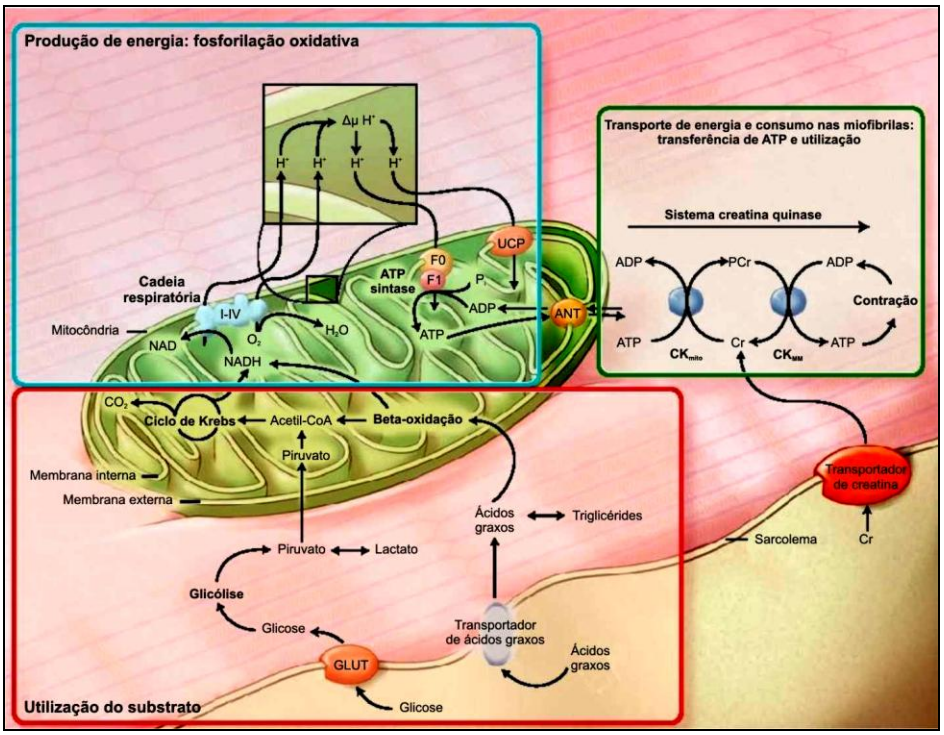


Figura 3. Metabolismo energético do coração.

Quadro vermelho: utilização do substrato, onde ocorre a captação do substrato e sua quebra pela glicólise ou beta-oxidação, resultando na acetil coenzima A (CoA), a qual é utilizada pelo ciclo de Krebs para produção de NADH e CO_2. Quadro azul: fosforilação oxidativa / produção de energia, onde os complexos da cadeia respiratória I-IV transferem elétrons do NADH para o oxigênio, gerando o gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu$ H+) na membrana interna da mitocôndria, que fará com que o complexo da ATP sintase produza ATP. Proteínas desacopladoras (UCPs) fazem a mitocôndria produzir calor ao invés de ATP. Quadro verde: transferência e utilização do ATP para o consumo nas miofibrilas, constituído pelo sistema da creatina quinase. GLUT: transportados de glicose; Pi: fosfato inorgânico; ANT: "adenine nucleotide translocase"; PCr: fosfocreatina; Cr: creatina, CKmit: creatina quinase mitocondrial; CKMM: creatina quinase miofibrilar (50).

Estudos mostram que muitas doenças cardíacas, as quais cursam com disfunção mecânica, estão associadas a uma diminuição de energia, especialmente quando os sistemas de transporte de ácidos graxos para a mitocôndria estão afetados, ou pela alteração de outras enzimas envolvidas no metabolismo energético (52, 53).

Resultados preliminares de nosso grupo analisando a expressão protéica diferencial, através da tecnologia de eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas e "peptide mass fingerprinting" (PMF – impressão digital protéica), indicaram que duas amostras de miocárdio de pacientes com CCC apresentaram expressão reduzida de diversas enzimas envolvidas no metabolismo energético celular em comparação com três amostras de miocárdio de pacientes com cardiomiopatia de etiologia não inflamatória (CNI), como a cardiomiopatia dilatada idiopática e a cardiomiopatia isquêmica. Para ilustrar a intensidade do fenômeno, pacientes com CCC apresentaram expressão média de isoformas da proteína identificada como creatina quinase muscular (CK-M) reduzida em 6 vezes em comparação com pacientes portadores de CNI.

Também foi observada a expressão reduzida do precursor mitocondrial da enzima aconitase em amostras de pacientes com CCC em relação às amostras de pacientes com CNI. Esta enzima participa do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) em duas etapas, na desidratação do citrato a cis-aconitase, e em seguida, na hidratação da cis-aconitase a isocitrato. Experimentos, utilizando análise proteômica diferencial, mostraram que camundongos deficientes para a enzima creatina quinase apresentavam uma diminuição da forma precursora da aconitase no tecido cardíaco em comparação a camundongos selvagens (54).

Adicionalmente, observamos no miocárdio de pacientes com CCC a diminuição na expressão da proteína ATP sintase alfa, uma subunidade do complexo enzimático da ATP sintase, em comparação com pacientes com CNI.

Nosso grupo também observou, através de experimentos utilizando "microarray de DNA", expressão aumentada, em comparação com miocárdio sem cardiomiopatia, de um número significativo de genes da fosforilação oxidativa e do catabolismo de lipídeos em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, mas não em amostras de pacientes com CDI (37). O aumento da expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa observado na CCC poderia ser um mecanismo compensatório à depleção de ATP (55). Na literatura, estudos de "microarray de cDNA" no coração de camundongos infectados por *T. cruzi* mostraram metabolismo energético diminuído e fosforilação oxidativa alterada (56). Adicionalmente, um estudo mostrou que camundongos infectados com *T. cruzi* apresentavam alterações nos complexos da cadeia respiratória (57).

Citocinas inflamatórias também podem alterar o metabolismo energético. Foi observado que o IFN-gama inibiu o metabolismo oxidativo em cardiomiócitos (58) e reduziu os níveis de ATP (59). Adicionalmente, estudos com cultura de células musculares humanas demonstraram que o IFN-gama poderia inibir a expressão gênica e protéica da creatina quinase destas células (60). Foi observado que a redução dos níveis de ATP e do metabolismo oxidativo induzida por IFN-gama ocorreria concomitantemente ao aumento da expressão de iNOS e a produção de óxido nítrico (NO) nos cardiomiócitos (58), sendo que o tratamento com inibidor de NO, o L-NMMA ("N-Monomethyl-L-Arginine"), manteve os níveis basais de ATP

(59). Estudos também mostraram que o NO inibiu a produção de energia em cardiomiócitos pela inibição da creatina quinase sarcomérica mitocondrial (61).

Assim, nossos resultados preliminares são compatíveis com a hipótese de que cardiomiócitos de pacientes com CCC poderiam apresentar uma menor eficiência em seu metabolismo energético, acarretando em depleção de ATP citoplasmático, que poderia estar relacionada ao pior prognóstico observado em pacientes com CCC quando comparado a outras cardiomiopatias não inflamatórias.

1.6. Análise proteômica em doenças cardiovasculares

Proteoma é definido como a composição de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo em um dado momento. O termo "Análise Proteômica" significa a análise simultânea de misturas complexas de proteínas, como lisados celulares e extratos de tecidos, com a principal finalidade de observar mudanças quantitativas nos níveis de expressão de proteínas. A análise proteômica é um estudo em larga escala que inclui a separação e identificação das proteínas, quantificação, determinação da função, caracterização de modificações pós-traducionais e estudos de interações protéicas (62).

Como métodos de análise, a eletroforese bidimensional ainda é o principal método de separação de misturas complexas. Combinada com a espectrometria de massas, centenas de proteínas podem ser separadas e identificadas.

A eletroforese bidimensional é um método amplamente utilizado para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos, ou outras amostras biológicas. Esta técnica separa proteínas através de duas propriedades em dois passos

distintos: a etapa da primeira dimensão, a focalização isoelétrica (IEF), separa as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI); e a etapa da segunda dimensão, a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), separa as proteínas de acordo com seu peso molecular (PM).

A resolução da eletroforese bidimensional foi consideravelmente melhorada por O´Farrell em 1975 (63). Também, a introdução do gradiente de pH imobilizado durante a primeira dimensão tornou a técnica reprodutível e aplicável para a análise proteômica (64).

Apesar de informações como o peso molecular e o pI da proteína obtidas pelo mapa bidimensional, apenas pela eletroforese não se tem a identificação exata da proteína. Desta maneira, a eletroforese bidimensional pode ser combinada com a identificação da proteína por espectrometria de massas. A maneira mais simples de identificação é através do "peptide mass fingerprinting" (PMF), ou impressão digital da proteína. Nesta, a proteína é digerida com enzima específica, resultando em fragmentos característicos da proteína; o peso molecular de cada fragmento é obtido por espectrometria de massas e com o auxílio de banco de dados, como "SwissProt" e "NCBInr", é realizada a identificação (65). Esta técnica depende da disponibilidade de informações como o genoma da espécie ou caracterização prévia da proteína. Uma forma mais precisa de identificação é o seqüenciamento da proteína, que também pode ser realizado por espectrometria de massas (MS/MS).

Apesar dos avanços da eletroforese bidimensional, a alta variação entre géis torna o procedimento de detecção e quantificação de proteínas complicado e limitado, sendo difícil distinguir reais variações biológicas de variações experimentais. Este problema tem sido superado com a introdução da Eletroforese

Bidimensional Diferencial ("Ettan™ DIGE System - 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis"). Nesta técnica, as amostras são previamente marcadas com diferentes corantes fluorescentes e misturadas antes da focalização isoelétrica, sendo que a separação das proteínas de várias amostras é realizada no mesmo gel bidimensional; o que permite a detecção precisa de mudanças na expressão (66).

A análise proteômica tem sido bastante aplicada no estudo de doenças cardiovasculares (67-70). Esta pode revelar mudanças que ocorrem em células e tecidos, podendo levar a novos diagnósticos, prognósticos e marcadores terapêuticos de doenças cardiovasculares. Para exemplificar, em estudos proteômicos em cardiomiopatia dilatada, foram encontradas cerca de 100 proteínas diferenciais, incluindo proteínas contráteis, proteínas associadas com produção de energia e proteínas relacionadas à resposta ao estresse (69).

Vários bancos de dados, com informações obtidas pela eletroforese bidimensional, estão disponíveis; como o HSC-2DPAGE (71); HP-2DPAGE (72); HEART-2DPAGE (73); e outros (70). Estes bancos de dados incluem imagens de géis bidimensionais de amostras de miocárdio com cerca de 6000 "spots" / proteínas; no entanto, foram identificadas menos de 400 destas proteínas. Estudos ainda precisam ser realizados para o mapeamento das principais proteínas envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Sendo assim, acreditamos que a análise proteômica poderia ajudar na elucidação de mecanismos patológicos envolvidos na cardiomiopatia chagásica crônica.

2. Objetivos

Visto que pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) evoluem para um pior prognóstico em comparação a pacientes com cardiomiopatias de etiologia não inflamatória, como cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) e cardiomiopatia isquêmica (CI), o objetivo geral deste trabalho é avaliar a expressão protéica diferencial no miocárdio destes pacientes e de indivíduos sem cardiomiopatia. Com este estudo pretendemos contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da CCC. Acreditamos que alterações no metabolismo energético cardíaco possam desempenhar um papel importante nestes mecanismos. Para tal, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar o perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC.
- Investigar proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia.
- Avaliar o metabolismo energético no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi purificada pelo sistema MilliQ (Millipore Corporation). Os reagentes utilizados foram de grau analítico das marcas Amersham Bioscience/GE, Merck ou Sigma. Nos procedimentos de eletroforese bidimensional foram utilizados reagentes da marca PlusOne. Os solventes utilizados foram de grau para HPLC. Todos os procedimentos envolvendo análise fluorescente foram realizados com o operador utilizando luvas sem talco, e as soluções filtradas em filtro com poros de 0,22µm.

3.2. Amostras de miocárdio humano

As amostras que foram utilizadas são provenientes de tecido miocárdico de pacientes com CCC, com CDI e com CI, submetidos ao transplante cardíaco. Fragmentos de explante de corações de portadores de CCC, CDI ou CI (aproximadamente 100 g da parede lateral do ventrículo esquerdo) são obtidos no centro cirúrgico durante o transplante cardíaco. Também são utilizadas amostras de miocárdio (parede lateral do ventrículo esquerdo) de corações saudáveis de doadores de órgãos, que por motivos técnicos não foram utilizados para transplante. As amostras são congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. A obtenção

das amostras é possível devido a uma colaboração entre o Laboratório de Imunologia e a equipe de transplantes do Centro Cirúrgico do INCOR-HC, coordenada pelo Prof. Dr. Noedir Stolf. Este trabalho foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração (SDC 2667/05/087), e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, através da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n° 852/05).

3.3. Extratos protéicos

Os extratos protéicos foram obtidos de diversas maneiras:

3.3.1. Nos experimentos da análise do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC, foi realizada a lise do tecido, utilizando solução de lise (1:10 w/v) contendo 10% de SDS e 0,5mM de TLCK ("*N*-tosyl-Llysine-chloromethyl ketone", um inibidor de proteases), com homogeneização mecânica (PowerGen, Fisher Scientific). As amostras foram preparadas de modo que estivessem livres de contaminantes como sais, proteases e outras biomoléculas. O homogenato foi então sonicado por três ciclos de 10 seg. cada a 10 Watts (60 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific) e centrifugado a 12.000 g por 30 min. para retirar debris celulares, e em seguida, concentrado por filtração com membrana de "cut off" de 5 kDa. A concentração das proteínas foi medida utilizando o kit comercial "BCA Protein Assay Reagent Kit" (Pierce Biotechnology).

3.3.2. Para da técnica DIGE, as amostras não podem conter nenhum reagente com aminas primárias livres e nem detergente iônico. Assim, o homogenato protéico foi realizado utilizando solução de lise (1:10 w/v) contendo 7M de uréia, 10mM de Tris, 5mM de acetato de magnésio e 4% de CHAPS, pH=8,0, com homogeneização mecânica (PowerGen, Fisher Scientific). Em seguida, foi sonicado por três ciclos de 10 seg. cada a 10 Watts (60 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific), centrifugado a 12.000 g por 30 min., e o sobrenadante coletado para quantificação das proteínas pelo método "Bradford" (BioRad). Estes extratos também foram utilizados para a análise da expressão protéica diferencial por "Western-Blotting".

3.3.3. Para os experimentos de medida da atividade enzimática da creatina quinase, 20mg de tecido foi lisado em solução (1:20 w/v) contendo 0,32M de sacarose, 10mM de HEPES e 1mM de EDTA, pH=7,4, com homogeneização mecânica (PowerGen, Fisher Scientific). Em seguida, foi sonicado por três ciclos de 10 seg. cada a 10 Watts (60 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific), centrifugado a 10.000 g por 30 min., e o sobrenadante coletado para quantificação das proteínas pelo método "Bradford" (BioRad).

3.4. Análise Proteômica

3.4.1. Eletroforese bidimensional

Este procedimento consiste de duas etapas, a primeira dimensão, na qual as proteínas são separadas pelo seu ponto isoelétrico, e a segunda dimensão (SDS-PAGE), onde há a separação por peso molecular.

TÉCNICA DIGE ("2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis"): Nesta técnica, a separação de proteínas de várias amostras, marcadas com diferentes fluoróforos, ocorre em um mesmo gel, permitindo a detecção precisa de mudanças na expressão. Variações na intensidade dos "spots" devido a fatores experimentais, como por exemplo, a perda de proteínas durante a entrada da amostra na tira de pH imobilizado, serão as mesmas para todas as amostras. A normalização da quantidade de cada proteína entre múltiplos géis de um experimento é realizada utilizando um padrão interno, constituído por uma mistura de todas as amostras ("pool"), que é adicionado em cada gel de um experimento.

3.4.1.1. Primeira dimensão

A primeira dimensão foi realizada no sistema de focalização isoelétrica "Ettan IPGphor" (Amersham Biosciences/GE healthcare). Esta etapa foi realizada de maneiras diferentes dependendo do experimento.

3.4.1.1.1. Experimentos da análise do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC e da análise da expressão protéica diferencial com coloração

por “Coomassie Blue”: As tiras de pH imobilizado (“IPG strip”) na faixa de pH de 3 a 10 em gradiente linear, 24 cm, foram reidratadas, por no mínimo 12 horas, com solução de reidratação “DeStreak Rehydratation Solution” contendo 0,5% de “IPG buffer 3-10L” (Amersham Biosciences/GE healthcare). Nesta solução foi adicionada a amostra (600µg de proteínas), assim conforme a tira fosse reidratando as proteínas penetrariam nesta. Após a reidratação, as tiras foram posicionadas no “IPG strip holder” com a extremidade ácida voltada para o ânodo. Os eletrodos foram colocados nas extremidades da tira e o conjunto foi levado à plataforma do “Ettan IPGphor” (Amersham Biosciences/GE healthcare) para a focalização isoelétrica de forma que no final da focalização fossem acumulados 64 kV.

3.4.1.1.2. Experimentos da análise da expressão protéica diferencial com marcação fluorescente (técnica DIGE): As tiras de gradiente de pH imobilizado na faixa de pH de 3 a 11 em gradiente não linear de 24 cm (“IPG strip”) foram reidratadas, por no mínimo 12 horas, com solução de reidratação “DeStreak Rehydratation Solution” contendo 0,5% de “IPG buffer 3-11NL” (Amersham Biosciences/GE healthcare). As amostras foram previamente marcadas com fluoróforos (Cy2, 3, ou 5 - Amersham Biosciences/GE healthcare), utilizando 400pmol de fluoróforo para 50µg de proteínas. Às amostras em uma concentração de 5µg/µL de proteínas e pH=8,5, foi adicionado o fluoróforo (400pmol/µL) previamente reconstituído com DMF (dimetilformamida). A reação ocorreu no gelo por 30 min., e após este tempo 1µL de lisina 10mM foi adicionado para parar a reação. As amostras foram marcadas com os fluoróforos Cy3 ou Cy5, e o “pool”, contendo todas as amostras do experimento, foi marcado com o fluoróforo Cy2. Este procedimento foi realizado para a preparação dos géis analíticos; no entanto, para

posterior identificação das proteínas um gel preparativo também foi realizado. Para este, uma amostra contendo 500µg de proteínas do “pool” (400 ug sem marcação e 50 ug marcada por Cy2) foi aplicada à tira de pH imobilizado por reidratação. Os eletrodos foram colocados nas extremidades das tiras, e o conjunto foi levado à plataforma do “Ettan IPGphor” (Amersham Biosciences/GE healthcare) para a focalização isoelétrica de forma que no final da focalização fossem acumulados 64 kV.

3.4.1.2. Segunda dimensão

Após a focalização isoelétrica, as tiras foram submetidas a duas etapas de equilíbrio para a preparação das proteínas para a segunda dimensão. A primeira etapa, a redução das proteínas, foi realizada com a solução de equilíbrio (50mM de tris-HCl, 6M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS e 0,002% de azul de bromofenol, pH=8,8) acrescida de 10 mg/mL de DTT (ditiotreitol) por 15 min. A segunda, alquilação das proteínas, foi realizada com a solução de equilíbrio acrescida de 25 mg/mL de iodoacetamida por 15 min.

A segunda dimensão foi realizada em cuba de eletroforese vertical “Ettan Daltsix” (6 géis de 25,5 x 20,5 cm) (Amersham Biosciences/GE healthcare). Para a realização dos géis com amostras marcadas com o fluoróforo, foram utilizadas placas de vidro de baixa fluorescência. Os géis de poliacrilamida foram de 12,5%, sobre os quais as tiras foram posicionados. O conjunto foi então selado com agarose 0,5% em tampão de eletroforese. A corrida eletroforética foi realizada em tampão contendo 25mM de tris-HCl, 192mM de glicina, e 0,1% de SDS, pH=8,3, com uma potência

de 2,5 W/gel por 30 min., e em seguida 100W totais até o final da corrida. Para manutenção da temperatura a 20ºC na cuba “DaltSix”, foi utilizado um resfriador “MultiTemp III” (Amersham Biosciences/GE healthcare) na temperatura de 10ºC.

3.4.1.3. Coloração dos géis bidimensionais

Após a segunda dimensão, os géis foram fixados em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. Em seguida, os géis forma corados de acordo com o experimento:

3.4.1.3.1. Coloração por “Coomassie Blue R-250”: Os géis foram corados em uma solução contendo 0,1% de Coomassie R-250, 40% de metanol e 10% de ácido acético, por no mínimo 1 hora. Em seguida os géis foram descorados em solução contendo 20% de etanol e 5 % de ácido acético. Os géis foram mantidos em solução contendo 15% de etanol.

3.4.1.3.2. Coloração por “Coomassie Blue Colloidal”: Os géis foram corados em uma solução contendo 8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico, 0,08% de Coomassie Blue G-250 e 20% de metanol, por aproximadamente 5 dias. Em seguida os géis foram descorados em água. Os géis foram mantidos em solução contendo 15% de etanol.

Os géis com amostras marcadas com fluoróforos não passaram por esta etapa de coloração.

3.4.2. Aquisição das imagens dos géis bidimensionais

Os géis corados com “Coomassie Blue R-250” ou “Coomassie Blue Colloidal” foram escaneados pelo equipamento “ImageScanner” (Amersham Biosciences/GE healthcare), utilizando filtro verde, modo transparente e 300dpi de resolução.

Os géis contendo amostras marcadas com fluoróforos ou corados com “Deep Purple” foram escaneados pelo equipamento “Typhoon 9410 Variable Mode Imager” (Amersham Biosciences/GE healthcare), usando os seguintes parâmetros: Cy2, 488nm de excitação e filtro de emissão de 520nm BP 40nm; Cy3, 532nm de excitação e filtro de emissão de 580nm BP 40nm; Cy5, 633nm de excitação e filtro de emissão de 670nm BP 40nm; e “Deep Purple”, 532nm de excitação e filtro de emissão de 610nm BP 30nm. Os géis foram escaneados com resolução de 100micra, e a sensibilidade variou de 450 a 550 PTM.

3.4.3. Análise dos géis bidimensionais

A detecção e análise dos “spots” correspondentes às várias proteínas presentes nos géis bidimensionais foram realizadas utilizando os seguintes programas:

3.4.3.1. Para a análise do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC foi utilizado o programa “ImageMaster 2D Elite” (Amersham Biosciences/GE healthcare). O volume dos “spots” foi calculado pelo programa, e deste foi descontado o valor do “background”. O volume de cada “spot” foi normalizado em relação à soma do volume total dos “spots” selecionados. A partir de

referências colocadas nos géis, foi gerada uma lista das coordenadas dos “spots” para a retirada automatizada dos fragmentos de gel contendo as proteínas.

3.4.3.2. Para a análise da expressão protéica diferencial entre miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e de indivíduos sem cardiomiopatias (N) foi utilizado o programa “Melanie 6.0” (GeneBio). Neste, os “spots” foram selecionados automaticamente, e a análise diferencial foi realizada a partir dos volumes normalizados dos “spots” (volume do “spot” dividido pela soma do volume total dos “spots” selecionados) e utilizando o gel do grupo N como referência.

3.4.3.3. A análise da expressão protéica diferencial utilizando a técnica DIGE foi realizada com auxílio do programa “DeCyder Differential Analysis” (Amersham Biosciences/GE healthcare), o qual é constituído dos módulos:

- “Differential In-gel Analysis” (DIA): Este programa realiza a co-detecção das 3 imagens do gel, a subtração do ruído (“background”), quantificação, normalização e comparação das amostras marcadas com cada um dos fluoróforos presentes em um mesmo gel (análise intra-gel).
- “Biological Variation Analysis” (BVA): Realiza a comparação entre vários géis contendo as outras amostras do experimento e realiza a análise estatística (análise inter-géis).
- “Extended Data Analysis” (EDA): Este módulo é usado para análise multivariável de dados da expressão protéica diferencial, permitindo o estudo de padrões de expressão.

O volume de cada “spot” foi normalizado em relação à soma do volume total dos “spots” selecionados e os géis foram normalizados entre si utilizando a imagem do “pool” de amostras marcado com Cy2. Análises estatísticas, utilizando o teste

“One Way Anova” e o teste t de *Student*, foram realizadas para comparar a expressão protéica em diferentes amostras. A partir de referências colocadas nos géis preparativos, foi gerada uma lista das coordenadas dos “spots” para a retirada automatizada dos fragmentos de gel contendo as proteínas.

3.4.4. Processamento dos “spots” para identificação protéica

Após a detecção dos “spots”, estes foram retirados do gel e processados por sistema automatizado “Ettan Spot Handling Workstation” (Amersham Biosciences/GE healthcare). Este sistema retira os “spots” do gel e realiza uma programação de digestão tríptica “in gel”. Após esta etapa, os fragmentos peptídicos, produtos da digestão tríptica, são extraídos do gel para posterior análise por espectrometria de massas. O protocolo utilizado consiste basicamente em descorar os “spots” de gel com soluções contendo bicarbonato de amônio e acetonitrila. O “spot” de gel é seco e, então, adiciona-se a enzima tripsina (1,6mg/mL em bicarbonato de amônio 20mM). A digestão é realizada a 37ºC por 6 horas. Em seguida, o produto da digestão tríptica é extraído com uma solução contendo 50% de acetonitrila e 0,45% de TFA (ácido trifluoroacético). O produto é então seco e ressuspendido em 5µL de uma solução contendo 50% de acetonitrila e 0,5% de TFA.

3.4.5. Análise por espectrometria de massas

Para a análise do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC foi utilizado o seguinte procedimento: Uma alíquota (0,5µL) do produto da

digestão tríptica foi colocada sobre uma lâmina (“slide”) e acrescido de 0,5µL de matriz, o “ACH-Cinnamic Acid”. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-ToF, “Matrix assisted laser desorption / ionization – Time-of-Flight, Ettan MALDI-ToF/Pro” (Amersham Biosciences/ GE healthcare). A análise foi realizada no modo “Reflectron”, positivo.

A análise da expressão protéica diferencial utilizando a técnica DIGE foi realizada utilizando o seguinte procedimento: Uma alíquota (1µL) do produto da digestão tríptica foi colocada sobre uma lâmina (“slide”) e acrescido de 1,5µL de matriz, o “ACH-Cinnamic Acid”, contendo os peptídeos bradicinina (PM=904,46kDa) e hormônio adrenocorticotrófico (PM=2465,19kDa), utilizados como calibrante interno. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF, “Matrix assisted laser desorption / ionization – Time-of-Flight, Ultraflex III” (Bruker). A análise foi realizada no modo “Reflectron”, positivo. Esta análise foi realizada em colaboração com o Setor de Espectrometria de Massa dos Laboratórios de Medicina Molecular (MML) da empresa Hoffmann-LaRoche (Basiléia, Suíça).

O resultado obtido, para ambas as análises, foi uma lista de valores que correspondem à razão massa/carga (m/z) de cada peptídeo presente na amostra, sendo que quando a carga é 1, o valor da razão massa/carga corresponde ao peso molecular do peptídeo. A lista de pesos moleculares obtidos para cada “spot”/proteína é característico de uma dada proteína e chamada de “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF).

3.4.6. Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada por comparação dos valores de PMF de uma dada amostra com valores de PMF resultantes da digestão tríptica teórica de uma série de proteínas depositadas em banco de dados, como o "SwissProt". Para identificação das proteínas utilizamos o programa "Ettan MALDI-ToF Evaluation" (Amersham Biosciences/ GE healthcare), que utiliza o banco de dados "NCBInr (non redundant)", ou a ferramenta "Mascot" disponível na "internet" (www.matrixscience.com), submetendo a lista de pesos moleculares a uma busca no banco de dados "SwissProt" com um erro tolerável de 0,7 Da, e limitando os resultados às proteínas pertencentes à espécie *Homo Sapiens*.

Nas análises realizadas em colaboração com a empresa Hoffmann-LaRoche foi utilizado a ferramenta "Poseidon", o qual utiliza o banco de dados "SwissProt".

3.4.7. Análise funcional de proteínas

A análise funcional de proteínas expressas no miocárdio foi realizada utilizando-se ferramentas de bioinformática como o "Locus Link" (www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink) e o FatiGO (http://fatigo.bioinfo.cnio.es), e com o auxílio da classificação "Gene Ontology". Os nomes e siglas, assim como o número de acesso das proteínas foram obtidos pela ferramenta Uniprot (www.uniprot.org).

3.5. Análise da expressão protéica por “Western Blotting”

Os extratos das amostras de miocárdio contendo 30µg de proteínas foram aquecidos por 5 min. a 95°C, e submetidas à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), utilizando gel de poliacrilamida 12,5%. Para este procedimento foi utilizado o sistema de eletroforese vertical “SE600 Ruby” (Amersham Biosciences/GE healthcare). Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema “TE Semi-Dry transfer Unit” (Amersham Biosciences/GE healthcare). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos monoclonais. Para a validação de algumas proteínas encontradas na análise do perfil de expressão protéica em miocárdio de pacientes com CCC foram utilizados os anticorpos: anti- HSP 60, anti-PDI (proteína dissulfito isomerase), anti-SOD (superóxido dismutase Cu/Zn), anti-caspase 8 e anti-caspase 2 (Stressgen Bioreagents). Os anticorpos foram gentilmente cedidos pelos Drs. Célio X. Santos, Francisco Laurindo e Gustavo Amarante-Mendes (Universidade de São Paulo). Para a análise da expressão diferencial de proteínas envolvidas no metabolismo energético foram utilizados os anticorpos: anti-ATP sintase F1F0 alfa e anti-ATP sintase F1F0 beta (Molecular Probes), anti-creatina quinase mitocondrial e anti-creatina quinase M/B (“muscular/brain”) (Santa Cruz), e o anticorpo policlonal anti-GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (R&D System). Em seguida, cada membrana foi submetida à incubação com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase e revelada por quimioluminescência, utilizando o kit “ECL Plus Western Blotting Detection

Reagents" (Amersham Biosciences/GE healthcare) e detecção por equipamento de raios-X.

A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa "ImageQuant TL" (Amersham Biosciences/GE healthcare).

3.6. Análise da expressão de RNAm por RT-PCR em tempo real

3.6.1. Extração de RNA e transcrição em cDNA

O RNA total de amostras de ventrículo esquerdo (50mg) foi extraído, utilizando o método com trizol. Basicamente, o tecido foi homogeneizado com trizol, em seguida o RNA foi separado, utilizando clorofórmio, e precipitado, utilizando álcool isopropílico. O RNA foi então lavado com solução contendo 70% de etanol e ressuspendido em água livre de RNase (água DEPC).

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (DU530, Beckman) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre os valores obtidos na leirturas com 260 e 280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores acima de 1,6. Para o cálculo da concentração da amostra, considerou-se que a absorbância igual a 1 corresponde a 40µg de RNA/mL no comprimento de onda de 260nm. Além disso, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para visualização da integridade das amostras e também de possíveis contaminações com DNA.

Após constatação da qualidade e pureza do RNA, possíveis contaminações com DNA foram eliminadas através do tratamento das amostras com DNase I. A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 5µg de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa ("Super-script II™ Reverse Transcriptase", Invitrogen). Para este protocolo foi adicionado ao RNA, 1µL de oligodT (500 µg/mL), 1µL de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC para um volume final de 12µL. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 min. em termociclador (MJ research). Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação, 4µL de tampão de transcrição 5x (250mM de tris-HCl, 375mM de KCl e 15mM de $MgCl_2$, pH 8,3), 2µL de DTT 0,1M e 1µl de inibidor de RNase (40U/µL) ("RNAse OUT™", Invitrogen). As amostras foram então colocadas em termociclador a 42°C por 5 min. Por último foi adicionado, 1µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL), e a solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 50 min. seguidos de 70°C por 15 min.

3.6.2. Reação de RT-PCR em tempo real

Os "primers" utilizados nas reações de amplificação foram desenhados com auxílio do programa "Primer Express" (Applied Biosystems). As reações de RT-PCR (transcriptase reversa - reação de polimerização em cadeia) em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente "SYBR-Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems) e o equipamento "Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System" (Applied Biosystems). A reação foi realizada em 40

ciclos de 15 seg. a 94ºC e 1 min. a 60ºC, de acordo com o manual de instruções do fabricante. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^{+} - Rn^{-}$), onde Rn^{+} = intensidade de emissão do "SYBR-Green" / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e Rn^{-} = intensidade de emissão do "SYBR-Green" / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência emitida pelo "SYBR-Green" aumenta à medida que este se liga nas duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn, que é uma linha de corte ("Threshold") para cada curva de amplificação de um dado par de "primers". O número do ciclo em que a ΔRn cruza o "threshold" corresponde ao Ct ("cycle threshold") da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de RNA mensageiro (RNAm) alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como gene de referência o GAPDH. A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) é $QR = 2^{\Delta\Delta Ct}$, onde ΔCt= Ct gene alvo – Ct gene referência, e ΔΔCt= ΔCt amostra - ΔCt controle.

A especificidade dos "primers" de amplificar um único produto foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 min., 60°C por 1 min. e 95°C por 1 min. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao

aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio, que mantém as duplas fitas unidas, se rompem, o "SYBR-Green" é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o produto de amplificação está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de apenas um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou "melting point" (Tm) do produto de amplificação ("amplicon").

3.6.3. Cálculo da eficiência de amplificação dos primers utilizados

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cálculo da expressão gênica assume que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência é igual a 2, ou seja, 100%. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/slope)}$, onde E corresponde à eficiência e "slope" corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada gene estudado, utilizando o par de "primers" específico, foram realizadas uma reações com diluições seriadas de amostra de cDNA (1/5 a 1/1250, fator 5). Os valores de Ct obtidos foram plotados em gráfico para cálculo do "slope" e da eficiência. Somente os "primers" que apresentaram 100% de eficiência foram utilizados nas análises.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão em amostras de miocárdio

A análise da ultraestrutura do tecido cardíaco foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram preparadas fixando-as com solução contendo 4% de glutaraldeído e 0,1% de cacodilato de sódio. Em seguida, foram pós-fixadas com solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,1% de cacodilato de sódio, e coradas usando acetato de uranila aquoso 0,5% (74). Os procedimentos foram realizados pelo Serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto do Coração (INCOR-HC-FMUSP), em colaboração com o Dr. Luiz Benvenutti.

3.8. Análise histopatológica das amostras de miocárdio

Fragmentos do miocárdio (parede lateral do ventrículo esquerdo) foram fixados em solução tamponada (pH=7,2) contendo 10% de formalina e posteriormente processados pelo método de inclusão em parafina. Os fragmentos foram cortados transversalmente em secções de 5-7µm e submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Os procedimentos foram realizados pelo Serviço de Patologia do Instituto do Coração (INCOR-HC-FMUSP), em colaboração com o Dr. Luiz Benvenutti.

3.9. Medida da atividade enzimática da creatina quinase

A medida da atividade enzimática da creatina quinase total das amostras de miocárdio foram realizadas com extratos obtidos de acordo com o item 3.3.3., e utilizando o teste CK-NAC (Doles). Basicamente, este método consiste em um sistema cinético para determinação da atividade enzimática da creatina quinase. A creatina quinase catalisa a reação de transfosforilação de ADP a ATP. Uma série de reações enzimáticas acopladas produz NADH em concentração diretamente proporcional à atividade enzimática de creatina quinase na amostra.

$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{Creatina} + \text{ATP} + \text{íon Fosfato}$$

$$\text{ATP} + \text{Glicose} \xrightarrow{\text{HK}} \text{ADP} + \text{Glicose-6-Fosfato}$$

$$\text{Glicose-6-Fosfato} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{6-Fosfogluconato} + \text{NADH}$$

CK: Creatina Quinase
HK: Hexoquinase
G6PDH: Glicose 6-Fosfato Desidrogenase

A análise foi realizada em um espectrofotômetro UV/Vis U-2001 (Hitachi), monitorando o aumento da absorbância de NADH por minuto, em comprimento de onda de 340nm, utilizando cubeta de quartzo termostatizável em 37°C, através do sistema “MultiTemp III” (Amersham Biosciences/GE healthcare). A medida da atividade enzimática é dada em unidade internacional (U); onde uma U de creatina quinase é a quantidade de enzima que oxida 1µmol/L de NADH por minuto. A medida foi normalizada pela quantidade de proteína presente na amostra.

3.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa "GraphPad Prism 4 for Windows" (GraphPad Software Inc.). As análises das proteínas diferencialmente expressas, utilizando a técnica DIGE, foram realizadas com o auxílio do programa "DeCyder" (Amersham Biosciences/GE healthcare).

4. Resultados

A seção de resultados deste trabalho está subdividida em quatro partes:

Primeiramente fazemos uma caracterização das amostras de miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia utilizadas nos experimentos.

A seguir, mostraremos o estudo realizado sobre o perfil de expressão protéica em miocárdio de pacientes com CCC; este se trata de um estudo basicamente qualitativo, no qual visamos analisar a distribuição das proteínas por classes funcionais.

A próxima parte trata-se do estudo proteômico diferencial entre amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias; neste estudo focaremos apenas nas proteínas diferenciais, em especial, nas proteínas envolvidas no metabolismo energético. Nesta etapa também mostraremos um estudo de padrões de expressão protéica entre as cardiomiopatias.

E por fim, mostraremos a avaliação de enzimas envolvidas no metabolismo energético no miocárdio dos pacientes com CCC, CDI e CI em comparação ao miocárdio de pacientes sem cardiomiopatias, através da medida da atividade enzimática, expressão de RNA mensageiro, e níveis protéicos.

4.1. Caracterização das amostras de miocárdio humano

Neste estudo, foram utilizadas amostras da parede lateral do ventrículo esquerdo do miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) e cardiomiopatia isquêmica (CI), submetidos ao transplante; e de corações de indivíduos com morte encefálica, sem cardiomiopatia (N-normal), que doaram seus órgãos e que por motivos técnicos o coração não pôde ser utilizado para o transplante.

As tabelas abaixos mostram informações sobre os pacientes, cujas amostras foram utilizadas nos experimentos. A tabela 1 mostra dados clínicos dos pacientes, como a fração de ejeção (FE) e o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), também cita se o paciente estava na lista de prioridades para o transplante cardíaco. Os pacientes em lista de prioridade em geral possuem um pior prognóstico e estão fazendo uso de drogas vasoativas, como catecolaminas; e podem também, dependendo de seu estado clínico, estar fazendo uso de assistência circulatória mecânica (balão intra-aórtico).

A tabela 2 mostra os pacientes, cujas amostras de miocárdio, foram utilizadas em cada experimento. Infelizmente, não foi possível a realização de todos os experimentos utilizando-se todas as amostras, pois as amostras são restritas em quantidade e, para algumas amostras, certos experimentos foram realizados em data anterior à da sua captação.

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes cujas amostras de miocárdio foram utilizadas no estudo.

Etiol.	*Pacientes*	*Sexo*	*Idade*	*FE (%)*	*DDVE (cm)*	*SC (m^2)*	*Priorização*	*Hipert.*	*Fibrose*	*Miocardite*
Cardiomiopatia Chagásica Crônica	CCC-01	M	50	11	82	1,453	N	S	2+	2/3+
	CCC-02	F	49	37	77	1,435	N	S	3+	3+
	CCC-03	F	23	39	78	1,658	S (Catec.)	S	2+	2/3+
	CCC-04	F	61	15	76	1,747	S (Catec.)	S	1+	1+
	CCC-05	F	44	21	70	1,475	S (Catec.)	S	1+	0/1+
	CCC-06	M	15	17	62	1,613	S (Catec.)	S	1+	1+
	CCC-07	F	49	15	83	1,425	S (Catec.)	S	2+	3+
	CCC-08	M	28	21	68	1,848	S (Catec.)	S	2+	2/3+
	CCC-09	F	54	36	62	1,71	S (Catec.)	S	2+	2+
	CCC-10	M	58	29	64	1,872	N	S	2+	2+
	CCC-11	M	57	29	71	1,642	N	S	1+	2/3+
	CCC-12	F	60	20	72	1,614	N	S	2+	3+
	CCC-13	F	61	27	77	1,738	N	S	1/2+	0
	CCC-14	F	50	23	61	1,665	S (Catec.)	S	2/3+	3+
	CCC-15	M	32	12	75	1,844	S (Mecan.)	S	2/3+	3+
	CCC-16	M	36	25	68	1,670	N	S	1+	2+
	CCC-17	M	59	17	64	1,375	S (Catec.)	S	2+	3+
Cardiomiopatia Dilatada Idiopática	CDI-01	M	38	16	88	1,784	S (Catec.)	S	0/1+	0
	CDI-02	M	53	19	77	1,566	S (Catec.)	S	1/2+	0
	CDI-03	M	55	25	51	1,866	S (Catec.)	S	3+	0
	CDI-04	M	56	16	99	1,848	S (Catec.)	S	2+	0
	CDI-05	M	15	-	-	1,772	S (Arritmia)	S	2+	0
	CDI-06	M	36	14	62	1,844	S (Catec.)	S	0/1+	0
	CDI-07	F	12	22	75	1,334	S (Catec.)	S	0/1+	1+
	CDI-08	F	58	17	78	1,555	N	S	2+	0
	CDI-09	F	53	27	74	1,435	N	S	1+	0
	CDI-10	M	61	27	76	1,913	S (Catec.)	S	3+	0
	CDI-11	M	15	29	94	1,918	S (Catec.)	S	2+	1+
Cardiomiopatia Isquêmica	CI-01	M	62	37	75	1,491	N	S	2/3+	0
	CI-02	M	61	33	79	1,892	S (Catec.)	S	3+	0
	CI-03	M	52	20	62	1,859	N	S	3+	0
	CI-04	M	63	25	74	1,847	S (Mecan.)	S	2+	0
	CI-05	M	49	25	76	1,790	S (Catec.)	S	1+	0
	CI-06	M	55	16	83	1,776	S (Catec.)	S	2+	0

A tabela mostra os dados clínicos dos pacientes, cujas amostras de ventrículo esquerdo foram utilizadas no estudo. Etiol.: etiologia; FE: fração de ejeção (em porcentagem); DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (em cm); Sup. Corpórea: superfície corpórea (em cm^2); Priorização: S (sim – paciente em lista de prioridade para o transplante), N (não – paciente sem prioridade para o transplante), Catec.: Paciente em prioridade por fazer uso de drogas vasoativas / catecolaminas, Mecan.: Paciente em prioridade por, além de fazer uso de drogas vasoativas, também fazia uso de assistência circulatória mecânica / balão intra-aórtico, Arritmia: Paciente em priorização por apresentar quadros de arritmia; Hipert.: Presença (S-sim) ou ausência (N-não) de hipertrofia; Miocardite e Fibrose: Valores referentes a presença: 0: ausente, 1+: discreto, 2+: moderado, 3+: intenso. Hipertrofia, miocardite e fibrose determinados por estudos histopatológicos.

Tabela 2. Amostras de miocárdio humano (ventrículo esquerdo) utilizadas nos experimentos.

Informações das Amostras de Miocárdio					*CCC*	*Análises NxCCCxCDIxCI*						
Etiol.	***Pacientes***	***Sexo***	***Idade***	***Captação***	***Perfil Prot.***	***Prot. Coom.***	***WB***	***DIGE***	***RT PCR***	***Ativ. CK***	***HE***	***ME***
Cardiomiopatia Chagásica Crônica	CCC-01	M	50	10/1/2001		X	X	C1	X			
	CCC-02	F	49	3/1/2001		X	X		X			
	CCC-03	F	23	1/6/2004	X				X			
	CCC-04	F	61	18/8/2004	X				X			
	CCC-05	F	44	16/11/2004					X			
	CCC-06	M	15	6/4/2005				B1				X
	CCC-07	F	49	10/10/2005				A1				
	CCC-08	M	28	14/10/2005		X	X	B2		X		
	CCC-09	F	54	9/1/2006				A3		X		
	CCC-10	M	58	18/5/2006		X	X	C3	X	X		
	CCC-11	M	57	23/12/2006		X	X	C2	X	X		
	CCC-12	F	60	14/3/2007				A4		X	X	
	CCC-13	F	61	4/4/2007						X		
	CCC-14	F	50	3/8/2007				A2	X	X	X	X
	CCC-15	M	32	10/7/2008				B3				
	CCC-16	M	36	27/8/2008				B4				
	CCC-17	M	59	2/9/2008				C4				
Cardiomiopatia Dilatada Idiopática	CDI-01	M	38	15/7/2004			X		X			
	CDI-02	M	53	8/9/2004		X	X	E1	X	X		
	CDI-03	M	55	4/5/2007		X	X	E2	X	X	X	
	CDI-04	M	56	3/7/2007		X	X	E3	X	X	X	
	CDI-05	M	15	6/8/2007					X	X		
	CDI-06	M	36	9/11/2007		X	X		X	X		X
	CDI-07	F	12	12/11/2007						X		
	CDI-08	F	58	3/3/2008		X			X	X	X	
	CDI-09	F	53	18/3/2008						X		
	CDI-10	M	61	13/7/2008				E4				
	CDI-11	M	15	13/8/2008								
Cardiomiopatia Isquêmica	CI-01	M	62	1/6/2000		X	X		X			
	CI-02	M	61	13/4/2000		X	X	D2	X	X		
	CI-03	M	52	4/6/2007		X	X	D3	X	X	X	X
	CI-04	M	63	25/10/2007		X	X		X	X		
	CI-05	M	49	19/11/2007		X	X	D1		X		
	CI-06	M	55	4/4/2008				D4		X	X	
Ausência de Cardiopatia	N-01	M	40	9/11/206		X	X	F4	X	X		X
	N-02	M	22	14/11/2006		X	X	F2	X	X		
	N-03	M	46	11/12/2006			X		X	X	X	
	N-04	M	17	24/5/2007		X	X	F1	X	X	X	
	N-05	M	28	6/7/2007		X	X	F3	X	X	X	

A tabela relaciona as amostras utilizadas em cada experimento. Etiol.: etiologia; Perfil Prot.: análise do perfil de expressão protéica; Prot. Coom.: análise da expressão protéica com géis bidimensionais corados com "coomassie blue"; WB: análise da expressão protéica por "Western-blotting"; DIGE: análise da expressão protéica com marcação fluorescente; RT-PCR: análise da expressão de mRNA por "real time RT-PCR"; Ativ. CK: medida da atividade enzimática da creatina quinase; HE: análise histopatológica com coloração por HE; ME: análise da ultraestrutura do tecido por microscopia eletrônica.

A figura abaixo (figura 4) mostra um coração de um paciente com CCC, onde podemos observar áreas de intensa fibrose, dilatação do ventrículo esquerdo e regiões de trombose evidentes.

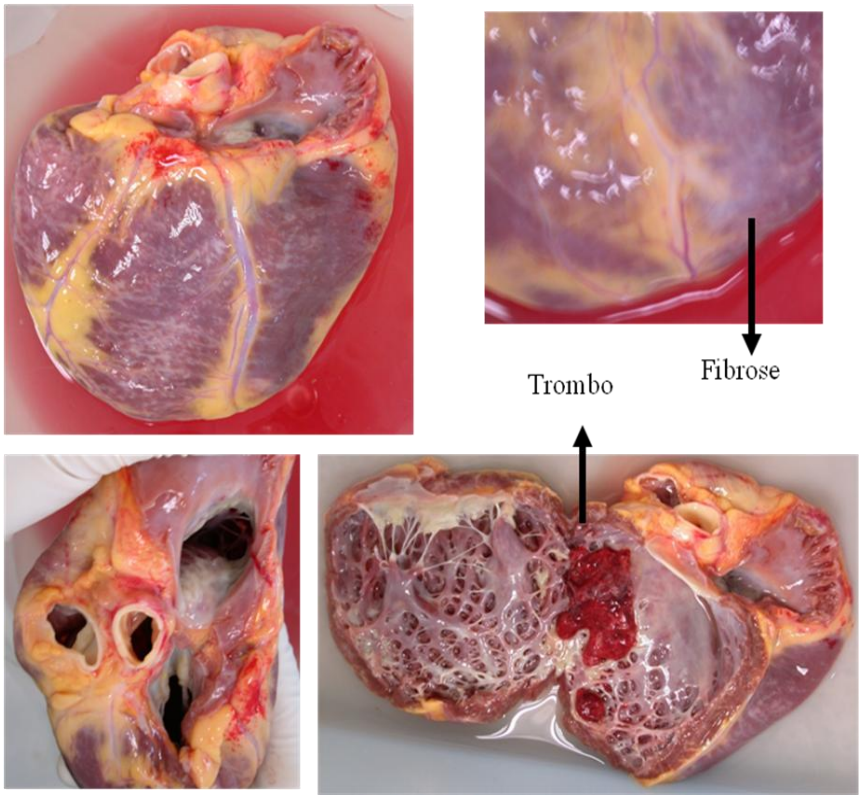
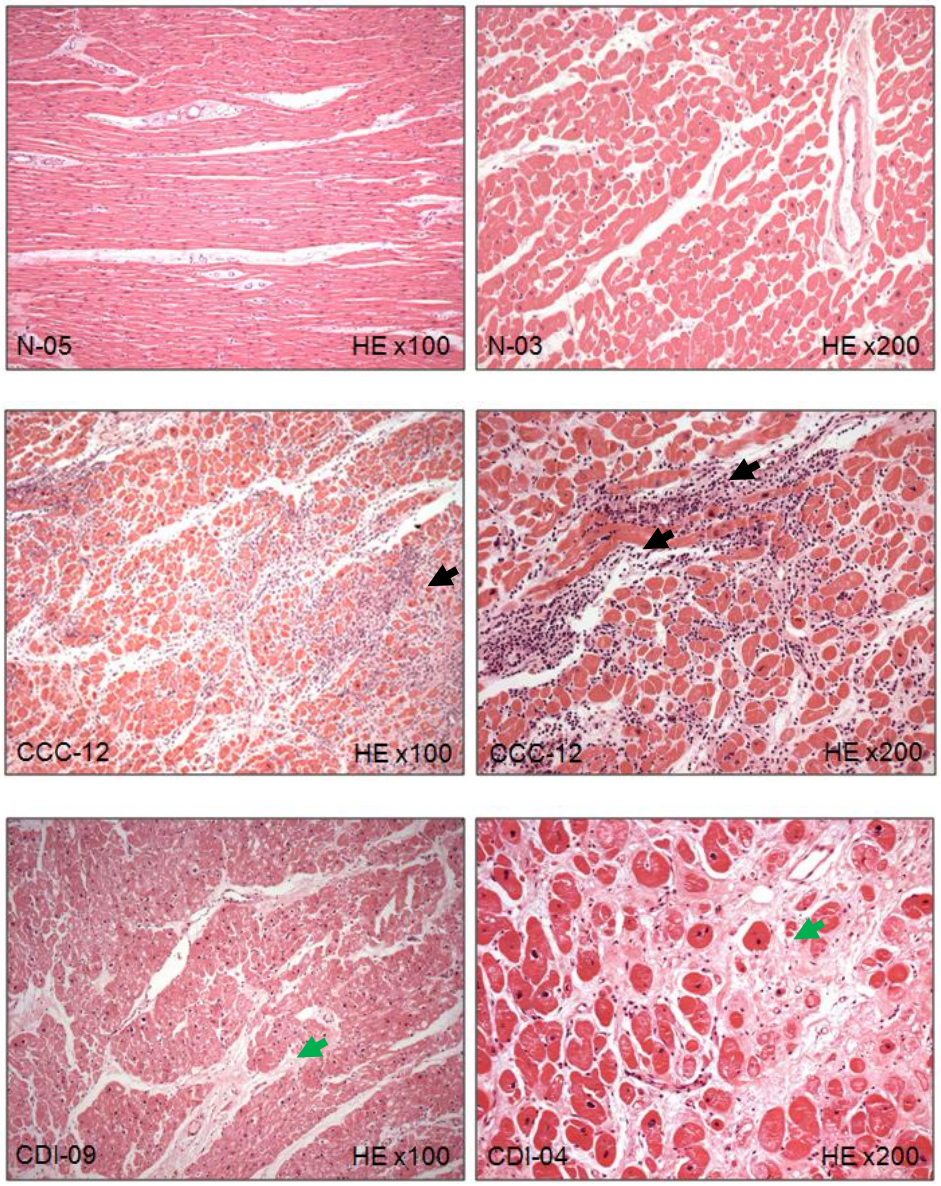


Figura 4. Miocárdio de um paciente com CCC (CCC-03), apresentando dilatação, intensa fibrose e trombo.

4.1.1. Análise histopatológica das amostras de miocárdio

As amostras de ventrículo esquerdo foram enviadas para o Serviço de Patologia do Instituto do Coração para estudos histopatológicos. Os cortes transversais, corados com hematoxilina e eosina (HE), mostraram que amostras de pacientes com CCC apresentavam intenso infiltrado inflamatório (miocardite), fibrose e hipertrofia, como também pode ser observado na tabela 1. Em geral, as

amostras de pacientes com CDI apresentaram hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose; e amostras de pacientes com CI apresentaram extensas áreas de fibrose e hipertrofia de cardiomiócitos. A figura a seguir (figura 5) mostra alguns exemplos dos cortes corados com HE utilizados para o laudo histopatológico.



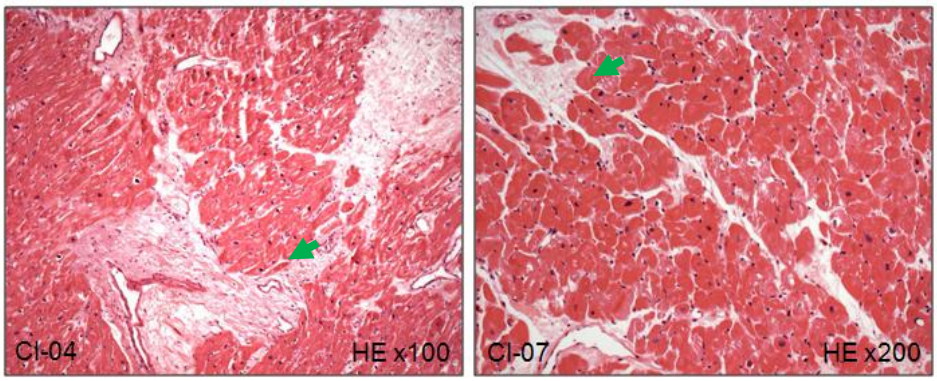


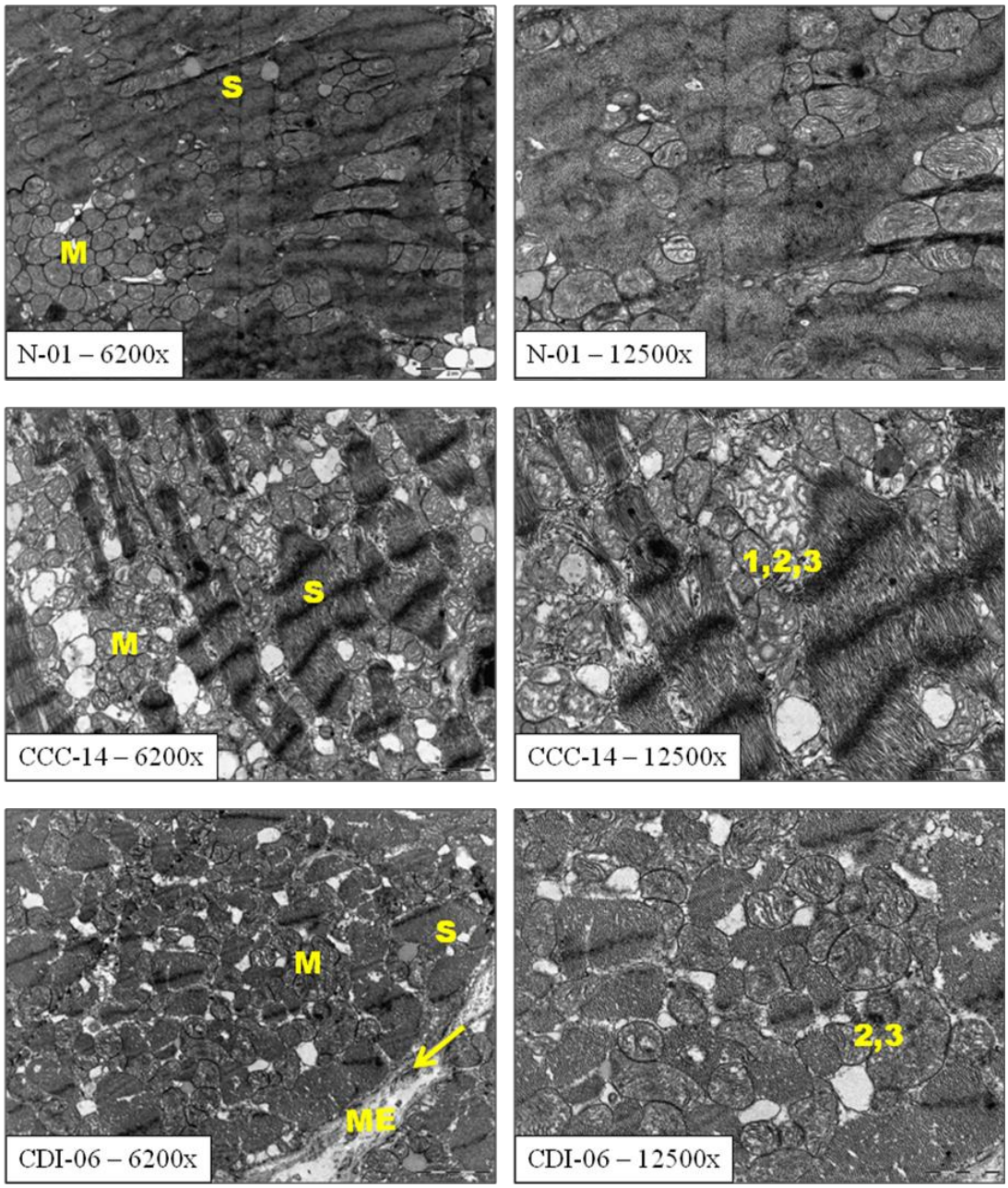
Figura 5. Análise histopatológica do tecido cardíaco de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatias. Cortes transversais respresentativos do tecido cardíaco (parede lateral do ventrículo esquerdo) submetidos à coloração por HE. Setas pretas: miocardite; setas verdes: fibrose.

4.1.2. Microscopia eletrônica das amostras de miocárdio

Em nossos estudos, encontramos níveis reduzidos de proteínas envolvidas na geração de ATP citoplasmático em miocárdio de pacientes com CCC em comparação ao miocárdio de pacientes com cardiomiopatias de etiologia não inflamatórias, como veremos adiante. Através da microscopia eletrônica podemos observar possíveis alterações morfológicas na mitocôndria dos cardiomiócitos, visto que esta organela desempenha papel central no metabolismo esnergético. A figura abaixo mostra imagens de microscopia eletrônica de amostras representativas da parede lateral do ventrículo esquerdo de pacientes com CCC, CDI, CI e de indivíduos sem cardiomiopatias (figura 6).

Na figura 6, podemos observar que cardiomiócitos de pacientes com CCC, CDI e CI apresentam mitocôndria com heterogeneidade de tamanho e irregularidade de forma. Cardiomiócitos do miocárdio da paciente com CCC apresentam também

mitocôndria com intenso edema lamelar. Observamos também a presença de fibras de colágeno na matriz extracelular, compatíveis com a alta fibrose presente no miocárdio dos pacientes.



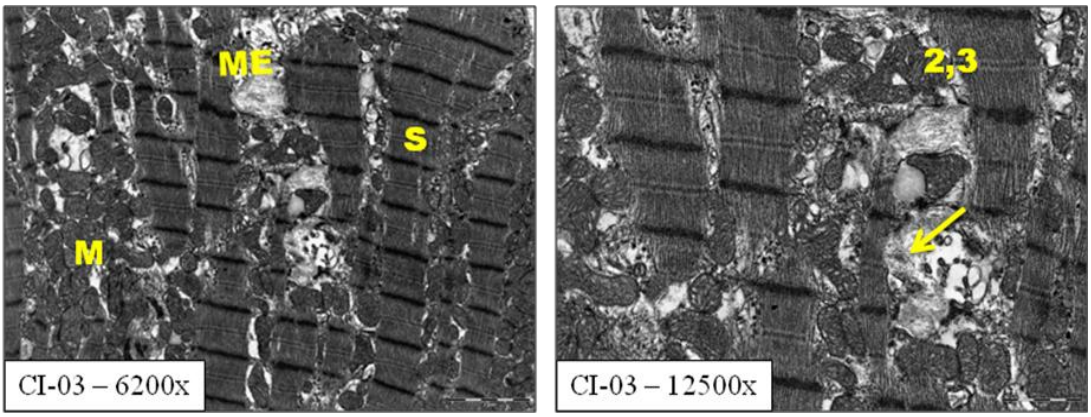


Figura 6. Ultraestrutura do cardiomiócito na microscopia eletrônica da parede lateral do ventrículo esquerdo de um paciente com CCC, um com CDI e um com CI e de um indivíduo sem cardiomiopatia. Para cada campo foram obtidas imagens com aumento de 6200x e de 12500x. (M) mitocôndria; (S) sarcômero; (EM) matriz extracelular; (1) mitocôndrias apresentando edema lamelar, (2) heterogeneidade de tamanhos e (3) irregularidades na forma;. (→) fibras de colágeno presentes na matriz extracelular.

4.2. Identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica

Com o objetivo de traçar o perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC), separamos por eletroforese bidimensional e identificamos as proteínas presentes em duas amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Esta análise permitiu avaliar, de uma maneira global, a situação do ventrículo esquerdo na CCC, e a distribuição das proteínas por grupos funcionais.

4.2.1. Separação de proteínas por eletroforese bidimensional

Por meio da eletroforese bidimensional e posterior coloração com "Coomassie Blue R-250", foram visualizados 338 "spots" no gel do paciente CCC-03 e 409 "spots" no gel do paciente CCC-04. Destes foram identificadas 319 proteínas, sendo que estas correspondiam a 112 proteínas distintas. A figura 7 mostra as imagens dos géis de cada um dos pacientes e a marcação das proteínas selecionadas para experimentos de identificação.

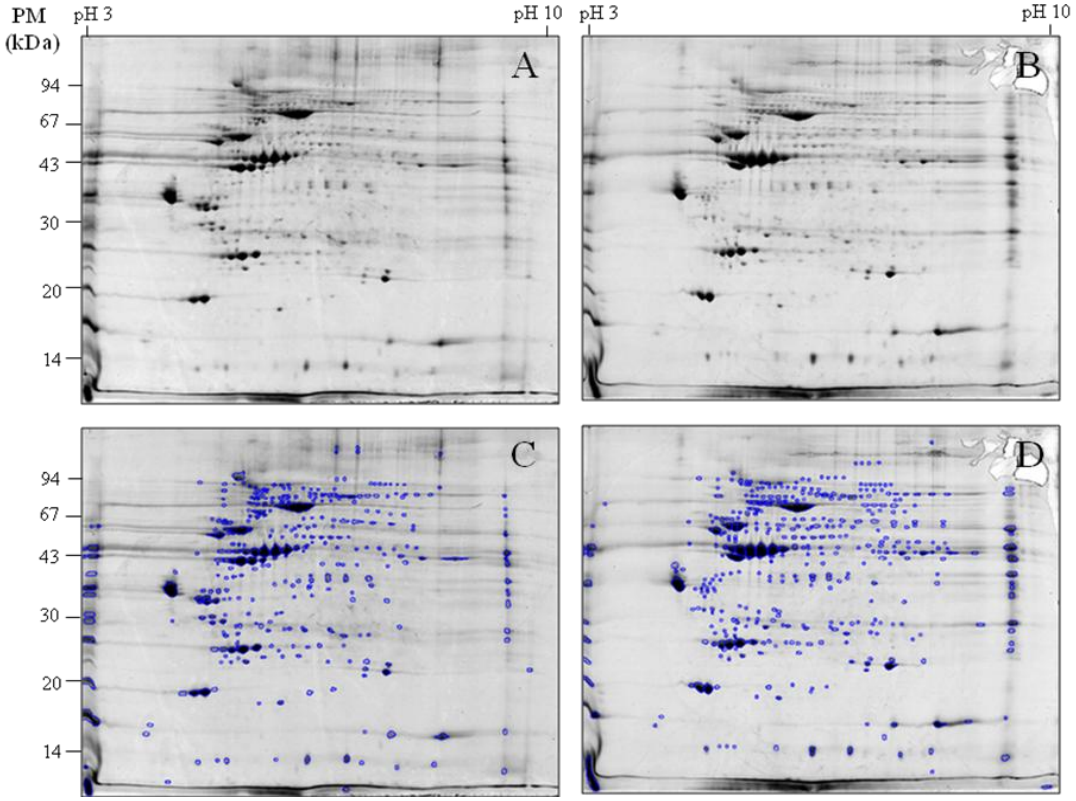


Figura 7. Géis bidimensionais de miocárdios de pacientes com CCC. Tiras de pH de 3-10L, 24 cm, gel 12,5% de poliacrilamida, coloração por "Coomassie Blue R-250". A.) Gel da amostra CCC-03; B.) Gel da amostra CCC-04; C.) Gel da amostra CCC-03 com marcação; D.) Gel da amostra CCC-04 com marcação.

4.2.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Após a separação das proteínas, estas foram digeridas com a enzima tripsina, os fragmentos trípticos foram analisados por espectrometria de massa e a identificação realizada com auxílio de banco de dados, conforme descrito no item 3.4.6. A lista das massas dos produtos derivados da fragmentação tríptica de uma dada proteína constitui o PMF ("peptide mass fingerprinting", a impressão digital da proteína). O PMF é característico de cada proteína e por comparação com banco de

dados podemos identificar tal proteína. A figura 8 ilustra um espectro de massas de uma proteína após ser submetida à fragmentação tríptica.

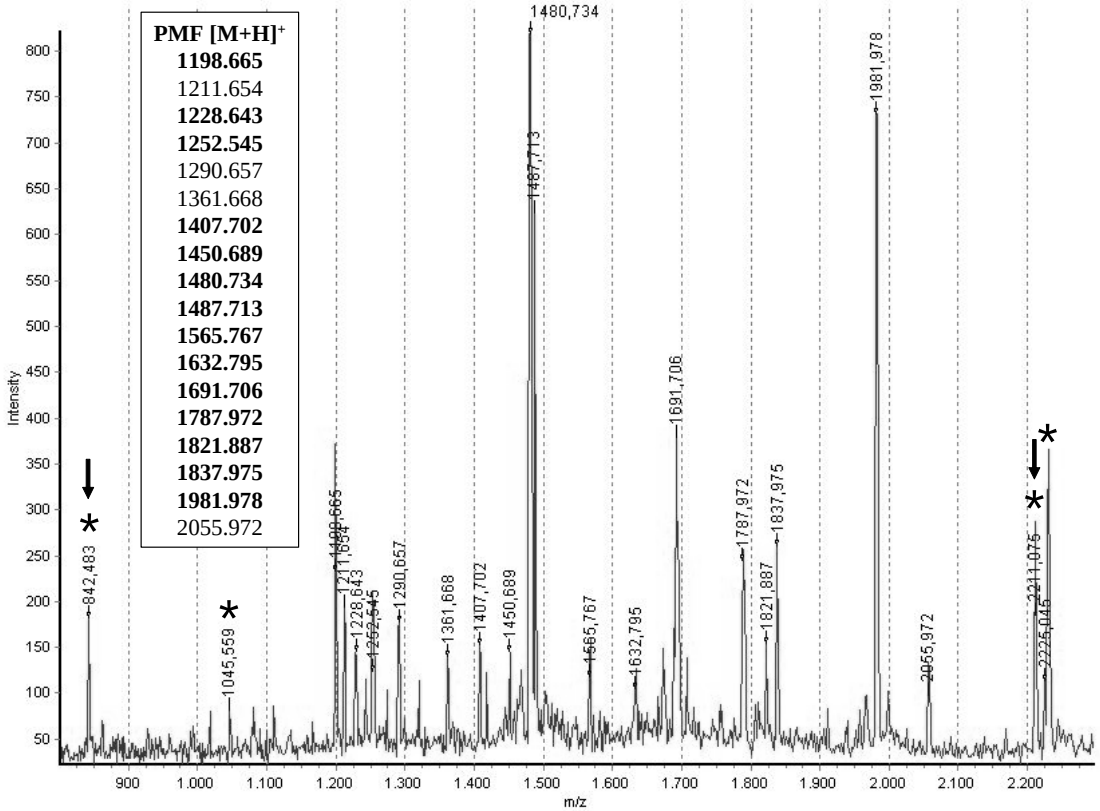


Figura 8. Espectro de massa do produto da fragmentação tríptica de um "spot", com a lista de PMF usada para a identificação protéica em banco de dados.*: peptídeos da autólise da tripsina, flechas: peptídeos da autólise da tripsina usados para calibração interna. Picos presentes em todos os espectros não foram selecionados para a lista de PMF. Em negrito, valores de massa/carga dos peptídeos que tiveram correspondência com a lista de peptídeos da fragmentação tríptica teórica em banco de dados. A partir deste espectro, foi identificada a proteína de choque térmico 70 kDa ("Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 2" – "expectation": 0,003; "coverage": 37,1%; pI: 5,6; PM: 53,6kDa), usando o banco de dados "non-redundant NCBI" (H. sapiens).

4.2.3. Proteínas identificadas e sua classificação funcional

Foram identificadas 112 proteínas distintas nos géis bidimensionais de dois pacientes com CCC (tabela 3). Estas proteínas foram classificadas funcionalmente segundo a classificação "Gene Ontology" usando a ferramenta FatiGO, disponível na "Internet". A lista completa da identificação de todos os "spots", juntamente com demais dados da identificação, encontra-se no anexo A.

Tabela 3. Proteínas identificadas no miocárdio de pacientes com CCC.

Símbolo	*Descrição*	*[1]Acc. nº*	*[2]Nº Spots*	*[3]V. Total Prot.*	*[4]% Vol.*	*[5]V. médio*
1. Proteínas Estruturais e Contráteis						
ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	P68133	3	0,40	0,46	0,13
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	P62736	15	0,65	0,74	0,04
ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	P68032	14	17,80	20,29	1,27
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	P63267	8	5,93	6,76	0,74
ACTN2	actinin, alpha 2	P35609	8	0,64	0,73	0,08
DES	desmin	P17661	13	4,52	5,16	0,35
KIAA0992	palladin	Q7Z3W0	1	0,12	0,13	0,12
LMNA	lamin A/C (70 kDa lamin)	P02545	2	0,07	0,07	0,03
MYBPC3	myosin binding protein C, cardiac	Q14896	4	0,13	0,14	0,03
MYH6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha	P13533	1	0,04	0,05	0,04
MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	P12883	12	0,79	0,90	0,07
MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac,	P10916	3	4,78	5,45	1,59
MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular	P08590	10	7,54	8,59	0,75
MYL4	myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic	P12829	2	0,06	0,07	0,03
MYOZ2	myozenin 2	Q9NPC6	2	0,04	0,05	0,02
RTN2	reticulon 2	O75298	1	0,16	0,18	0,16
SSH3	slingshot homolog 3	Q8TE77	1	0,02	0,02	0,02
TNNT2	troponin T2, cardiac	P45379	3	4,49	5,12	1,50
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	P09493	2	5,59	6,37	2,79
TUBB	tubulin, beta polypeptide	P07437	1	0,07	0,08	0,07
VIM	vimentin	P08670	6	0,46	0,53	0,08
		Total	112	54,27	61,88	0,48

continua

continuação

Símbolo	*Descrição*	*[1]Acc. nº*	*[2]Nº Spots*	*[3]V. Total Prot.*	*[4]% Vol.*	*[5]V. médio*
2. Metabolismo						
2.1. Glicólise						
ALDOA	frutose 1,6-biphosphate aldolase	P04075	1	0,82	0,94	0,82
ENO1	enolase 1	P06733	1	0,02	0,03	0,02
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	1	0,67	0,76	0,67
LDHB	lactate dehydrogenase B	P07195	3	0,31	0,36	0,10
PDHB	pyruvate dehydrogenase, E1 beta	P11177	2	0,08	0,09	0,04
		Total	8	1,90	2,16	0,24
2.2. Ciclo de Krebs						
ACO2	aconitase 2, mitochondrial	Q99798	7	0,62	0,70	0,09
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	P09622	3	0,18	0,20	0,06
DLST	Dihydrolipoamide succinyltransferase	P36957	2	0,12	0,13	0,06
FH	fumarate hydratase precursor	P07954	4	0,17	0,20	0,04
MDH2	malate dehydrogenase 2, mitochondria	P40926	1	0,10	0,12	0,10
OGDH	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)	Q02218	6	0,15	0,17	0,02
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A	P31040	4	0,30	0,34	0,07
		Total	27	1,63	1,86	0,06
2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons						
ATP5A1	ATP synthase, F1 complex, alpha	P25705	2	0,84	0,96	0,42
ATP5B	ATP synthase, F1 complex, beta	P06576	2	1,60	1,83	0,80
ATP5C1	ATP synthase, F1 complex, gamma	P36542	1	0,31	0,36	0,31
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Q16134	3	0,07	0,08	0,02
NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) FeS protein 1	P28331	6	0,42	0,48	0,07
NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) FeS protein 3	O75489	2	0,06	0,07	0,03
NDUFS8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) FeS protein 8	O00217	1	0,03	0,03	0,03
NDUFV1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1	P49821	1	0,09	0,10	0,09
NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	P19404	1	0,06	0,07	0,06
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	P31930	5	0,41	0,47	0,08
UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske FeS	P47985	1	0,13	0,15	0,13
		Total	25	4,02	4,58	0,16
2.4. Transporte de energia						
CKM	Creatine kinase, M chain	P06732	8	1,66	1,90	0,21
CKMT2	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	P17540	1	1,21	1,38	1,21
		Total	9	2,87	3,28	0,32
2.5. Metabolismo lipídico						
ALG1	beta-1,4 mannosyltransferase	Q9P2Y2	1	0,02	0,03	0,02
APOA1	apolipoprotein A-I	P02647	2	0,15	0,17	0,08
ECH1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	Q13011	2	0,04	0,04	0,02
ECHS1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, mitochondrial	P30084	1	0,02	0,02	0,02
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	P05413	3	1,15	1,32	0,38
HMGCS1	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	Q01581	1	0,03	0,04	0,03
		Total	10	1,42	1,62	0,14
2.6. Metabolismo de ácidos nucleicos						
ADSS	adenylosuccinate synthase	P30520	1	0,03	0,04	0,03
AK1	adenylate kinase 1	P00568	1	0,12	0,14	0,12
DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	Q16555	1	0,04	0,04	0,04
		Total	3	0,19	0,22	0,06

continua

continuação

Símbolo	*Descrição*	*[1]Acc. nº*	*[2]Nº Spots*	*[3]V. Total Prot.*	*[4]% Vol.*	*[5]V. médio*
2.7. Outras proteínas metabólicas						
ALDH2	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	1	0,07	0,08	0,07
GOLGA1	golgi autoantigen (golgin 97)	Q92805	1	0,04	0,05	0,04
GOT1	aspartate aminotransferase 1	P17174	2	0,14	0,16	0,07
NSFL1C	p47 protein	Q9UNZ2	2	0,07	0,08	0,04
OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1 precursor	P55809	2	0,18	0,20	0,09
PSMD11	proteasome 26S non-ATPase subunit 11	O00231	1	0,02	0,02	0,02
PYGB	glycogen phosphorylase, brain form	P11216	1	0,02	0,02	0,02
TPI1	triosephosphate isomerase 1	P60174	2	0,04	0,04	0,02
		Total	12	0,58	0,66	0,05
	Metabolismo	**Total**	94	12,61	14,38	0,13
3. Resposta ao Estresse						
APTX	aprataxin	Q7Z2E3	1	0,02	0,02	0,02
CRYAB	crystallin, alpha B	P02511	5	3,12	3,55	0,62
CRYM	crystallin, mu	Q14894	3	0,07	0,08	0,02
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	Q9UKB3	1	0,04	0,04	0,04
DNAJC13	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	O75165	1	0,02	0,02	0,02
GSTA1	glutathione S-transferase A1	P08263	1	0,03	0,03	0,03
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5	P11021	1	0,15	0,17	0,15
HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	P11142	5	0,87	0,99	0,17
HSPA9B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	P38646	6	0,70	0,79	0,12
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	P04792	8	0,64	0,73	0,08
HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	O14558	3	0,04	0,04	0,01
HSPB7	heat shock 27kDa protein, member 7 (cardiovascular)	Q9UBY9	1	0,01	0,01	0,01
HSPCA	heat shock 90kDa protein 1, alpha	P07900	1	0,04	0,04	0,04
HSPD1	chaperonin (HSP60)	P10809	4	0,23	0,27	0,06
NOR1	oxidored-nitro domain-containing protein	Q8N7G2	1	0,13	0,15	0,13
PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3	P30101	4	0,11	0,12	0,03
PRDX2	peroxiredoxin 2	P32119	3	0,23	0,27	0,08
PRDX6	peroxiredoxin 6	P30041	1	0,07	0,08	0,07
SERPINA1	alpha-1 antitrypsin	P01009	1	0,03	0,04	0,03
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	P00441	1	0,13	0,15	0,13
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	P04179	3	0,23	0,26	0,08
TRA1	tumor rejection antigen (gp96) 1 (heat shock protein)	P14625	1	0,04	0,05	0,04
		Total	56	6,94	7,92	0,12
4. Resposta Imune						
GZMA	granzyme A precursor	P12544	1	0,08	0,09	0,08
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	P01889	1	0,04	0,05	0,04
HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G	P17693	1	0,11	0,12	0,11
IGHG2	immunoglobulin heavy chain	P01859	2	0,16	0,18	0,08
TCRB	T cell receptor beta chain	P01850	2	0,10	0,12	0,05
		Total	7	0,49	0,56	0,07
5. Apoptose						
CASP2	caspase-2 precursor	P42575	2	0,64	0,73	0,32
CASP8	caspase 8	Q14790	1	0,06	0,07	0,06
CTSD	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	P07339	3	0,07	0,08	0,02
		Total	6	0,77	0,88	0,13

continua

continuação

6. Divisão Celular e Proliferação						
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	P22607	1	0,09	0,10	0,09
MLH1	DNA mismatch repair protein Mlh1	P40692	1	0,02	0,03	0,02
		Total	2	0,11	0,13	0,06
7. Sinalização Celular e Controle da Transcrição e Tradução						
FOXP4	forkhead box P4 isoform 1	Q8IVH2	1	0,01	0,02	0,01
GJE1	gap junction protein, epsilon 1, 29kDa	Q8NFK1	2	0,09	0,10	0,04
PHB	prohibitin	P35232	2	0,06	0,07	0,03
TUFM	elongation factor Tu, mitochondrial (P43)	P49411	3	0,15	0,17	0,05
		Total	8	0,31	0,35	0,04
8. Outras Funções						
ALB	albumin precursor	P02768	5	6,85	7,80	1,37
ANXA5	annexin A5	P08758	1	0,02	0,03	0,02
ARFGAP1	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein	Q8N6T3	1	0,02	0,02	0,02
C16orf49	chromosome 16 open reading frame 49	O75208	3	0,08	0,09	0,03
CA1	carbonic anhydrase I	P00915	1	0,02	0,02	0,02
HBA1	hemoglobin, alpha 1	P69905	2	0,29	0,33	0,15
HBB	hemoglobin, beta	P68871	2	0,21	0,23	0,10
IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	Q16891	4	0,26	0,30	0,06
MB	myoglobin	P02144	7	3,79	4,32	0,54
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	P45452	3	0,14	0,15	0,05
NUP153	nucleoporin 153kDa	P49790	1	0,02	0,02	0,02
RTN1	reticulon 1	Q16799	1	0,04	0,04	0,04
TF	transferrin	P02787	3	0,50	0,57	0,17
		Total	34	12,21	13,92	0,36

[1]Número de acesso no banco de dados de proteínas; [2]número de "spots" identificados como tal proteína; [3]volume total (volume total de todos os "spots" identificados como tal proteína); [4]porcentagem que o volume total da proteína representa na somatória do volume de todas as proteínas; [5]volume médio de cada "spot" da proteína identificada.

A figura abaixo (figura 9) mostra a distribuição por função das proteínas identificadas neste estudo. Esta distribuição foi baseada na classificação do "Gene Ontology", usando a ferramenta FatiGO.

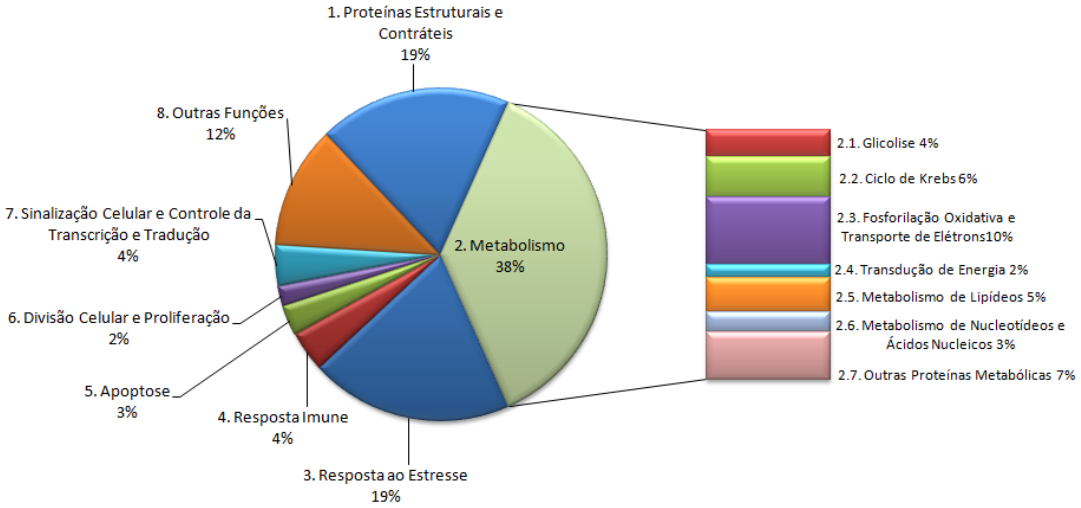


Figura 9. Classificação funcional das proteínas identificadas no miocárdio de pacientes com CCC.A classificação funcional foi adaptada da classificação "Gene Ontology", usando a ferramenta FatiGO (http://fatigo.bioinfo.cnio.es).

Como podem ser observadas na figura 9 e na tabela 2, as proteínas mais identificadas foram as estruturais e contráteis (19%) e as envolvidas no metabolismo (38%), principalmente no metabolismo energético. Esta distribuição é esperada, uma vez que o cardiomiócito possui uma grande quantidade de sarcômeros e mitocôndrias. Além destas proteínas de elevada abundância no coração, também identificamos proteína de baixa expressão, como proteínas envolvidas na sinalização celular e controle da transcrição e tradução, e proteínas envolvidas na divisão celular e proliferação.

Foram identificadas também proteínas envolvidas na apoptose (ex: caspase 8, caspase 2), no sistema imune ("T cell receptor beta chain", "granzyme A", "HLA class I") e em processos de resposta ao estresse (incluindo várias proteínas envolvidas no processo oxidativo), sugerindo a ocorrência destes processos no miocárdio de pacientes CCC.

Muitas das proteínas identificadas estavam representadas não como “spots” únicos, mas como vários “spots” (de diferentes pontos isoelétricos e/ou pesos moleculares) representando diversas isoformas de uma mesma proteína. Estas isoformas podem ser devido a modificações pós-traducionais, como fosforilações, oxidações, glicosilações, etc; podem ser produtos de fragmentações ou associações com outras proteínas, e também artefatos da própria técnica.

Também analisamos a distribuição destas proteínas de acordo com sua função levando em consideração a massa (volume normalizado, usado na quantificação) que tal proteína representa na somatória total de todos os “spots”. A tabela 4 mostra a o número de proteínas distintas identificadas por função, o número de proteínas totais, ou seja, o número de “spots” totais (e não apenas os distintos) pertencentes a cada função, e a somatória do volume de todos os “spots” dentro de uma determinada função. A tabela também mostra o volume médio de um “spot” por função. A figura 10 mostra estes dados no formato de um gráfico tipo “pizza”.

Tabela 4. Distribuição dos “spots” identificados por função.

Funções	***Nº Prot.***	***Nº Prot. (%)***	***Nº Spots***	***Nº Spots (%)***	***V. total***	***V. total (%)***	***V. Médio/ Spot***
Proteínas estruturais e contráteis	21	19	112	35	54,3	62	0,485
Metabolismo	42	38	94	29	12,6	14	0,134
Resposta ao estresse	22	19	56	18	6,9	8	0,124
Resposta imune	5	4	7	2	0,5	1	0,070
Apoptose	3	3	6	2	0,8	1	0,128
Divisão celular e proliferação	2	2	2	1	0,1	0	0,055
Sinalização celular e controle da transcrição e tradução	4	4	8	3	0,3	0	0,038
Outras funções	13	12	34	11	12,2	14	0,359
Total	**112**	**100**	**319**	**100**	**87,7**	**100**	**0,275**

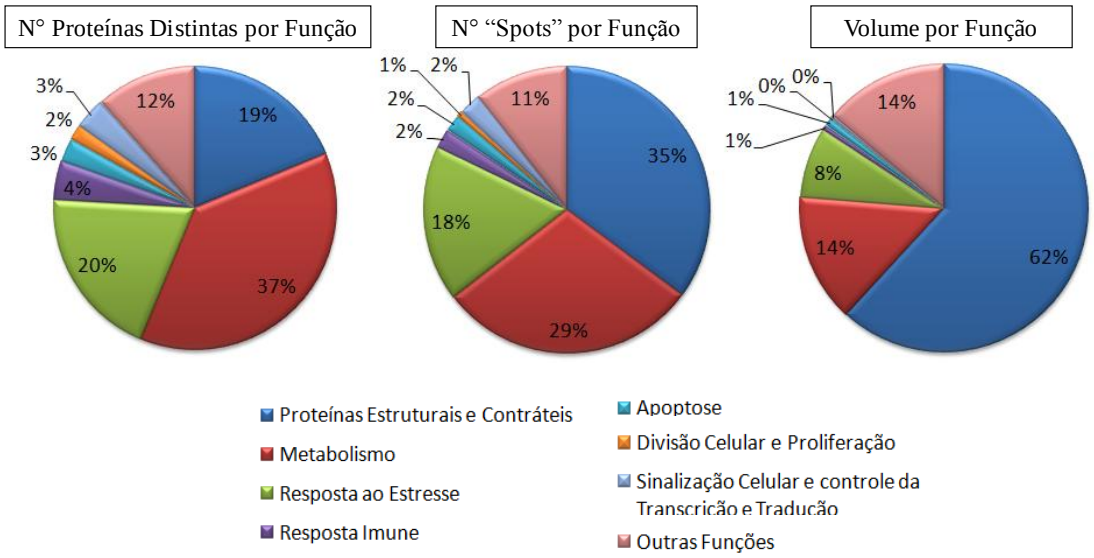


Figura 10. Distribuição dos "spots"/proteínas por função, considerando o número de proteínas distintas identificadas, o número total de "spots" identificados e o volume (massa) que as proteínas representam na função.

Pela análise dos dados acima, é possível verificar que apesar das proteínas estruturais corresponderem a 19% da diversidade de proteínas presentes no coração, elas representam 35% das proteínas identificadas, incluindo as várias isoformas de uma mesma proteína, e 62% da massa das proteínas totais. Enquanto que as proteínas envolvidas no metabolismo celular correspondem a 38% da diversidade, mas apenas 14% da massa de proteínas totais. Esta descrição é importante para se determinar a abundância das principais proteínas que constituem o miocárdio, e se trata de uma nova forma de análise proteômica de um tecido.

4.2.4. Validação de proteínas por "Western-Blotting"

Algumas proteínas identificadas através de seu PMF foram selecionadas para confirmação por "Western Blotting" (figura 11). Entre elas foram selecionadas proteínas classificadas funcionalmente como envolvidas na resposta ao estresse, em especial ao estresse oxidativo, como HSP 60 (61kDa), PDI (55kDa) e Cu/Zn SOD (23kDa), e também proteínas envolvidas na apoptose, como caspase 8 alfa e beta (58 kDa) e caspase 2 (48kDa). A forma clivada da caspase 8 (26kDa), o que indica sua ativação, também foi identificada.

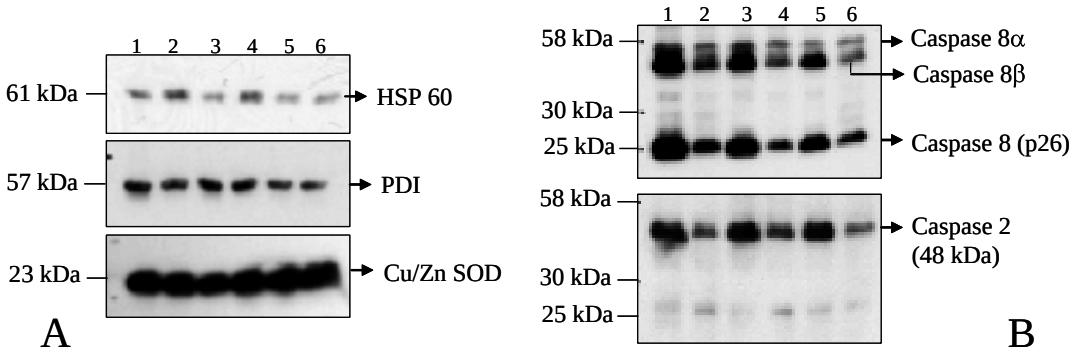


Figura 11. Validação de algumas proteínas identificadas por "Western-Blotting" em amostras de 6 pacientes com CCC. A.) Identificação das proteínas HSP 60 (61kDa), PDI (55kDa) e Cu/Zn SOD (23kDa), as quais estão envolvidas no processo de estresse oxidativo. B.) Identificação de proteínas envolvidas na apoptose, caspase 8 alfa e beta (58kDa) e caspase 2 (48kDa).

4.3. Análise da expressão protéica diferencial no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e de indivíduos sem cardiomiopatia

No estudo da análise proteômica diferencial, subdividimos o grupo de pacientes com CCC em: pacientes CCC do sexo masculino com idade superior a 40 anos (CCC-M); pacientes do sexo masculino com idade inferior a 40 anos (CCC-MY); e pacientes do sexo feminino com idade superior a 40 anos (CCC-F). Esta subdivisão foi realizada para nos certificarmos que as diferenças na expressão protéica dos pacientes em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias (doadores de órgãos, os quais possuem idade inferior a 40 anos) fossem de fato por causa da fisiopatologia das doenças e não por diferença de idade e sexo. Para os grupos CDI e CI utilizamos amostras de pacientes com idade superior a 40 anos e do sexo masculino. A figura a seguir mostra um gráfico com a distribuição dos pacientes por idade para melhor visualização (figura 12).

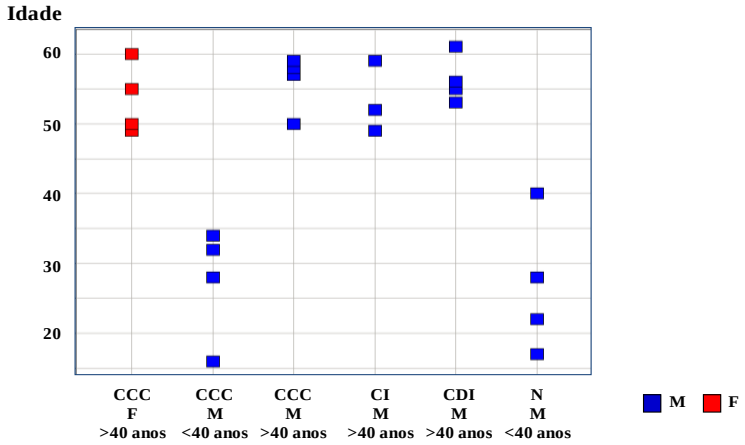


Figura 12. Gráfico mostrando a distribuição por idade dos pacientes, cujas amostras de miocárdio faram utilizadas para os experimenros de análise proteômica diferencial. M: Masculino; F: Feminino.

Com este esquema experimental podemos realizar diversas comparações, visando entender melhor a fisiopatologia das cardiomiopatias (figura 13). Em nosso estudo, entretando, focaremos principalmente nas análises envolvendo cardiopatas do sexo masculino com idade superior a 40 anos em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias.

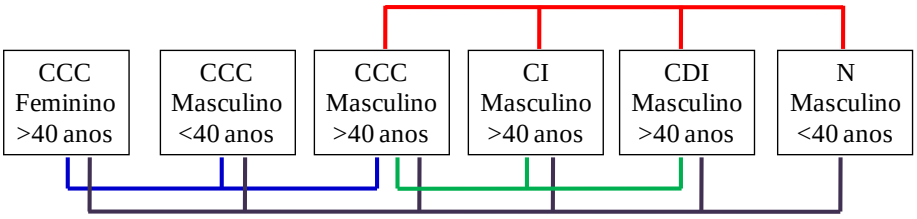


Figura 13. Esquema mostrando possíveis comparações entre os grupos de pacientes.Em nosso estudo focaremos principalmente nas comparações destacadas pelas linhas vermelhas.

A análise proteômica utilizando a técnica convencional de separação protéica de cada amostra em um gel bidimensional fica prejudicada devido à baixa reprodutibilidade entre os géis. Variações na intensidade dos "spots" devido a fatores experimentais, como por exemplo, a perda de proteínas durante a entrada da amostra na tira de pH imobilizado, podem ser minimizados pela técnica DIGE ("2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis"). Nesta, marcamos uma amostra com um fluoróforo (por exemplo, Cy3), e outra amostra com outro fluoróforo (por exemplo, Cy5), e um "pool", contendo todas as amostras do experimento, com um terceiro corante (Cy2). As duas amostras marcadas juntamente com o "pool" são misturadas antes da focalização isoelétrica, e a separação das proteínas é realizada no mesmo gel bidimensional. A separação de proteínas de várias amostras em um

mesmo gel permite a detecção precisa de mudanças na expressão. A presença de um padrão interno (o “pool”) em todos os géis do experimento permite a normalização precisa entre todas as amostras, e desta maneira, pequenas diferenças de expressão podem ser detectadas (66).

Neste estudo, todas as amostras foram marcadas com Cy3 e também com Cy5, sendo assim as amostras foram analisadas em duplicatas. A distribuição das amostras nos vários géis se encontra na tabela do anexo B.

A concentração de cada fluoróforo foi de 400pmol/50µg de proteínas e, tanto as amostras quanto o “pool” estavam numa concentração de proteínas de 5µg/µL e em pH entre 8 e 9. Cada conjunto contendo duas amostra de grupos diferentes (uma marcada com Cy3 e a outra marcada com Cy5) e o “pool” (marcado com Cy2) foram aplicadas por reidratação na tira de pH imobilizado na faixa de 3-11 com gradiente de pH não linear. Após a realização dos géis (SDS-PAGE, 12%), os mesmos foram escaneados no equipamento “Typhoon”. A figura 14 mostra a imagem representativa de um gel bidimensional com marcação fluorescente das amostras.

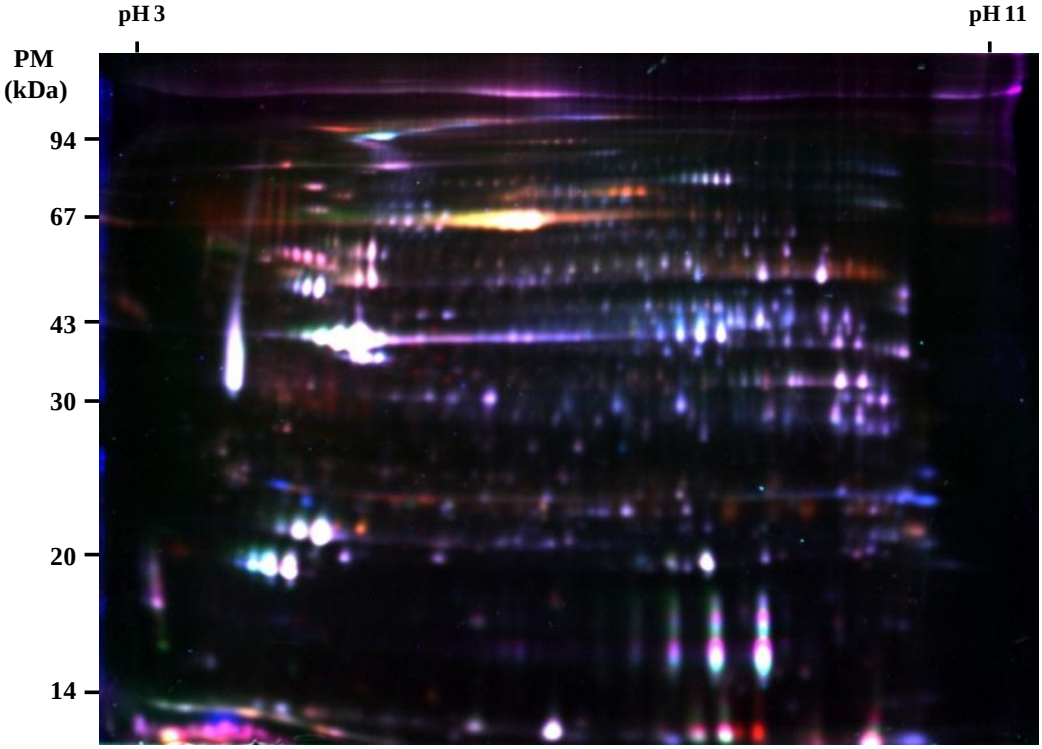


Figura 14. Imagem representativa de um gel bidimensional com marcação fluorescente das amostras. A figura mostra a imagem sobreposta das três marcações (Cy2, Cy3 e Cy5). O gel em questão contém uma amostra de indivíduo sem cardiomiopatia (Cy3), uma amostra de paciente com CCC (Cy5) e o "pool" (Cy2).

Um gel preparativo, contendo uma quantidade de proteínas maior do que a contida nos géis analíticos, também foi realizado (figura 15). Para a posterior comparação com os géis analíticos, cujas amostras possuem marcação fluorescente, 50ug de proteínas do "pool" (contendo mesma quantidade de proteínas de cada uma das amostras utilizadas nos experimentos) foram marcadas com o fluoróforo Cy2, e adicionados a 450 ug de proteínas do mesmo "pool" sem marcação. Sendo assim, 500 µg de proteína foram aplicados no gel. O gel foi escaneado primeiramente no escâner de fluorescênccia para a aquisição da imagem Cy2, em seguida, o gel foi corado por "coomassie blue colloidal", e estão escaneado novamente. Este

procedimento foi realizado para que a imagem com Cy2 (figura 15-A) fosse utilizada para a comparação com os géis analíticos, e posteriormente o mesmo gel pudesse ser utilizado para processamento e identificação das proteínas por espectrometria de massas (figura 15-B).

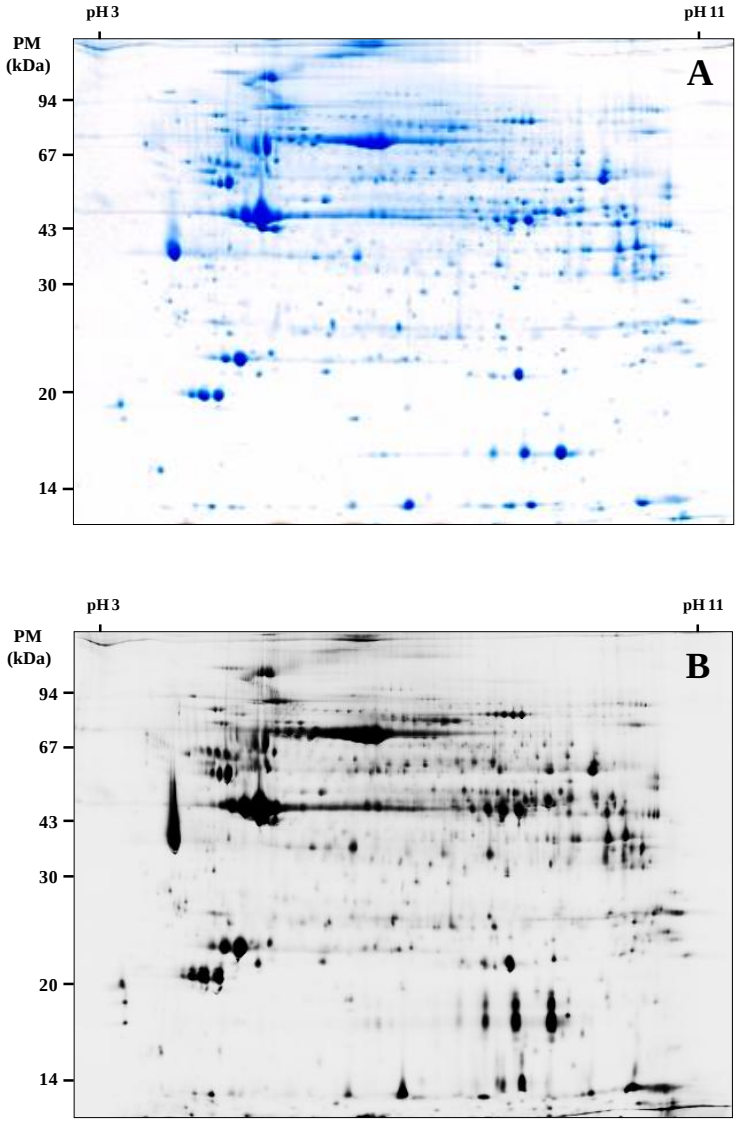


Figura 15. Imagens do gel bidimensional preparativo.A: Imagem do gel preparativo por coloração com "Coomassie Blue Colloidal" contendo 500 µg de proteínas ("pool"). B: Imagem do gel preparativo decorrente da marcação com o fluoróforo Cy2 de 50 ug de proteínas ("pool").

Podemos observar na figura 15, que ambas as imagens representam o mesmo gel. É importante que as imagens se sobreponham para posteriormente a denominação de cada “spot” seja feita corretamente.

As imagens adquiridas foram transferidas para o programa “DeCyder”. A detecção dos “spots”, tanto dos géis analíticos quanto da imagem Cy2 do gel preparativo, foi realizada no módulo “DeCyder-DIA”. A próxima etapa do experimento DIGE é realizada no programa “DeCyder-BVA” (“Biological Variation Analysis”), o qual realiza a comparação entre vários géis contendo todas as amostras do experimento e realiza a análise estatística. Nesta análise os valores de volume de cada marcação de cada gel são normalizados em relação ao padrão interno, o que possibilita melhor visualização das diferenças de expressão.

A tabela do anexo B mostra o número de “spots” detectados em cada gel através do programa “DeCyder-DIA”, e o número de “spots” que obteve correlação quando comparados com um gel escolhido para referência (gel “Master”) através do programa “DeCyder-BVA”. Em nossos experimentos o gel escolhido como referência foi o gel preparativo (imagem obtida através da marcação com Cy2).

4.3.1. Identificação protéica por espectrometria de massa

As proteínas foram identificadas por espectrometria de massa (MALDI-ToF), conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para as análises das proteínas diferenciais consideramos apenas os “spots” presentes em no mínimo 95% dos géis, ou seja, 683 “spots”. Uma figura do gel preparativo com a marcação destes “spots” encontra-se no anexo C.

No entanto, devido à diferença na sensibilidade entre a marcação fluorescente e a coloração por “Coomassie Blue Colloidal”, nem todos estes “spots” puderam ser processados para posterior analise por espectrometria de massa. Assim, dos 683 “spots”, apenas 565 “spots” foram processados. Destes, 439 “spots” resultaram em identificação protéica, seguindo parâmetros conforme descritos em Materiais e Métodos.

Dentre os “spots” identificados destacam-se 230 proteínas com identidade distinta. A relação de todos os “spots” identificados encontra-se no anexo D.

4.3.2. Análise das proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia.

A comparação entre os grupos foi realizada após a normalização dos volumes. A primeira análise estatística foi realizada comparando todos os grupos através do método estatístico “One Way Anova”. Por esta análise, 355 “spots” estão diferenciais entre os seis grupos quando consideramos $p<0,01$; 222 “spots” estão diferenciais entre os grupos quando consideramos $p<0,001$; e 143 “spots” estão diferenciais quando consideramos $p<0,0001$.

No entanto esta análise não revela claramente entre quais grupos estão as diferenças. Sendo assim, realizamos a análise considerando os grupos aos pares, e foram consideradas diferenças de expressão significativa aquelas com p<0,01, utilizando o teste *t* de *Student*. As tabelas a seguir (tabelas 5 e 6) mostram o número de "spots" diferenciais, aumentados e diminuídos, em cada comparação.

Tabela 5. Número de "spots" diferenciais nas correlações entre grupos de cardiopatas e grupo de indivíduos sem cardiomiopatia, utilizando o teste *t* (p<0,01).

	Diferenciais	**Aumentados**	**Diminuídos**
CCC-F / Normal-MY	257	141	116
CCC-M / Normal-MY	280	157	123
CCC-MY / Normal-MY	259	133	125
CI-M / Normal-MY	96	74	21
CDI-M / Normal-MY	266	159	107

Normal: grupo de amostra de indivíduos sem cardiomiopatia; F: Feminino; M: Masculino; Y: "young", idade inferior a 40 anos

Tabela 6. Número de "spots" diferenciais nas correlações apenas entre os grupos de cardiopatas, utilizando o teste *t* (p<0,01).

	Diferenciais	**Aumentados**	**Diminuídos**
CCC-F / CCC-M	32	20	12
CCC-MY / CCC-M	24	7	17
CI-M / CCC-M	138	75	63
CDI-M / CCC-M	36	14	22

F: Feminino; M: Masculino; Y: "young", idade inferior a 40 anos

Como podemos observar na tabela 5, o grupo dos pacientes com CI foi o que apresentou menor número de "spots" com expressão diferencial em comparação com

amostras de indivíduos sem cardiomiopatia. Também podemos observar, que em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias, os três grupos de pacientes com CCC (masculinos, femininos e masculinos jovens) apresentam números aproximados de “spots” diferenciais.

Na tabela 6, quando comparamos o número de “spots” diferenciais apenas entre os grupos de cardiopatas, podemos observar que o grupo de pacientes com CCC do sexo feminino e o grupo de pacientes com CCC do sexo masculino e idade inferior a 40 anos apresentam um pequeno número de “spots” diferencialmente expressos em comparação com o grupo de pacientes com CCC do sexo masculino e idade superior a 40 anos. Também podemos observar que o número de “spots” diferenciais entre o grupo de pacientes com CCC e o grupo de pacientes com CDI é bem menor do que o número de “spots” diferenciais entre o grupo de pacientes com CCC e o grupo de pacientes com CI.

Os diagramas de Venn, representados nas figuras 16 e 17, mostram o número de “spots” diferencialmente expressos, compartilhados ou únicos, em cada grupo quando comparados com o grupo de indivíduos sem cardiomiopatia.

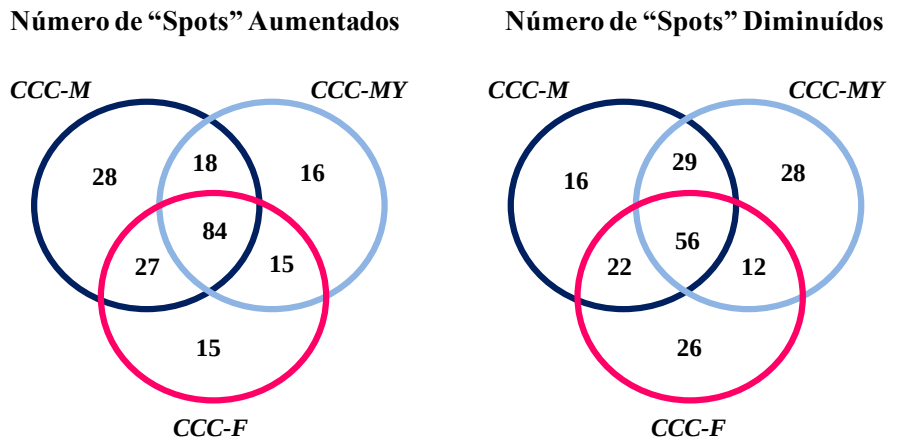


Figura 16. Diagramas de Venn representando a ocorrência de "spots" diferencialmente expressos comuns ou únicos nas relações entre grupos de pacientes com CCC em comparação com grupo de indivíduos sem cardiomiopatias.F: Feminino; M: Masculino; Y: "young", idade inferior a 40 anos

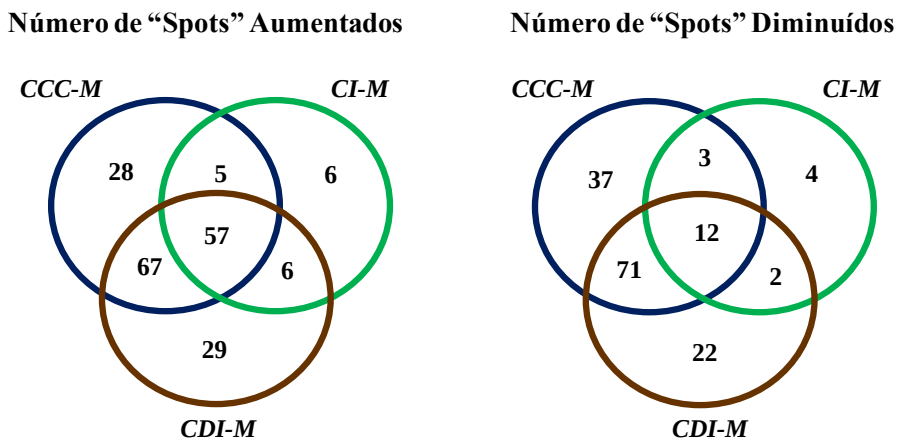


Figura 17. Diagramas de Venn representando a ocorrência de "spots" diferencialmente expressos comuns ou únicos nas relações entre grupos de pacientes com cardiomiopatias em comparação com de grupo indivíduos sem cardiomiopatias.M: Masculino.

Os diagramas de Venn mostrados nas figuras 16 e 17 reforçam as observações realizadas através da análise das tabelas acima. Na figura 16, a qual mostra a ocorrência dos "spots" entre os grupos de pacientes com CCC, observamos

uma quantidade bem maior de “spots” compartilhados pelos três grupos do que a quantidade de “spots” para cada grupo individual.

Na figura 17, podemos observar que o número de “spots” diferencialmente expressos compartilhados pelos grupos de pacientes com CCC e CDI é bem maior do que o número compartilhado entre o grupo CCC e o grupo CI, ou entre o grupo CDI e CI.

No anexo D, encontra-se a relação dos “spots” com aumento de expressão protéica dos grupos CCC-M, CDI-M e CI-M em comparação com o grupo N-MY (indivíduos sem cardiomiopatias). No anexo E, encontra-se a relação dos “spots” com diminuição de expressão protéica dos grupos CCC-M, CDI-M e CI-M em comparação com o grupo N-MY (indivíduos sem cardiomiopatias). Nestas tabelas estão mostrados as identificações protéicas, quando possível, e as quantificações relativas.

No anexo F, encontra-se a relação dos “spots” com aumento de expressão protéica dos grupos CCC-M, CCC-F e CCC-MY em comparação com o grupo N-MY (indivíduos sem cardiomiopatias). No anexo G, encontra-se a relação dos “spots” com diminuição de expressão protéica dos grupos CCC-M, CCC-F e CCC-MY em comparação com o grupo N-MY (indivíduos sem cardiomiopatias). Nestas tabelas também estão mostrados as identificações protéicas, quando possível, e as quantificações relativas.

Como dito anteriormente, para a análise individual das proteínas com diferença de expressão focaremos nas comparações entre os grupos CCC-M, CDI-M

e CI-M em relação ao grupo N-MY. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um “spot”. Como nosso objetivo principal é avaliar a expressão diferencial das proteínas como um todo, e visando a simplificação da análise, relacionamos as proteínas identificadas e o número de “spots” diferenciais que corresponderam a tais proteínas. A figura abaixo mostra o diagrama de Venn representando as ocorrências das proteínas distintas em cada comparação (figura 18).

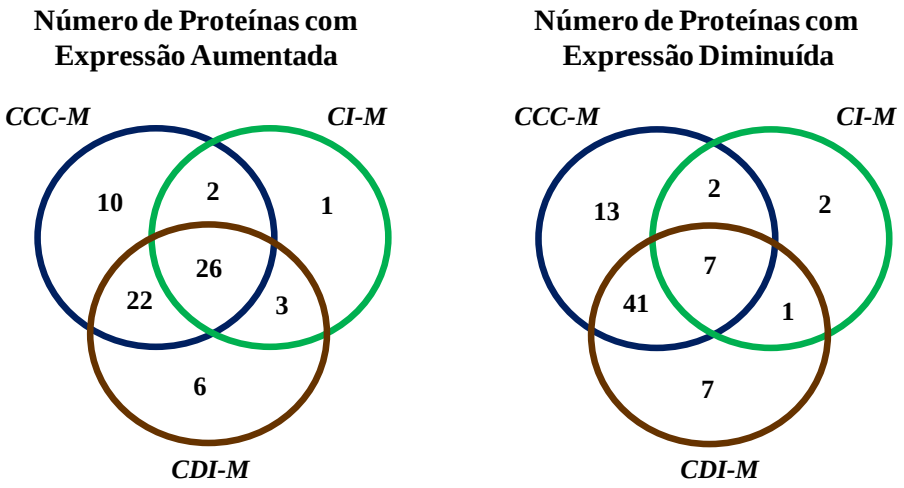


Figura 18. Diagramas de Venn representando a ocorrência de proteínas diferencialmente expressas comuns ou únicas nas relações entre grupos de pacientes com cardiomiopatias em comparação com grupo de indivíduos sem cardiomiopatias.M: Masculino.

Podemos observar no diagrama de Venn mostrado na figura 18 que, como na ocorrência dos “spots”, o grupo CCC e o grupo CDI são os que apresentam o maior número de proteínas distintas diferencialmente expressas comuns. Também podemos observar que o grupo CI apresenta um número maior de proteínas com aumento de expressão do que com diminuição.

A tabela 7 mostra as proteínas identificadas e o número de "spots" diferenciais que corresponderam a tais proteínas. As proteínas foram subdivididas por função biológica. Para tal utilizamos como base a classificação do "GeneOntology". Várias proteínas, apesar de terem sido classificadas em determinada função, podem também apresentar outras funções biológicas.

Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas no miocárdio de pacientes com CCC, CI e CDI em comparação com o miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias.

1. Proteínas estruturais e contráteis			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P17661	DESM	Desmin	***1.76***	4	***1.61***	2	***1.99***	8
P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	***1.95***	5	***1.42***	1	***1.68***	5
P51884	LUM	Lumican precursor	***2.68***	1	***1.92***	1	***2.30***	1
P19429	TNNI3	Troponin I, cardiac muscle	***1.33***	1	***1.41***	1	***1.44***	1
Q9BQE3	TBA1C	Tubulin alpha-1C chain	***1.81***	1			***1.92***	1
P07437	TBB5	Tubulin beta-5 chain	***1.60***	2			***1.59***	2
P61158	ARP3	Actin-like protein 3	***1.45***	1				
O00151	PDLI1	PDZ and LIM domain protein 1					***1.30***	1
P18206	VINC	Vinculin (Metavinculin)					***1.39***	2
P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	***-1.28***	8	***-1.09***	1	***-1.30***	5
O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	***-2.03***	5	***-1.55***	5	***-1.66***	5
P12883	MYH7	Myosin-7 (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	***-2.20***	1	***-2.56***	1	***-2.76***	1
Q16352	AINX	Alpha-internexin	***-1.32***	1			***-1.36***	1
P08590	MYL3	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	***-1.23***	2			***-1.22***	2
P10916	MLRV	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	***-1.28***	1			***-1.42***	3
P45379	TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	***-1.65***	1			***-1.58***	1
P08670	VIME	Vimentin	***-1.29***	1			***-1.28***	1
P35609	ACTN2	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	***-1.74***	1	***-1.76***	1		
P62736	ACTA	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	***-3.37***	1				
P12829	MYL4	Myosin light polypeptide 4 (Myosin light chain 1, embryonic muscle/atrial isoform)	***-2.38***	1				
Q9UJZ1	STML2	Stomatin-like protein 2	***-1.42***	1				

continua

continuação

P09493	TPM1	Tropomyosin-1 alpha chain	*-1.21*	1				
Q9ULI4	KI26A	Kinesin-like protein KIF26A			*-1.92*	1		
P47755	CAZA2	F-actin capping protein subunit alpha-2 (CapZ alpha-2).					*-1.12*	1
Q9NPC6	MYOZ2	Myozenin-2					*-1.19*	1
2. Metabolismo / 2.1. Glicólise			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P06744	G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase	*2.39*	1	*1.49*	1	*1.53*	1
P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	*1.28*	2	*1.21*	2	*1.26*	2
P14618	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	*1.34*	1	*1.15*	1	*1.17*	3
P06733	ENOA	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	*1.36*	1				
P04406	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	*1.25*	2				
P08237	K6PF	6-phosphofructokinase, muscle type	*-1.27*	1			*-1.25*	1
P13929	ENOB	Beta-enolase (Skeletal muscle enolase)	*-1.66*	1			*-1.59*	1
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	*-1.24*	1			*-1.23*	2
P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	*-1.27*	2			*-1.25*	2
P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	*-1.72*	2			*-1.79*	2
P60174	TPIS	Triosephosphate isomerase					*-1.11*	1
2. Metabolismo / 2.2. Ciclo de Krebs			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	*1.18*	2			*1.24*	1
Q99798	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)			*1.17*	3		
P36957	ODO2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial					*1.15*	1
P07954	FUMH	Fumarate hydratase, mitochondrial	*-1.47*	1			*-1.34*	1
P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	*-1.32*	3			*-1.33*	3
P21912	DHSB	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	*-1.55*	1			*-1.53*	1
P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	*-1.24*	3				
2. Metabolismo / 2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	*1.66*	4	*1.25*	3	*1.33*	3
P31040	DHSA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	*2.30*	2	*2.01*	2	*1.90*	2
O75489	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	*1.16*	1	*1.21*	1		
P24539	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	*-1.51*	2	*-1.37*	1	*-1.33*	2
P19404	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	*-1.29*	1	*-1.12*	1	*-1.35*	1
O75947	ATP5H	ATP synthase D chain, mitochondrial	*-1.26*	1			*-1.23*	1

continua

continuação

P31930	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	*-1.21*	2			*-1.17*	1
P22695	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	*-1.36*	1			*-1.32*	1
O95299	NDUAA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	*-1.28*	1			*-1.29*	1
P49821	NDUV1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	*-1.41*	2			*-1.30*	1
P28331	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	*-1.25*	2				
Q9P0J0	NDUAD	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13					*-1.25*	1
2. Metabolismo / 2.4. Complexo Creatina Quinase			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	*-1.71*	5	*-1.28*	2	*-1.79*	5
P17540	KCRS	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	*-1.25*	1			*-1.30*	1
2. Metabolismo / 2.5. Metabolismo de lipídeos - Beta-oxidação			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P30084	ECHM	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial			*1.37*	1	*1.36*	1
P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I precursor	*1.91*	1				
Q16698	DECR	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	*-1.47*	1			*-1.30*	2
P11310	ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	*-1.34*	1			*-1.22*	1
P42126	D3D2	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	*-1.35*	1	*-1.24*	1		
P42765	THIM	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	*-1.29*	1				
Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	*-1.33*	4				
P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	*-1.46*	3				
2. Metabolismo / 2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
Q16555	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	*1.35*	1			*1.35*	1
P13010	KU86	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	*-1.53*	1			*-1.52*	1
P22626	ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	*-1.27*	1				
2. Metabolismo / 2.7. Outros processos metabólicos			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P07339	CATD	Cathepsin D	*1.41*	1	*1.27*	1	*1.59*	1
P30038	AL4A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	*1.43*	1	*1.32*	1	*1.52*	1
P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	*1.28*	3	*1.14*	1	*1.26*	3
P00367	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	*1.50*	1	*1.16*	1	*1.29*	1
Q02252	MMSA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	*1.86*	1	*1.30*	1	*1.43*	1
Q16851	UGPA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	*1.56*	1	*1.25*	1	*1.36*	1
Q96BH1	RNF25	E3 ubiquitin-protein ligase	*1.60*	1			*1.53*	1

continua

continuação

P55809	SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	*1.38*	1			*1.28*	2
Q9HCC0	MCCB	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	*1.22*	1				
P27338	AOFB	Amine oxidase [flavin-containing] B			*1.61*	1	*1.56*	1
O75208	COQ9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial					*1.22*	1
P17174	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	*-1.39*	2	*-1.23*	2	*-1.38*	2
P24752	THIL	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	*-1.28*	1			*-1.21*	1
P00568	KAD1	Adenylate kinase isoenzyme 1	*-1.47*	1			*-1.26*	1
P30043	BLVRB	Flavin reductase	*-1.44*	1			*-1.46*	1
P40925	MDHC	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	*-1.31*	1			*-1.26*	1
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P			*-1.13*	1	*-1.15*	1
P28161	GSTM2	Glutathione S-transferase Mu 2					*-1.22*	1
3. Resposta ao estresse e Apoptose			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P38646	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	*1.67*	2	*1.52*	2	*1.65*	2
Q13114	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	*1.70*	1	*1.35*	1	*1.55*	2
P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	*1.72*	3			*1.71*	3
P14625	ENPL	Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1)	*2.74*	1			*2.21*	1
P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1	*1.45*	1			*1.39*	2
P07900	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	*1.56*	1			*1.55*	1
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	*1.66*	2			*1.50*	2
P07237	PDIA1	Protein disulfide-isomerase precursor	*2.01*	1			*1.78*	1
P04040	CATA	Catalase	*1.35*	2				
Q9UBY9	HSPB7	Heat shock protein beta-7	*1.50*	1				
O14763	TR10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	*1.33*	1				
P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).					*1.24*	2
P02743	SAMP	Serum amyloid P-component precursor					*1.53*	1
Q96FI4	NEIL1	Endonuclease VIII-like 1	*-1.43*	1			*-1.37*	1
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	*-1.16*	1			*-1.17*	1
P30048	PRDX3	Peroxiredoxin-3	*-1.15*	1			*-1.13*	1
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	*-1.20*	1			*-1.19*	3
P04792	HSPB1	Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein)	*-1.13*	1				
P02511	CRYAB	Alpha crystallin B chain					*-1.39*	1
4. Resposta Imune			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P01024	CO3	Complement C3 precursor	*2.44*	1	*1.65*	1	*1.89*	2
P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	*4.53*	3	*1.98*	3	*2.52*	3

continua

continuação

P17931	LEG3	Galectin-3	*1.37*	1				
Q13325	IFIT5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5					*1.55*	1
5. Sinalização Celular			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
N. Acesso	**Sigla**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P63104	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	*1.64*	1			*1.36*	1
P04083	ANXA1	Annexin A1 (Annexin I)	*2.35*	1			*1.56*	1
P08758	ANXA5	Annexin A5 (Annexin V)	*2.51*	2			*1.86*	2
Q96AX9	MIB2	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	*1.32*	1			*1.29*	1
P51451	BLK	Tyrosine-protein kinase BLK	*1.86*	1				
P49674	KC1E	Casein kinase I isoform epsilon	*-1.56*	1			*-1.43*	1
P31751	AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	*-4.40*	1			*-3.67*	1
P63218	GBG5	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5					*-1.69*	1
6. Controle da transcrição e tradução			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
Sigla	**N. Acesso**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P49588	SYAC	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	*1.67*	2			*1.61*	1
Q5TYW1	ZN658	Zinc finger protein 658	*1.59*	1			*1.53*	1
Q96GE5	ZN799	Zinc finger protein 799					*1.79*	1
O75822	EIF3J	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	*-1.27*	1			*-1.22*	1
Q15056	IF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H	*-1.33*	1			*-1.27*	1
Q6P2E9	EDC4	Enhancer of mRNA-decapping protein 4					*-1.24*	1
7. Transporte			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
Sigla	**N. Acesso**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
Q9H115	SNAB	Beta-soluble NSF attachment protein	*2.93*	1	*1.84*	1	*2.55*	1
Q6ZNA5	FRRS1	Ferric-chelate reductase 1	*1.69*	1	*1.59*	1	*1.84*	1
P55851	UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2	*-1.90*	1			*-2.30*	1
8. Ligação ao cálcio			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
Sigla	**N. Acesso**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	*2.33*	3	*1.29*	1	*2.28*	3
P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	*1.67*	3			*1.32*	2
P00488	F13A	Coagulation factor XIII A chain	*1.41*	1			*1.41*	1
Q9H223	EHD4	EH domain-containing protein 4	*-1.44*	1			*-1.45*	1
9. Proteassoma			**CCC-M / N-MY**		**CI-M / N-MY**		**CDI-M / N-MY**	
Sigla	**N. Acesso**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
Q06323	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1 (Interferon gamma up-regulated I-5111 protein)	*1.67*	1				

continua

continuação

10. Outras funções			CCC-M / N-MY		CI-M / N-MY		CDI-M / N-MY	
Sigla	**N. Acesso**	**Nome**	**R**	**No.S**	**R**	**No.S**	**R**	**No. S**
P50461	CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein 3	***2.26***	1	***2.09***	1	***2.34***	1
Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	***1.30***	3	***1.17***	2	***1.33***	3
P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	***3.00***	3	***2.03***	3	***2.67***	3
P02768	ALBU	Serum albumin precursor	***2.44***	4	***2.11***	2	***1.98***	4
Q9BSD4	YP016	Uncharacterized protein MGC16385	***2.44***	1	***1.33***	1	***1.66***	1
P28838	AMPL	Cytosol aminopeptidase	***1.38***	2			***1.23***	1
Q76G19	PDZD4	PDZ domain-containing protein 4	***1.63***	1			***1.37***	1
Q9NX63	CHCH3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	***1.15***	1	***1.19***	1		
Q8NFQ5	BPIL3	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3			***1.17***	1	***1.19***	1
A8MWA6	F90AM	Putative protein FAM90A22	***1.26***	1				
Q8WWW8	GAB3	GRB2-associated-binding protein 3	***-1.33***	1			***-1.44***	1
Q96N16	JKIP1	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	***-1.90***	1			***-1.95***	1
P02144	MYG	Myoglobin	***-1.74***	2			***-1.28***	3
P30086	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	***-1.17***	1			***-1.19***	1
Q96P53	WDFY2	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2	***-1.32***	1			***-1.38***	1
P23276	KELL	Kell blood group glycoprotein	***-1.21***	1				
Q5T5P2	SKT	Sickle tail protein homolog	***-1.32***	1				
A6NNV3	W19L5	Putative WBSCR19-like protein 5			***-1.40***	1		

M: Masculino; Y: "Young" (idade inferios a 40 anos); R: razão; No.S: Número de "spots" identificados como tal proteína; Vermelho: Expressão aumentada; Azul: Expressão diminuída em comparação com o grupo N-MY (indivíduos sem cardiomiopatias).

Como podemos observar na tabela, grande número das proteínas diferencialmente expressas em amostras de pacientes com CCC em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias, também são observadas em amostras de pacientes com CDI.

De uma maneira geral podemos observar que diversas proteínas envolvidas no metabolismo energético apresentam expressão alterada nos pacientes com cardiomiopatias em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias, sendo que os

pacientes com CI são os que apresentam menor número de proteínas com alterações. O miocárdio de pacientes com CCC apresenta comprometimento em diversas vias metabólicas como a beta oxidação e o sistema creatina quinase.

As proteínas estruturais/contráteis com expressão alterada são as mais compartilhadas entre cardiomiopatias.

Também observamos diversas proteínas envolvidas na resposta ao estresse com alterações no nível de expressão, como as proteínas de choque térmico (HSP – heat shock proteins).

Iremos detalhar melhor as alterações observadas no item discussão.

Como exemplo, a figura 19 mostra a diferença de expressão de uma isoforma da proteína creatina quinase M entre os vários grupos de amostras. Esta se encontra com expressão reduzida no miocárdio dos pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatia, sendo que o miocárdio de pacinetes com CCC são os que apresentam o maior comprometimento.

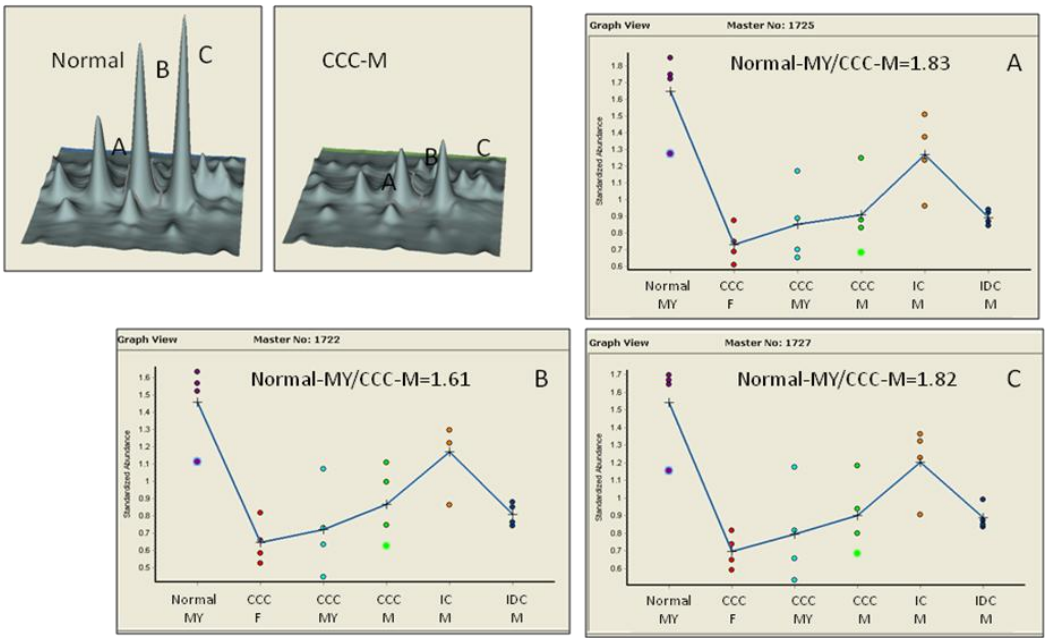


Figura 19. Análise da expressão diferencial da proteína creatina quinase M.Os gráficos mostram a diferença de expressão de três isoformas da proteína creatina quinase M. M: Masculino; F: Feminino; Y: "Young" (idade inferios a 40 anos).

4.3.3. Análise de padrões na expressão protéica diferencial

A análise de padrões das proteínas diferencialmente expressas foi realizada através do programa "DeCyder-EDA (Extended Differencial Analysis)". Este é utilizado para uma análise mais completa e precisa do padrão de expressão protéica entre as amostras. No Módulo EDA realizamos as seguintes análises:

- Análise da Expressão Diferencial (DEA – "Differential Expression Analysis"): Como no módulo BVA, está análise investiga a expressão diferencial entre dois ou mais grupos experimentais.

- Análise do Componente Principal (PCA – “Principal Component Analysis”): É um método utilizado para reduzir a dimensão das variáveis em um espaço multidimensional, facilitando assim a identificação de pontos extremos dentro do conjunto de dados, e agrupando-os. Como conjuntos de dados podemos considerar tanto as proteínas quanto os mapas de “spots” (um mapa de “spot” é o gel bidimensional de cada amostra com informações da expressão das proteínas).

- Análise de Padrões (PA – “Pattern Analysis”): Investiga se existe um padrão de expressão entre as proteínas ou os mapas de “spots”.

Foram realizados dois tipos de cálculos para a análise do componente principal:

- Proteínas versus mapas de “spots”: Restringe os mapas de “spots” para se ter uma visão simplificada do comportamento das proteínas no conjunto de dados. Esta análise identifica proteínas com valores extremos, que não se enquadram no padrão das demais.

- Mapas de “spots” versus proteínas: Restringe as proteínas para se ter uma visão simplificada do comportamento mapas de “spots”. Esta análise identifica mapas de “spots” que não se enquadram no padrão das demais.

Para cada análise são feitos dois gráficos, como pode ser observado nas figuras 20 e 21. O gráfico da esquerda é o “score plot”, mostrando a distribuição do

primeiro parâmetro (proteínas ou mapas de “spots”) e o gráfico da direita é o “loading plot”, mostrando a distribuição do segundo parâmetro em relação ao primeiro. A elipse presente no “score plot” representa um nível de significância de 95%. Pontos fora da elipse são extremos e devem ser checados. Proteínas extremas podem representar proteínas muito expressas ou “spots” sem correlação. Os mapas de “spots” de um mesmo grupo experimental devem ficar próximos, caso algum não fique próximo indica que este apresenta um padrão de expressão protéica diferente do restante do grupo.

A figura 20 mostra a análise do componente principal dos “spots” diferencialmente expressos em amostras de pacientes CCC, CDI e CI em comparação com amostras de pacientes sem cardiomiopatias. Estes “spots” correspondem às tabelas do anexo E (proteínas com expressão aumentada em CCC, CDI ou CI em comparação com N) e do anexo F (proteínas com expressão reduzida em CCC, CDI ou CI em comparação com N).

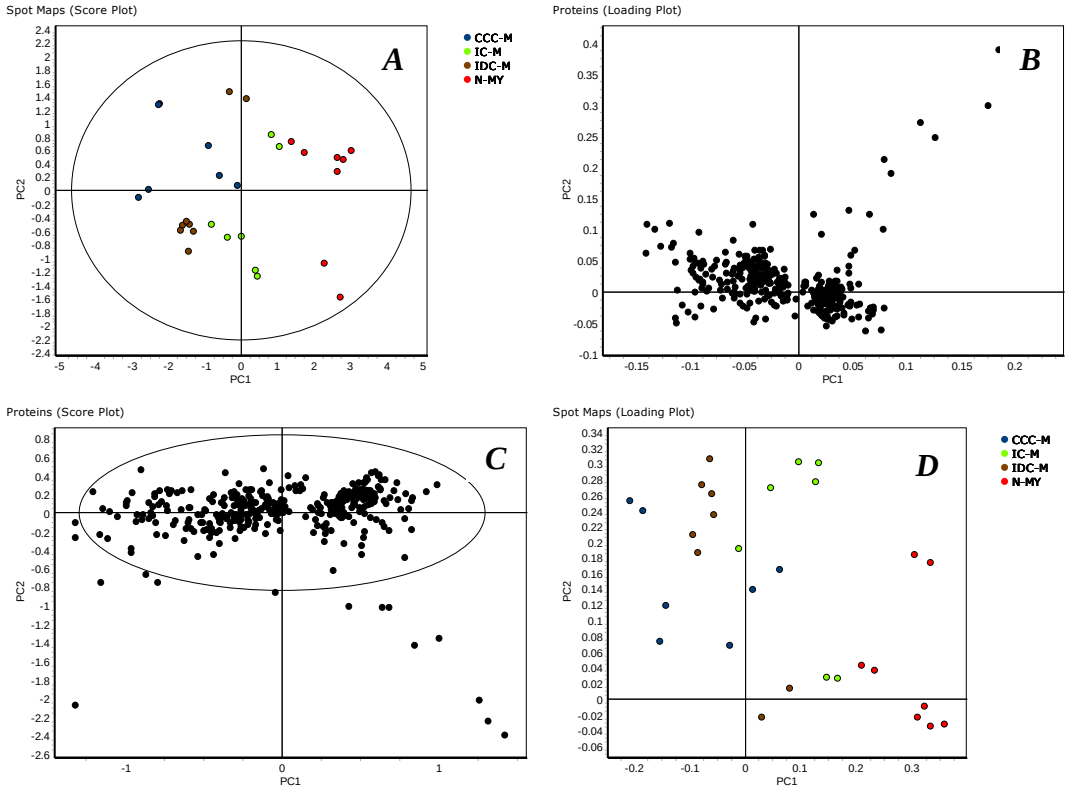


Figura 20. Resultados do cálculo PCA no conjunto de proteínas diferencialmente expressas.A: Mapas de "spots" versus proteínas ("Score plot"); B: Mapas de "spots" versus proteínas ("Loading plot"); C: Proteínas versus mapas de "spots" ("Score plot") D: Proteínas versus mapas de "spots" ("Loading plot"). Os pontos coloridos representam cada mapa de "spots" (cada amostra) com a cor do seu respectivo grupo experimental (N: vermelho; CCC: azul; CDI: marrom; CI: verde).

Como podemos observar na figura 20 - C, alguns "spots" estão fora da elipse de significância de 95%, podendo prejudicar a análise de padrões realizada a seguir. Sendo assim excluímos estes "spots" da análise do componente principal. A figura 21 mostra a reanálise do componente principal excluindo tais "spots".

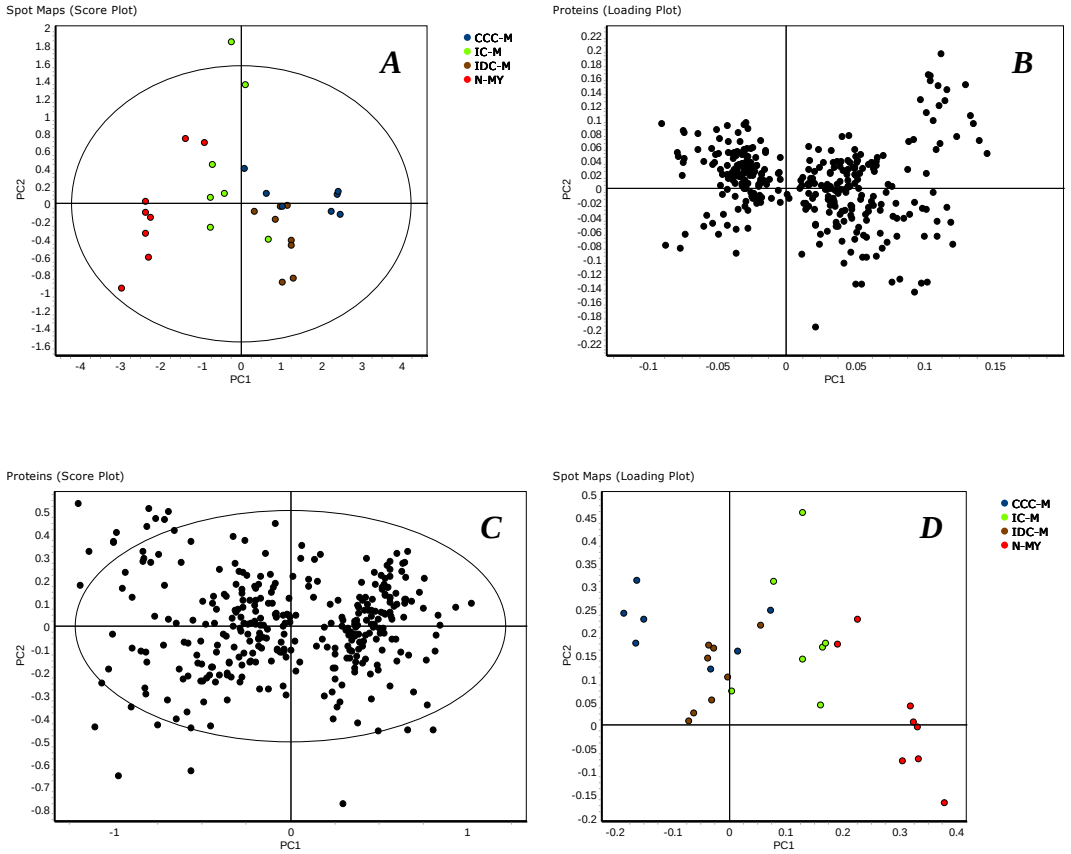


Figura 21. Resultados do cálculo PCA no conjunto de proteínas diferencialmente expressas, excluindo "spots" com expressão extrema.A: Mapas de "spots" versus proteínas ("Score plot"); B: Mapas de "spots" versus proteínas ("Loading plot"); C: Proteínas versus mapas de "spots" ("Score plot") D: Proteínas versus mapas de "spots" ("Loading plot"). Os pontos coloridos representam cada mapa de "spots" (cada amostra) com a cor do seu respectivo grupo experimental (N: vermelho; CCC: azul; CDI: marrom; CI: verde).

Como podemos observar nas figuras, os mapas de "spots" do grupo N (indivíduos sem cardiomiopatias) e do grupo CCC ficaram agrupados em locais distintos, enquanto que os mapas de "spots" do grupo CI ficaram próximos aos mapas de "spots" do grupo N. No entanto, um dos mapas de "spot" do grupo CI ficou fora da elipse de significância de 95%, mostrando que tal paciente possui um padrão de expressão um pouco diferente dos demais. Os mapas de "spots" do grupo CDI ficaram próximos aos mapas de "spots" do grupo CCC, indicando que amostras

deste grupo apresentam padrão de expressão protéica parecido com o com o padrão de expressão do grupo CCC.

Através da análise de padrões, também chamada de “Cluster Analysis”, podemos identificar similaridades na expressão de proteínas ou grupos de proteínas, identificar marcadores de diagnóstico e prognóstico, identificar similaridades entre os grupos experimentais, etc.

Vários tipos de algoritmos estão presentes no programa “DeCyder-EDA” para a análise de padrões, como “Hierarchical cluster”, “k-means”, “self-organizing maps” e “gene shaving”. Utilizamos o algoritmo “Hierarchical cluster”, e para medida de similaridades utilizamos o método “Pearson Correlation Coefficient”. As figuras 22 e 23 mostram o resultado da análise em duas dimensões: acima os dendrogramas representam o agrupamento das amostras por similaridade, e ao lado (esquerda), os dendrogramas representam o agrupamento das proteínas por similaridade no padrão de expressão.

A figura 22 mostra a análise de padrões das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos CCC, CDI ou CI, em comparação com o grupo N. A figura 23 mostra a análise de padrões das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos CCC, CDI ou CI, em comparação com o grupo N, excluindo os “spots” com expressão extrema, como verificamos na análise da figura 20.

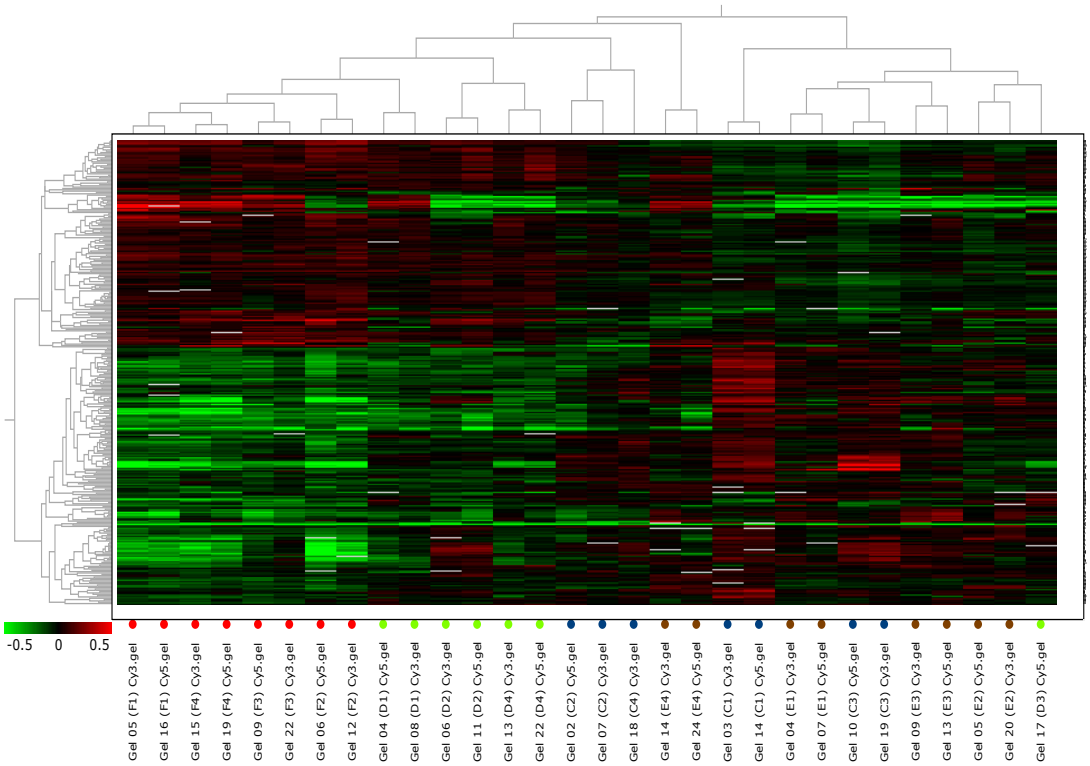


Figura 22. Resultado da análise de padrões (“Hierarchical Cluster”), considerando as proteínas diferencialmente expressas.Acima, os dendrogramas representam o agrupamento das amostras por similaridade, e ao lado (esquerda), os dendrogramas representam o agrupamento das proteínas por similaridade no padrão de expressão. Os pontos coloridos representam cada mapa de “spots” (cada amostra) com a cor do seu respectivo grupo experimental (N: vermelho; CCC: azul; CDI: marrom; CI: verde).

Como podemos observar na figura 22, as amostras pertencentes ao grupo CI apresentaram um padrão mais parecido com as amostras do grupo N. No entanto, as amostras dos pacientes com CCC e CDI misturaram-se, indicando a similaridade no padrão de expressão destas duas cardiomiopatias. Contudo, se observarmos a figura 20, na análise do PCA, podemos verificar que algumas proteínas expressão extrema, o que prejudica a análise de hierarquização. Sendo assim, realizamos nova análise excluindo tais “spots”, como mostrado na figura 23.

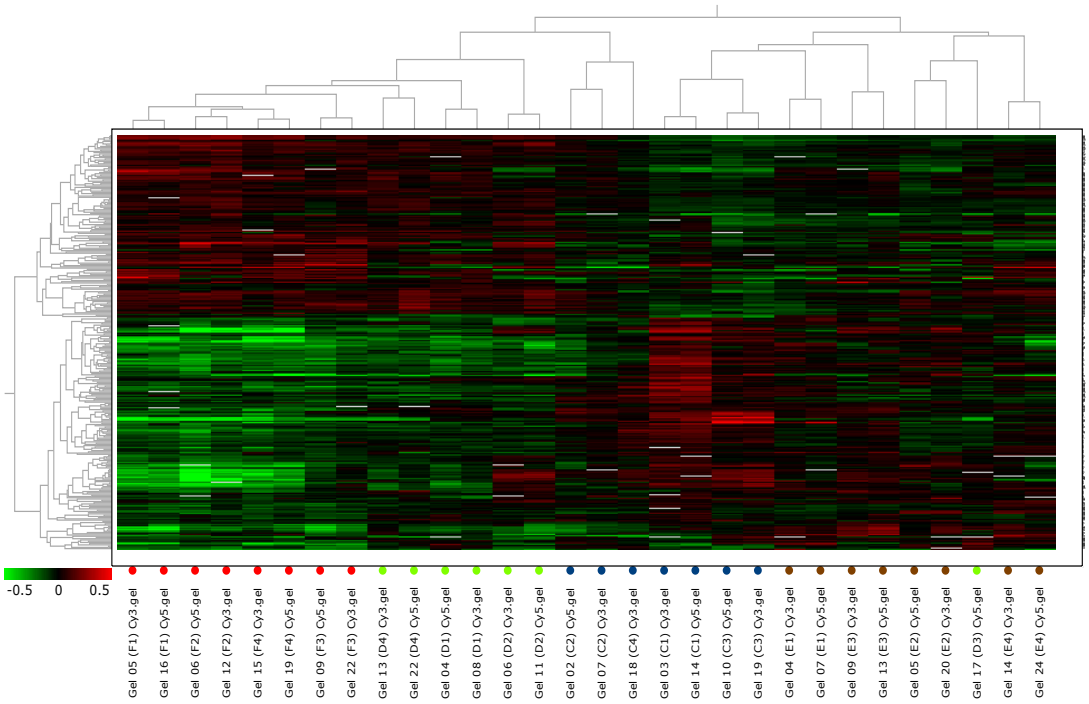


Figura 23. Resultado da análise de padrões ("Hierarchical Cluster"), considerando as proteínas diferencialmente expressas, excluindo "spots" com expressão extrema. Acima, os dendrogramas representam o agrupamento das amostras por similaridade, e ao lado (esquerda), os dendrogramas representam o agrupamento das proteínas por similaridade no padrão de expressão. Os pontos coloridos representam cada mapa de "spots" com a cor do seu respectivo grupo experimental (N: vermelho; CCC: azul; CDI: marrom; CI: verde).

As amostras pertencentes ao grupo CI apresentaram um padrão mais parecido com as amostras do grupo N, enquanto que as amostras do grupo CCC e do grupo CDI apresentaram um padrão de expressão completamente distinto do padrão de expressão do grupo N. Uma das amostras do grupo CI apresentou perfil de expressão mais parecido com amostras do grupo CDI.

A partir desta análise de padrões, utilizando as proteínas diferencialmente expressas entre os pacientes com cardiomiopatias em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias, podemos observar que ocorreu o agrupamento dos pacientes de acordo com a doença, o que realmente indica que o padrão de expressão protéica diferencial é específico para cada uma das cardiomiopatias.

4.4. Estudo de alterações de enzimas envolvidas no metabolismo energético no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatia

Através análise proteômica diferencial, observamos que proteínas envolvidas no metabolismo energético estão diferencialmente expressas entre amostras de miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias. Proteínas envolvidas na geração de ATP, como componentes do complexo da ATP sintase, e envolvidas na translocação do ATP da mitocôndria para as miofibrilas, como componentes do sistema creatina quinase, são de fundamental importância para o funcionamento cardíaco. Sendo assim nesta parte do trabalho realizamos a análise destas enzimas por outros métodos experimentais como descritos a seguir.

4.4.1. Análise da expressão protéica diferencial de enzimas envolvidas no metabolismo energético por eletroforese bidimensional convencional

A análise da expressão protéica de algumas enzimas do metabolismo energético também foi realizada pela eletroforese bidimensional convencional, utilizando coloração por "Coomassie Blue Colloidal". Para cada grupo, fizemos um "pool" com amostras de cinco pacientes, formando os seguintes grupos: grupo N (Normal): amostras de indivíduos sem cardiomiopatias; grupo CCC: amostras de pacientes com CCC; grupo CDI: amostras de pacientes com CDI; e grupo CI: amostras de pacientes com CI. Em seguida, realizamos a separação das proteínas por

eletroforese bidimensional, utilizando para a primeira dimensão tiras de pH imobilizado na faixa de pH de 3 a 10 com gradiente linear, e para a segunda dimensão gel de poliacrilamida 12,5%. Os géis foram corados com “Coomassie Blue Colloidal”. A figura 18 mostra os géis bidimensionais de cada grupo de amostras.

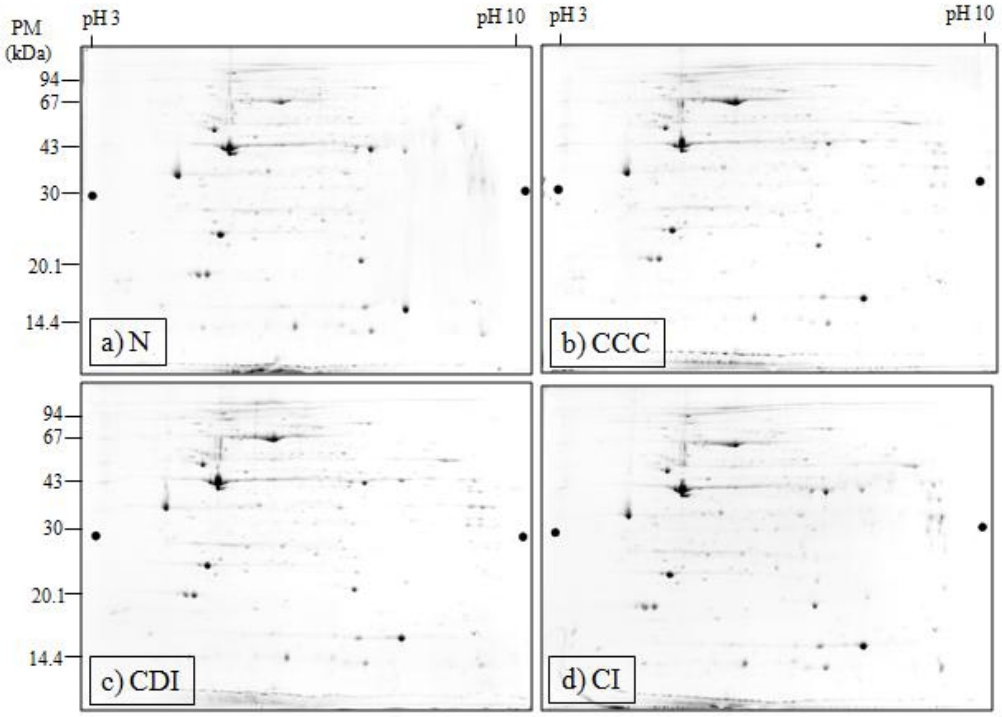


Figura 24. Géis bidimensionais de amostras de pacientes com CCC, CDI, e CI e de indivíduos sem cardiomiopatia (N), utilizando tiras de pH imobilizado na faixa de 3-10L e de 24 cm de comprimento, gel SDS-PAGE de 12,5% e coloração por “Coomassie Blue Colloidal”.

A análise dos géis bidimensionais foi realizada com o programa Melanie 6.0 (GeneBio). A seleção dos “spots” e a comparação entre os géis foram realizadas pelo programa automaticamente. Para a análise comparativa, o gel do grupo N foi utilizado como referência.

Com o objetivo de analisar as proteínas envolvidas no metabolismo energético, selecionamos os “spots” correspondentes a tais proteínas. A análise foi realizada de forma semi-quantitativa, uma vez que utilizamos o “pool” das amostras para a realização de um gel de cada grupo, não sendo possível aplicar testes estatísticos nesta análise.

Comparamos o volume normalizado (ou seja, o volume do “spot” dividido pela soma dos volumes dos “spots” de todo o gel) das proteínas em cada um dos géis em um histograma. Nos histogramas mostrados nas figuras a seguir, as barras amarelas representam o volume normalizado de cada grupo de amostra (a. grupo N, b. grupo CCC, c. grupo CDI e d. grupo CI). A linha azul representa a média entre os volumes normalizados dos “spots” nos géis, e as linhas vermelhas representam o desvio padrão.

Primeiramente, analisamos os “spots” que foram identificados como sendo a proteína creatina quinase M (figura 25). Duas isoformas desta proteína apresentaram expressão reduzida nas amostras dos grupos de pacientes com cardiomiopatias em comparação com o grupo N, sendo que o grupo CCC apresentou a maior redução.

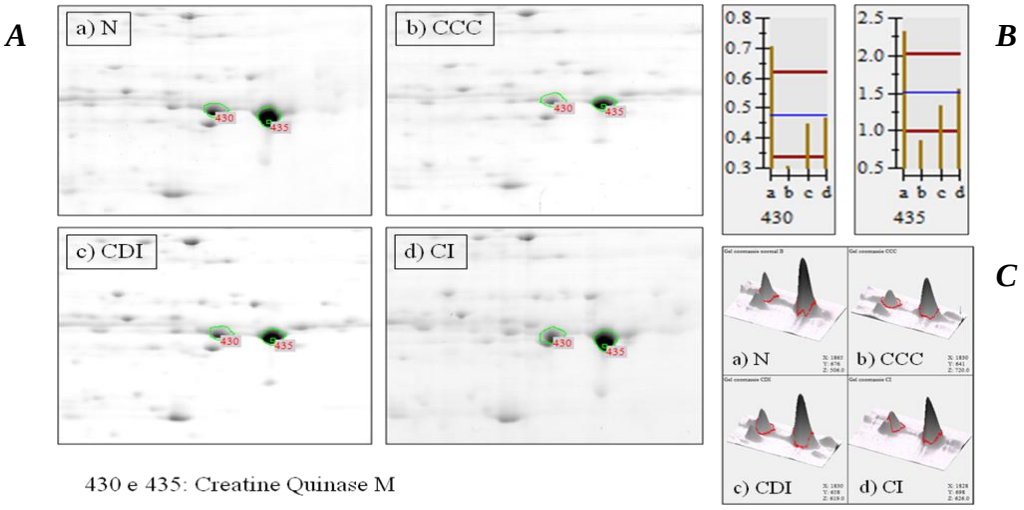


Figura 25. Análise da expressão protéica diferencial da proteína creatina quinase M.
A.) Géis bidimensionais mostrando os "spots" correspondentes à proteína.
B.) Histograma do volume normalizado do "spot" em cada gel (barras amarelas), linha azul: média dos volumes normalizados, linha vermelha: desvio padrão.
C.) Visão tridimensional dos "spots".

Analisamos também quatro "spots" correspondentes à proteína aconitase 2, mitocondrial. Nesta análise observamos que todas as isoformas desta proteína apresentaram expressão reduzida no grupo CCC em relação ao grupo N, enquanto que apresentaram expressão aumentada no grupo CI em relação ao grupo N. No grupo CDI, três isoformas apresentaram diminuição de expressão e uma isoformas com aumento de expressão em relação ao grupo N (figura 26).

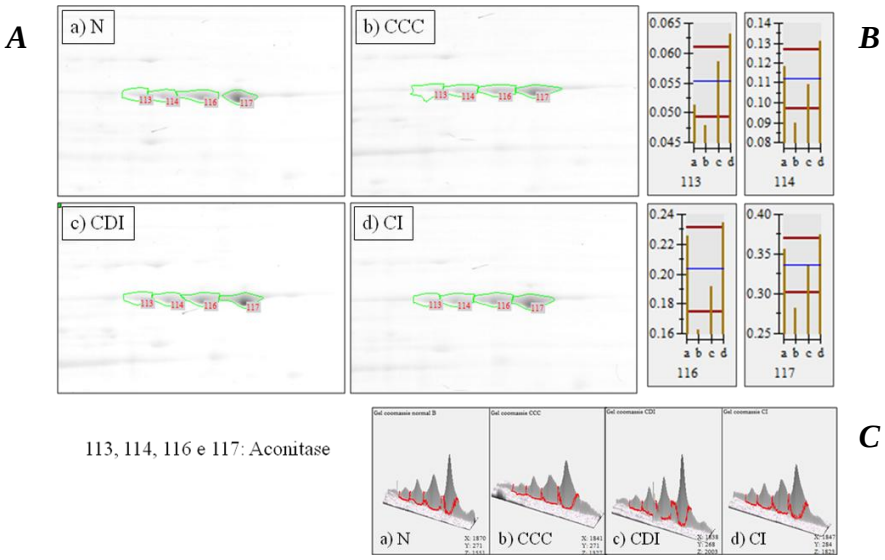


Figura 26. Análise da expressão protéica diferencial da proteína aconitase 2, mitocondrial.
A.) Géis bidimensionais mostrando os "spots" correspondentes à proteína.
B.) Histograma do volume normalizado do "spot" em cada gel (barras amarelas), linha azul: média dos volumes normalizados, linha vermelha: desvio padrão.
C.) Visão tridimensional dos "spots".

A análise dos "spots" correspondentes à proteína ATP sintase, cadeia alfa (figura 27), também mostrou que todas as isoformas desta proteína apresentaram expressão reduzida no grupo CCC em relação ao grupo N. O grupo CDI também apresentou diminuição na expressão das três isoformas da ATP sintase alfa, enquanto que o grupo CI apresentou aumento de expressão em duas isoformas e diminuição de uma isoforma da proteína em relação ao grupo N.

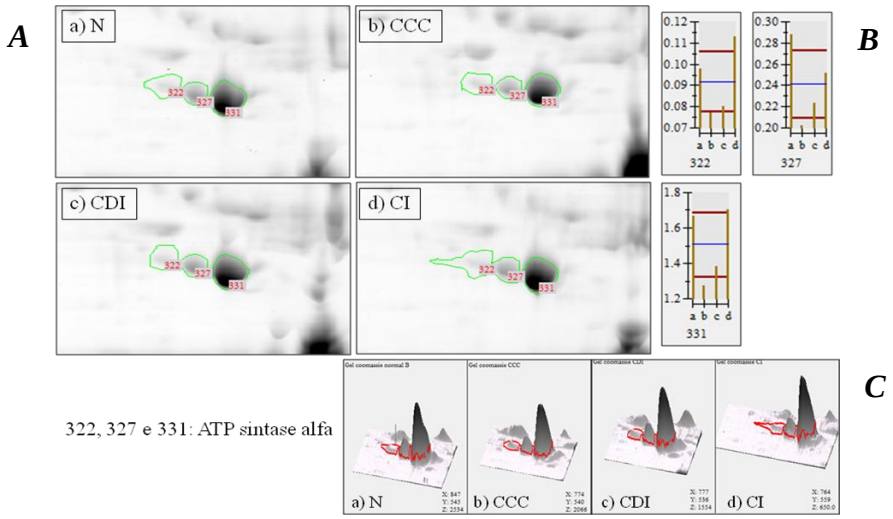


Figura 27. Análise da expressão protéica diferencial da proteína ATP sintase, cadeia alfa.
A.) Géis bidimensionais mostrando os "spots" correspondentes à proteína.
B.) Histograma do volume normalizado do "spot" em cada gel (barras amarelas), linha azul: média dos volumes normalizados, linha vermelha: desvio padrão.
C.) Visão tridimensional dos "spots".

De acordo com estas análises, podemos observar que o grupo de amostras de pacientes com CCC apresentou diminuição da expressão das proteínas analisadas envolvidas no metabolismo energético - creatina quinase M, aconitase e ATP sintase, cadeia alfa - tanto em relação ao grupo de amostras de indivíduos sem cardiomiopatias quanto em relação aos grupos de amostras de pacientes com CDI e CI.

4.4.2. Análise da expressão protéica diferencial de enzimas envolvidas no metabolismo energético por "Western-Blotting"

Nestes experimentos, utilizamos 5 amostras de cada grupo, e todos foram aplicadas no mesmo gel (figura 28) e a transferência realizada em uma única membrana (figura 29). Desta maneira esperamos minimizar interferências que prejudiquem a quantificação.

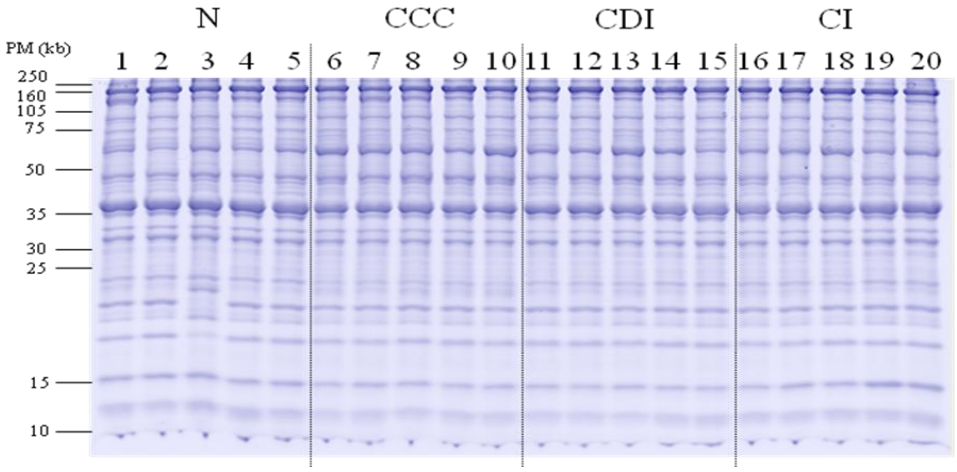


Figura 28. Eletroforese unidimensional das amostras utilizadas nos experimentos de "Western-Blotting".SDS-PAGE 12,5%, 30µg de proteínas, gel corado por "Coomasie Blue Colloidal".

Após a revelação do filme de raio-X, este foi escaneado (Figura 29) e a densitometria realizada com auxílio do programa "ImageQuant TL".

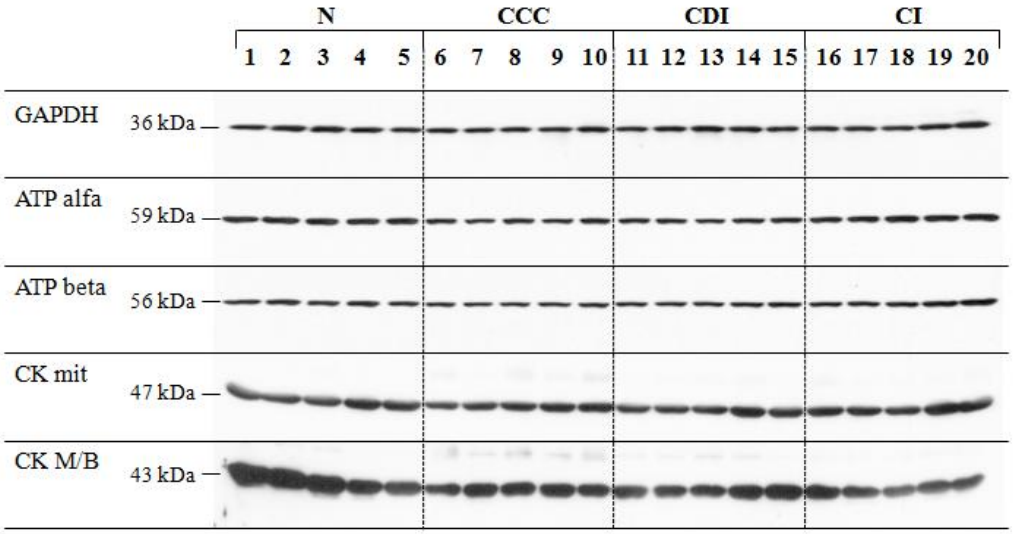


Figura 29. "Western-blotting" das proteínas ATP sintase alfa, ATP sintase beta, creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B e GAPDH, utilizada como marcador endógeno, de cinco amostras de cada grupo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa "Prism 4". Primeiramente analisamos todos os grupos utilizando o teste "One Way Anova", seguido pelo teste "Newman-Keuls" para a comparação dos grupos aos pares. Os valores da densitometria de cada alvo (ATP sintase alfa, ATP sintase beta, creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B) foram normalizados pelos valores da proteína GAPDH. A relação alvo/GAPDH foi utilizada para a realização das comparações e análise estatística. A figura abaixo mostra a expressão diferencial das proteínas ATP sintase alfa e ATP sintase beta (figura 30).

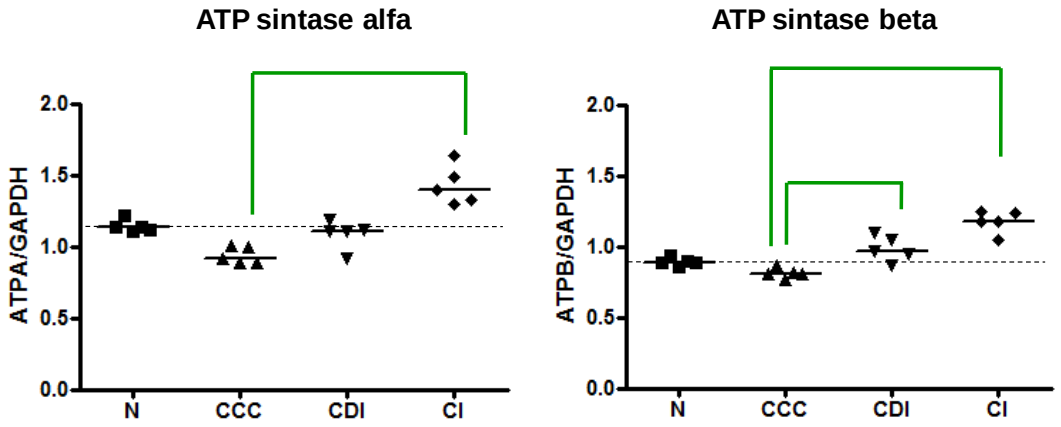


Figura 30. Análise da expressão diferencial das proteínas ATP sintase alfa e ATP sintase beta nas amostras de miocárdio.Os valores da densitometria de cada proteína para cada amostra foram normalizados pelos valores do GAPDH. As linhas horizontais representam a mediana entre as amostras de cada grupo.

Tabela 8. Análise estatística da expressão protéica diferencial das proteínas ATP sintase alfa e ATP sintase beta.

	ATP sintase alfa	**ATP sintase beta**
One Way Anova	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Newman-Keuls	**ATP sintase alfa**	**ATP sintase beta**
N x CCC	**$p < 0,01$**	$p > 0,05$
N x CDI	$p > 0,05$	**$p < 0,05$**
N x CI	**$p < 0,001$**	**$p < 0,001$**
CCC x CDI	**$p < 0,05$**	**$p < 0,01$**
CCC x CI	**$p < 0,001$**	**$p < 0,001$**
CDI x CI	**$p < 0,001$**	**$p < 0,001$**

No teste “One Way Anova”, as proteínas ATP sintase alfa e ATP sintase beta, apresentaram diferenças significantes entre os grupos (tabela 8). A análise entre os grupos aos pares mostrou que as amostras de pacientes com CCC apresentaram expressão reduzida da enzima ATP sintase alfa em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia (N). As amostras de pacientes com CDI apresentaram aumento

de expressão da enzima ATP sintase beta em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia. Enquanto que as amostras de pacientes com CI apresentaram um aumento de expressão de ambas as proteínas, ATP sintase alfa e ATP sintase beta, em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia. Entre os pacientes portadores de cardiomiopatias, as amostras de pacientes com CCC apresentaram expressão reduzida das enzimas em relação às amostras de pacientes com CDI e de pacientes com CI.

A figura abaixo mostra a expressão diferencial das proteínas creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B (figura 31).

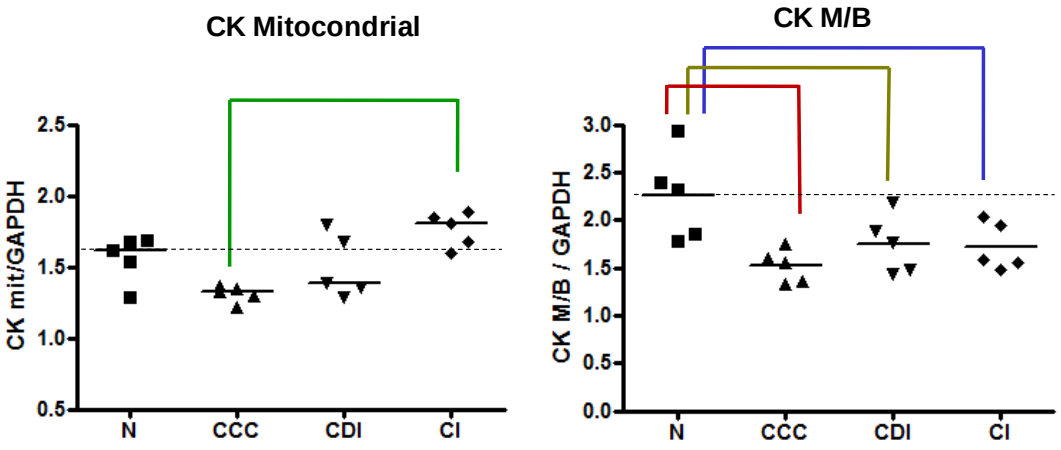


Figura 31. Análise da expressão diferencial das proteínas creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B nas amostras de miocárdio.Os valores da densitometria de cada proteína para cada amostra foram normalizados pelos valores do GAPDH. As linhas horizontais representam a mediana entre as amostras de cada grupo.

Tabela 9. Análise estatística da expressão protéica diferencial das proteínas creatina quinase mitocondrial e creatina quinase M/B.

	CK mitocondrial	**CK M/B**
One Way Anova	$p < 0,01$	$p < 0,05$
Newman-Keuls	**CK miocondrial**	**CK M/B**
N x CCC	$p > 0,05$	$\mathbf{p < 0,01}$
N x CDI	$p > 0,05$	$\mathbf{p < 0,05}$
N x CI	$p > 0,05$	$\mathbf{p < 0,05}$
CCC x CDI	$p > 0,05$	$p > 0,05$
CCC x CI	$\mathbf{p < 0,01}$	$p > 0,05$
CDI x CI	$\mathbf{p < 0,05}$	$p > 0,05$

No teste "One Way Anova", as proteínas envolvidas no sistema da creatina quinase apresentaram diferenças significantes entre os grupos (tabela 9). Pelo gráfico (figura 31) podemos observar que as amostras dos pacientes com CCC e CDI apresentaram expressão reduzida da enzima creatina quinase mitocondrial, e as amostras de pacientes com CI apresentaram um aumento em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia (grupo N), apesar das análises não serem estatisticamente significante. A análise estatística pelo teste "Newman-Keuls" mostrou que esta enzima apresenta redução estatisticamente significante em amostras de pacientes com CCC e CDI em relação às amostras de pacientes com CI. A enzima creatina quinase M/B apresentou diminuição da expressão em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia.

4.4.3. Análise da expressão do RNA mensageiro de enzimas do metabolismo energético no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatia

Para a análise da expressão do RNA mensageiro (RNAm) das enzimas envolvidas no metabolismo energético, e encontradas com diferença de expressão protéica entre amostras de miocárdio de pacientes com CCC, CDI CI e indivíduos sem cardiomiopatia (grupo normal), utilizamos a técnica de "real time RT-PCR". Seqüências de "primers" foram desenhadas com auxílio do programa "Primer Express"; e a eficiência de amplificação foi calculada para cada par de "primer" (tabela 10). Os genes alvos estudados foram: aconitase 2 (ACO2), ATP sintase cadeia alfa (ATPA), ATP sintase cadeia beta (ATPB), creatina quinase M (CKM), creatina quinase B (CKB) e creatina quinase mitocondrial (CKMit).

Tabela 10. Características dos "primers" utilizados.

Gene	N° acesso Gene bank	Sequência 5'→ 3'	Tam. Ampl. (pb)	Eficiência
ACO2	NM_001098	ATTGTTCGCAAACGACTGAACC CGACTTGCCTCGCTCAATTTC	102	2.04
ATPA	NM_001001937	TCTTCAAAAGACTGGGACTGCTGA AAGACACGCCCAGTTTCTTCAAG	99	2.04
ATPB	NM_001686	GCCCAGCATTTGGGTGAGA GATTGGTGCACCAGAATCCAGT	99	1.90
CKM	NM_001824	GCTCTCTGTGGAAGCTCTCAACA GATGAGCTGCTGCTGCTCCT	97	1.95
CKB	NM_001823	CCGCGGTATCTGGCACAA CCTTCATGTTGCCCCCCTT	101	2.10
CKMit	NM_001825	TGACGAGGAGTCCTATGAGGTGTT AGATCCGTTGTGTGCTTCATCAC	102	2.01

O número de acesso no banco de dados (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) corresponde a seqüências de RNAm de humano. Tam. ampl., tamanho do produto de amplificação; pb, pares de base; 2.0 equivale a 100% de eficiência.

Apenas os pares com eficiência de 100% foram utilizados para os cálculos da quantidade relativa de RNAm presente nas amostras de miocárdio de pacientes com CCC, com CDI, com CI em relação às amostras de miocárdio sem cardiomiopatia. A figura 32 mostra uma curva de dissociação típica (A), mostrando a especificidade do produto amplificado, e também uma curva de amplificação (B), usada posteriormente para o cálculo da eficiência dos "primers". A figura também mostra os gráficos de eficiência (C) para cada um dos "primers" utilizados no estudo. Para o cálculo da eficiência foram utilizadas as seguintes diluições: 1. cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2. cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3. cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4. cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA).

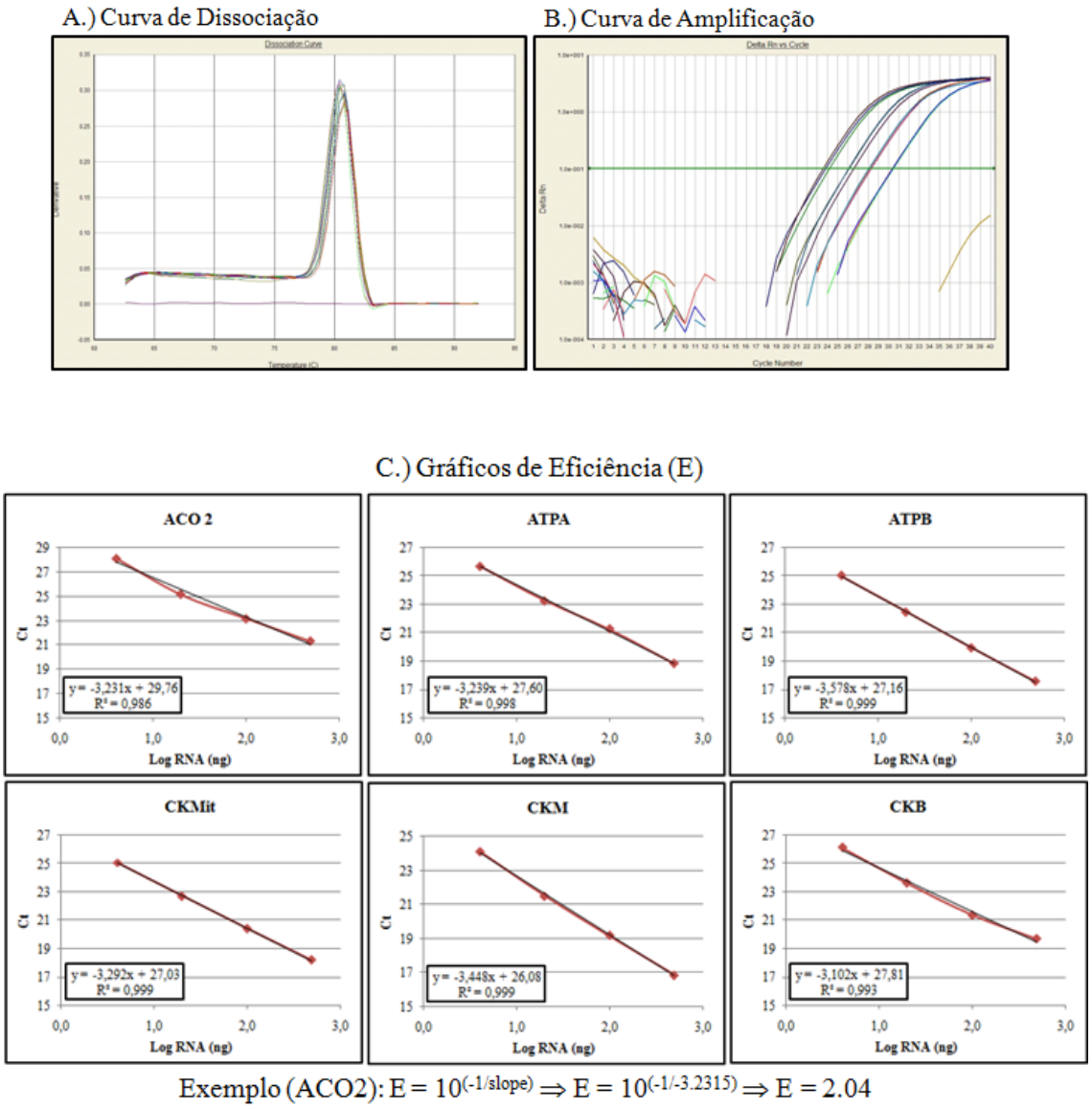


Figura 32. A.) Curva de dissociação, para confirmar especificidade do produto amplificado. B.) Curva de amplificação, para cálculo da eficiência. C.) Gráfico de eficiência, os gráfico contêm as equações de reta, cujos coeficientes angulares foram utilizados para cálculo da eficiência. Ct, "cycle threshold".

Conforme descrito em Materiais e Métodos, foi determinado o Ct de cada amostra para os genes alvos, sendo o valor de Ct preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como gene de referência o GAPDH. A fórmula utilizada para a

quantificação relativa (QR) foi QR = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔCt = Ct gene alvo – Ct gene referência, e ΔΔCt = ΔCt amostra - ΔCt controle. Para a determinação do ΔΔCt, o ΔCt amostra foi obtido nas amostras provenientes de pacientes com CCC, CDI ou CI, e o ΔCt controle seria a média do ΔCt obtido a partir de cinco amostras de miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatia.

Em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatias, diminuição na expressão foi considerada quando a quantificação relativa foi menor que 0,5. A relação entre os grupos de pacientes foi analisada pelo programa "Prism4", utilizando o teste "One Way Anova" e "Newman-Keuls", e foram consideradas diferenças estatisticamente significantes aquelas que apresentaram $p<0,05$. A figura 33 mostra os valores da quantificação relativa da expressão de RNAm de enzimas do metabolismo energético nas amostras.

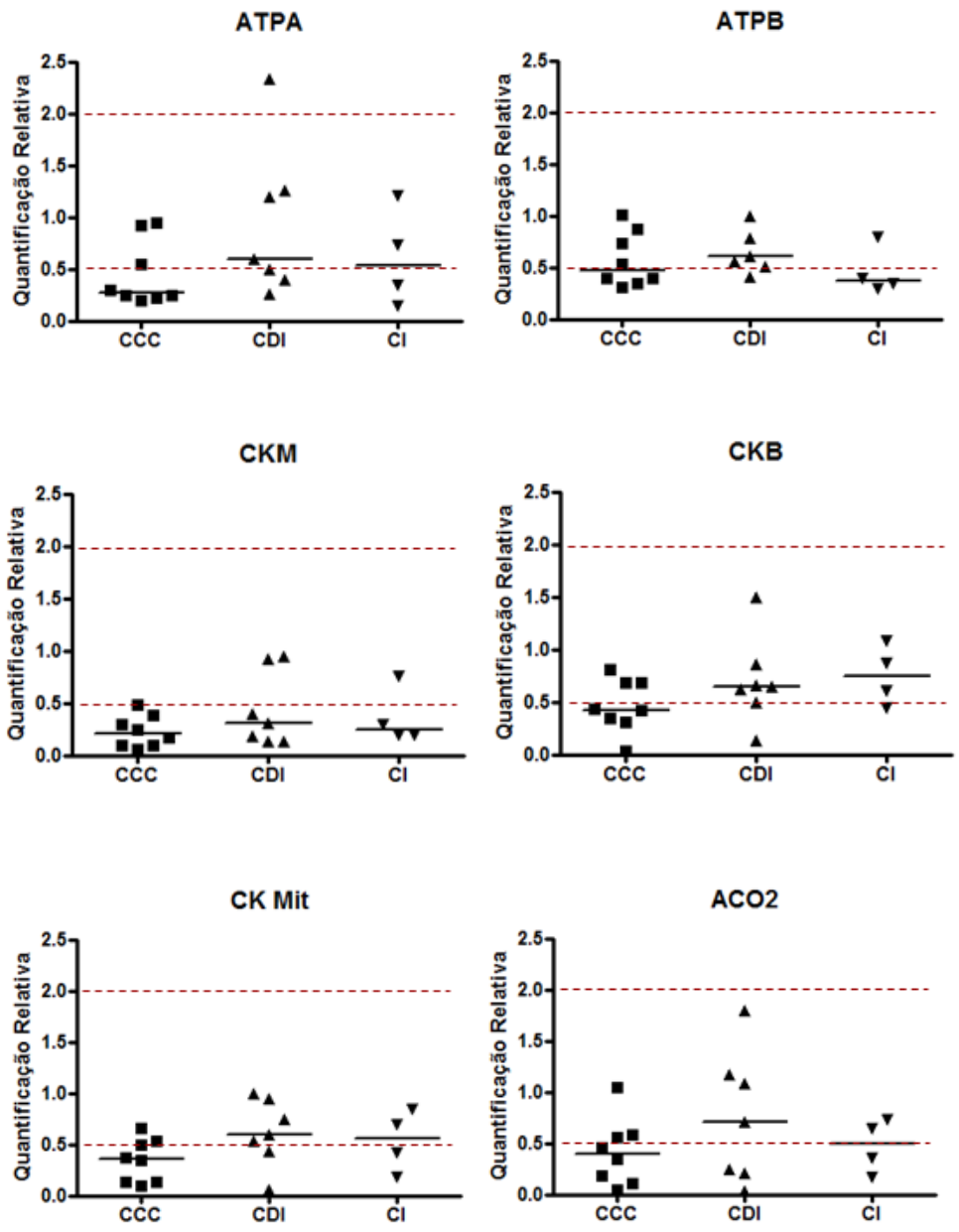


Figura 33. Quantificação relativa da expressão de RNAm de enzimas do metabolismo energético. A linha pontilhada (em vermelho) mostra o valor de corte considerado como expressão reduzida (<0,5) ou aumentada (>2) em relação aos controles. As linhas horizontais representam a mediana entre as amostras de cada grupo.

Nenhuma das enzimas analisadas apresentou diferença significativa (ou seja, com $p<0,05$) de expressão entre as amostras de pacientes com CCC, CDI ou CI. No

entanto, como pode ser observado na figura 33, as amostras de miocárdio de pacientes com CCC apresentaram diminuição na expressão de RNAm das enzimas analisadas comparando-se com amostras de indivíduos sem cardiomiopatia. A expressão do RNAm da enzima creatina quinase M também apresentou redução nas amostras de pacientes com CDI e com CI em comparação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia. Entretanto, as enzimas ATP sintase alfa e ATP sintase beta não apresentaram níveis aumentados de RNAm em amostras de pacientes com CI em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatia, como visto na análise da expressão protéica.

4.4.4. Análise da atividade enzimática da Creatina Quinase no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI e indivíduos sem cardiomiopatia

Com o objetivo de validar os resultados encontrados pela análise da expressão protéica diferencial realizada por eletroforese bidimensional e "Western-blotting", os quais mostraram que a enzima creatina quinase M/B apresentou expressão protéica reduzida em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia, medimos a atividade enzimática da creatina quinase total nestas amostras. Os valores da atividade enzimática foram normalizados pela quantidade de proteínas de cada amostra. A figura 34 mostra a distribuição dos valores em cada grupo de amostras e a tabela 8 mostra resultados da análise estatística.

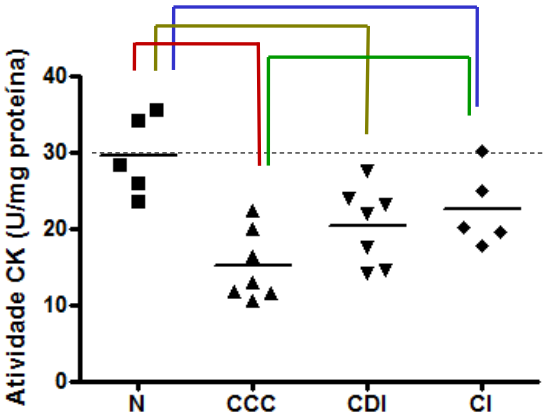


Figura 34. Análise da atividade enzimática da creatina quinase total.Os valores foram normalizados pela quantidade de proteína de cada amostra.

Tabela 11. Análise estatística da medida da atividade enzimática da creatina quinase

Atividade CK	
One Way Anova	**$p < 0,001$**
Newman-Keuls	
N x CCC	**$p < 0,001$**
N x CDI	**$p < 0,05$**
N x CI	**$p < 0,05$**
CCC x CDI	$p > 0,05$
CCC x CI	**$p < 0,05$**
CDI x CI	$p > 0,05$

Conforme podemos observar na figura 34 e tabela acima, a atividade da enzima creatina quinase apresentou redução nas amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com as amostras de indivíduos sem cardiomiopatias. É importante notar que, novamente, a redução encontrada no grupo de pacientes com CCC foi maior do que a encontrada nos outros grupos de pacientes.

5. Discussão

5.1. Caracterização das amostras de miocárdio

Os pacientes, cujas amostras da parede lateral do ventrículo esquerdo foram utilizadas neste estudo, eram todos pacientes com cardiomiopatias em classe III, apresentando fração de ejeção bastante reduzida e aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

O coração dos pacientes com CCC apresentaram fibrose e presença de trombos, sendo que já foi extensamente relatado na literatura que a lesão anatômica macroscópica mais característica é o aneurisma apical, o qual foi documentado em 52% de 1078 pacientes estudados (14); e que a trombose foi identificada em 44% dos 1345 casos estudados (15). A principal característica histopatológica da CCC é a presença da miocardite crônica responsável pela destruição progressiva das fibras miocárdicas. Em função da intensa miocardite, observa-se substituição por fibrose reparativa. A fibrose destaca-se como componente fundamental do processo de desorganização funcional e estrutural cardíaca, que culmina na falência do órgão. (8, 16, 17). Pacientes com CDI e CI, também apresentaram no estudo histopatológico áreas de intensa fibrose e hipertrofia de cardiomiócitos.

A análise da ultraestrutura do cardiomiócito por microscopia eletrônica mostrou a presença de fibras de colágeno na matriz extracelular em amostas de pacientes com CCC, CDI e CI, resultante do processo de fibrose e remodelamento

cardíaco. Também observamos que as mitocôndrias dos cardiomiócitos apresentavam irregularidades de forma e de tamanho em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI. Em amostras de pacientes com CCC, as mitocôndria apresentaram edema lamelar. Em conjunto, estas alterações sugerem possíveis irregularidades no funcionamento mitocondrial o qual está envolvido no processo de geração de ATP, apoptose e estresse oxidativo.

5.2. Identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica

A análise do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC nos ajuda a ter uma visão geral de componentes que estão sendo expressos, podendo ajudar na elucidação do mecanismo de desenvolvimento da doença e de alterações estruturais / moleculares do miocárdio em resposta à inflamação crônica.

Através da análise proteômica, com separação das proteínas por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas, traçamos o perfil de expressão protéica de amostras de miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (75). Apesar de encontrarmos grande quantidade de proteínas estruturais e contráteis, e de proteínas envolvidas no metabolismo celular, encontramos também proteínas que participam da resposta ao estresse celular, inclusive ao estresse oxidativo, moléculas efetoras da apoptose e proteínas envolvidas na resposta imune.

Proteínas estruturais, tais como os constituintes de sarcômeros, bem como proteínas do citoesqueleto foram as mais frequentemente identificadas. Entre as proteínas estruturais, a cadeia leve de miosina atrial (MYL4) foi identificada em amostras de ventrículo de pacientes com CCC. A expressão ventricular de proteínas atriais foi observada na hipertrofia cardíaca e está relacionada à reversão do miócito para a transcrição de genes embrionários (76). A vimentina, expressa principalmente por fibroblastos, também foi identificada, achado compatível com o intenso processo

fibrótico que ocorre no tecido cardíaco de pacientes com CCC (16). Identificamos também a metaloproteinase de matriz 13 (MMP13), ou colagenase-3, que é expressa por diferentes tipos celulares. A MMP13 degrada colágeno I, II, III, fibronectina, laminina, e tenascina (77). Outras metaloproteinases (MMP) foram descritas no processo de remodelamento cardíaco, como a MMP9 (78). A MMP13, identificada nestes experimentos, também poderia desempenhar algum papel no remodelamento cardíaco que ocorre no miocárdio de pacientes com CCC.

Entre as proteínas distintas identificadas, 38% pertencem a diferentes vias do metabolismo celular. As proteínas mais identificadas neste grupo funcional foram proteínas envolvidas no metabolismo energético, as quais participam na geração de ATP (como glicólise, beta-oxidação, ciclo de Krebs, fosforilação oxidativa e sistema da creatina quinase), compatível com o fato de que o coração demanda alta quantidade de energia para a função cardíaca normal (51, 79).

No miocárdio de pacientes com CCC, um número significante de proteínas de choque térmico ("heat shock proteins" - HSP) foi identificado (cerca de 40 "spots", 13 proteínas HSP distintas). A síntese destas proteínas auxilia na manutenção da homeostase celular após a exposição ao calor ou a uma situação de estresse (80, 81). O grande número de HSPs identificado sugere um papel protetor destas proteínas no miocárdio.

Vários "spots" foram identificados como proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como a peroxirredoxina, a superóxido dismutase Cu/Zn e a superóxido dismutase Mn. Estudos em modelos animais sugerem que o aumento crônico do estresse oxidativo no miocárdio é devido a um desequilíbrio da superóxido dismutase

e outros sistemas antioxidantes, contribuindo para o remodelamento cardíaco e insuficiência cardíaca (82). Após 180 dias de infecção por *T. cruzi*, camundongos apresentaram danos oxidativos no miocárdio, acompanhados pela diminuição de defesas antioxidantes (83).

Proteínas envolvidas no sistema imune, como receptor de célula T e imunoglobulinas, foram também detectadas, o que é compatível com o infiltrado inflamatório presente no miocárdio de pacientes com CCC. No entanto, não podemos descartar a possibilidade da detecção destas proteínas ser devida a contaminação sanguínea. Também identificamos a granzima A, a qual inicia uma via alternativa de apoptose (84) e é um dos componentes de grânulos de células T CD8+.

Em nossos experimentos, encontramos as caspases 2 e 8. A caspase 8 está envolvida na morte celular induzida por TNF e CD95 (85). Identificamos também a forma clivada da caspase 8, indicando sua ativação.

É importante considerarmos que muitas das proteínas identificadas podem não ser necessariamente de cardiomiócitos, mas podem pertencer a vasos sanguíneos (ex: actina de músculo liso), fibroblastos ou células do infiltrado inflamatório, sem contar com o sangue dos pequenos vasos.

Muitas das proteínas identificadas estavam representadas não como “spots” únicos, mas como vários “spots” (de diferentes pontos isoelétricos e/ou pesos moleculares) representando diversas isoformas de uma mesma proteína. Estas isoformas podem ser devido a modificações pós-traducionais, como fosforilações, oxidações, glicosilações, etc; ou artefatos da própria técnica.

Analisamos a distribuição das proteínas de acordo com sua função, verificando o quanto uma dada proteína representa no todo. Verificamos que apesar das proteínas estruturais representarem 19% da diversidade de proteínas presentes no coração, elas representam 62% do volume total de proteínas do miocárdio. Enquanto que as proteínas envolvidas no metabolismo celular correspondem a 38% da diversidade, mas apenas 14% do volume de proteínas totais.

Esta descrição também é importante para se determinar a abundância das principais proteínas individuais que constituem o miocárdio. Um exemplo importante é a proteína envolvida na resposta ao estresse, a alfa-B-cristalina, sendo a proteína mais abundantemente representada dentro deste grupo (porcentagem de volume). Experimentos recentes de análise proteômica no miocárdio de hamsters infectados com *T. cruzi* mostraram aumento na expressão protéica da alfa-B-cristalina na fase aguda da infecção (86). Esta é um membro da família das proteínas de choque térmico, atua como chaperona, protege contra o estresse oxidativo, regula a dinâmica de filamentos de actina e protege filamentos intermediários da desmina contra o estresse extracelular (87). A alta expressão da alfa-B-cristalina no miocárdio de pacientes com CCC sugere um papel importante desta proteína na patogenia da CCC.

5.2. Análise da expressão protéica diferencial no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia

A análise proteômica diferencial tem sido bastante aplicada no estudo de doenças cardiovasculares (67-70). Neste estudo, avaliamos a diferença de expressão protéica no miocárdio (ventrículo esquerdo) de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia.

Verificamos que amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI apresentaram maior número de proteínas diferencialmente expressas em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatia, enquanto que as amostras de pacientes com CI apresentaram número bem menor de proteínas diferencialmente expressas em comparação com o grupo de indivíduos sem cardiomiopatias. Quando comparamos o número de proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de cardiopatas podemos verificar que pacientes com CCC e CDI não apresentam muitas diferenças, enquanto que quando comparamos pacinetes com CCC e CI estas diferenças aumentam.

A análise de padrões realizada a partir das proteínas diferencialmente expressas separou as várias amostras em grupos de similaridade de expressão. Nesta análise amostras de pacientes com CI foram agrupadas juntas, e demostraram bastantes semelhanças com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias; e amostras de pacientes com CCC e CDI foram agrupadas em um grupo distinto. Este tipo de análise pode apresentar um importante valor na clínica auxiliando no diagnóstico e no estabelecimento de biomarcadores em doenças cardiovasculares.

Sendo assim, através do padrão de expressão protéica similar apresentado pelos pacientes com CCC e CDI, podemos dizer que nestas cardiomiopatias os processos patológicos são semelhantes. No entanto, em uma análise bastante superficial, verificamos que em geral as proteínas diferencialmente expressas que são compartilhadas entre estes dois grupos, o grupo de pacientes com CCC é o que apresenta maior comprometimento.

Também verificamos, que em comparação com indivíduos sem cardiomiopatias, os três grupos de pacientes com CCC (masculinos, femininos e masculinos jovens) apresentam números aproximados de "spots" diferenciais, sugerindo que diferenças observadas em relação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatias são realmente devido a processos relacionados à progressão da doença e não devido a variações pertinentes ao sexo ou idade dos pacientes. Apesar destas amostras não apresentarem muitas proteínas diferencialmente expressas entre si, seria interessante clinicamente analisá-las, visando um melhor entendimento da CCC. No entanto neste trabalho focaremos principalmente nas comparações entre CCC, CDI e CI.

A análise proteômica diferencial mostrou diversas proteínas diferencialmente expressas entre as amostras de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC, CDI e IC, e de indivíduos sem cardiomiopatias, sendo estas pertencentes a diversas classes funcionais. As principais classes funcionais que apresentaram diferenças na expressão protéica foram a classe das proteínas estruturais e contateis; enzimas envolvidas no metabolismo energético, proteínas da apoptose e da esposta ao estresse. Vale ressaltar que a análise proteômica utilizando a eletroforese

bidimensional seguida por identificação das proteínas por espectrometria de massa não permite a detecção de proteínas pouco abundantes, sendo assim é esperável que encontremos um número maior de proteínas mitocondriais e estruturais. A seguir discutiremos em mais detalhes estas proteínas.

5.2.1. Proteínas estruturais e contráteis

Proteínas estruturais e contráteis, como mostrado no perfil proteômico, são as que representam a maior massa do coração. Diversas alterações nestas proteínas já foram descritas na insuficiência cardíaca, e muitas destas alterações refletem o processo de remodelamento e hipertrofia cardíaca (88, 89). Estas alterações podem envolver diversos processos como mudanças de isoformas de proteínas sarcoméricas, alterações em proteínas do citoesqueleto e fibrose, e peptídeos natriuréticos (49).

A redução de proteínas contráteis como a cadeia pesada da miosina-7 (MYH7_HUMAN) e cadeia alfa da actina cardíaca (ACTC) foi observada em amostras dos pacientes com CCC, CDI e CI, enquanto que a cadeia leve da miosina (MYL3_HUMAN) e troponina T (TNNT2) apresentaram redução nas amostras de pacientes CCC e CDI, sendo que apenas os pacientes com CCC apresentaram redução das proteínas tropomiosina 1 (TPM1). Todas estas proteínas já foram descritas como alteradas na insuficiência cardíaca (88, 89). Sendo que os pacientes com CCC são os que apresentam maior número de alterações em proteínas contráteis.

Neste estudo, encontramos aumento significativo das proteínas gelsolina (GELS), lumican (LUM) e desmina (DESM) no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com o miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. Gelsolina é uma proteína responsável pelo rearranjo do citoesqueleto, controla em especial a remodelamento de filamentos de actina. Além disso, apresenta funções na motilidade celular, controle da apoptose e regulação da fagocitose (90, 91). Estudos utilizando coração de pacientes com CI e CDI mostraram aumento de expressão da gelsolina (92). A proteína lumican pertence à família de proteoglicanos e tem um papel importante na organização de fibras de colágeno no processo de fibrose. Foi observado aumento desta proteína em corações que sofreram isquemia e reperfusão (93). E a proteína desmina é uma proteína do citoesqueleto essencial para manter a integridade funcional miofibrilar e a manutenção da integridade geral da célula (94). Já foi demostrado que esta proteína aumenta durante o desenvolvimento da hipertrofia e também foi observado um progressivo aumento durante a transição da hipertrofia a insuficiência em corações de cobaios (95). Assim o aumento destas proteínas no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, poderia estar envolvido no processo de remodelamento cardíaco.

Proteínas dos microtúbulos, tubulina-alfa e beta (TBA1C e TBB5) também apresentaram aumento de expressão em coração de pacientes com CCC e com CDI, mas não em CI. Estas proteínas têm a função de estabilizar microtúbulos e permitir a interação com organelas. Já foi relatado que o acúmulo de tubulina contribui para a miofibrilogenesis e possivelmente está envolvido na síntese protéica como um fenômeno transitório no desenvolvimento da hipertrofia por aumento de pressão em

ratos (96). Estudos observando a expressão de tubulinas e desmina mostraram correlação positiva com a piora das propriedades funcionais diastólicas do ventrículo esquerdo em pacientes com insuficiência cardíaca em estágio terminal (97).

A alteração de expressão de várias proteínas estruturais, incluindo proteínas contráteis, do citoesqueleto e da matriz extracelular, nos pacientes com CCC, CDI e CI evidenciam o processo de remodelamento ventricular característico da insificiência cardíaca.

5.2.2. Resposta ao estresse e apostose

O aumento do estresse oxidativo está intimamente envolvido na patogênese da insuficiência cardíaca.

A proteína isocitrato desidrogenase [NADP] (IDHP) encontra-se com expressão reduzida em amostras de pacientes com CCC e CDI. A produção de NADPH requerida para a regeneração de glutationa na mitocôndria é crítica para a atividade antioxidante da glutationa redutase e sistema da peroxidase. Sendo assim, estudos mostram que a diminuição nos níveis da enzima IDHP está relacionada ao aumento das espécies reativas de oxigênio, fragmentação do DNA, lipoperoxidação, e danos mitocondriais com significante redução nos níveis de ATP. Também foi demontrado que o aumento de sua expressão tem papel na proteção celular contra danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (98). A redução desta enzima no miocárdio dos pacientes poderia sugerir uma possível diminuição de NADPH,

necessário para a regeneração da glutationa, levando a danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo.

A enzima antioxidante catalase (CATA) foi encontrada com aumento de expressão apenas em pacientes com CCC. Um estudo realizado com amostras de pacientes com CI e CDI mostrou níveis protéicos das enzimas superóxido dismutase manganês e superóxido dismutase cobre-zinco estão inalterados, enquanto que o nível protéico da enzima catalase encontrava-se aumentado em comparação com amostras de doadores sem insuficiência cardíaca (99). Em nosso estudo verificamos o aumento da catalase apenas em amostras de pacientes com CCC, que poderia ser resultado de um mecanismo compensatório pelo aumento no estresse oxidativo.

A proteína dissulfito isomerase (PDI) é um membro da família de proteínas as quais são ativadas pelo estresse, interferindo no enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático (100). A falha no enovelamento de proteínas leva a morte celular via apoptose, e a uma variedade de doenças relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático (101). A proteína dissulfito isomerase A3 (PDIA3) e a proteína dissulfito isomerase (PDIA1) apresentaram expressão aumentada em amostras de pacientes com CCC e CDI. Estudos mostram que o aumento da PDI ocorreu após a isquemia cardíaca em modelos “in vitro” e “in vivo”, tendo como conseqüência a diminuição da taxa de apoptose e remodelamento ventricular (102). O aumento das proteínas PDIA1 e PDIA3, nos corações de pacientes com CCC e CDI, poderia estar relacionado ao estresse do retículo endoplasmático e a uma tentativa de reparar danos celulares.

As proteínas de choque térmico (HSP – *heat shock proteins*) também podem desempenhar um papel protetor contra danos celulares (103). Estas proteínas são expressas em condições fisiológicas, no entanto, sua expressão pode aumentar em decorreência de diversos estímulos, como aquecimento, vírus, hormônios, entre outros. As HSPs atuam no enovelamento correto das proteínas, sendo assim também chamadas de chaperonas (104). Também possuem relevância do ponto de cardíaco, uma vez que as HSPs podem ser induzidas por estímulos como a anoxia, isquemia, e geradores de radicais livres como o peróxido de hidrogênio (105). Neste estudo, encontramos expressão aumentada de diversas proteínas no miocárdio de cardiopatas. A proteína de estresse HSP70 (GRP75) apresentou níveis aumentados em pacientes com CCC, CDI e CI. E outras cinco proteínas classificadas como HSPs também apresentaram expressão aumentada em pacientes com CCC e CDI. Este aumento pode ser resultado de diversos estímulos como a isquemia e o estresse oxidativo presentes no miocárdio destes pacientes. Currie (106) demonstrou que corações de ratos isolados expostos à isquemia em um aparelho de perfusão – Langendorff – apresentaram indução da HSP 70.

As HSPs também podem estrar correlacionadas com processos de degradação de proteínas, uma vez que estudos mostraram que a inibição da síntese de HSP 70 aumenta a morte celular induzida pela inibição do proteassoma, o qual media a degradação de proteínas ubiquitinadas (107).

O sistema ubiquitina-proteassoma degrada proteínas citosólicas, nucleares e miofibrilares. Recentemente, a ativação ou comprometimento deste sistema tem sido descrito em doenças cardíacas (108). O processo de ubiquitinação envolve a ação das

enzimas E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzimas conjugadoras de ubiquitina) e E3 (ubiquitina-proteína-ligase). A enzima E3 parece ter um papel chave na seleção da proteína a ser degradada (109). Pacientes com CCC e CDI apresentaram no miocárido expressão aumentada das proteínas MIB2 (*E3 ubiquitin-protein ligase MIB2* – MIB2) e RNF25 (*E3 ubiquitin-protein ligase* RNF25 – RNF25). As proteínas ubiquitinadas são degradadas proteoliticamente em um processo dependente de ATP mediado por um complexo multiprotéico chamado proteassoma. Pacientes com CCC apresentaram expressão aumentada da proteína PSM1 (*Proteasome activator complex subunit 1* – PSME1) (110, 111). Esta proteína é a subunidade alfa do complexo proteassoma PA28, o qual altera as propriedades de clivagem do proteassoma e aumenta a apresentação de antígenos via MHC de classe I. A estimulação de células com IFN-gama aumenta a expressão da proteína PSM1. O aumento desta proteína no miocárdio de pacientes com CCC pode ser resultado da presença de citocinas inflamatórias, e também responsável pelo aumento de moléculas HLA de classe I observado em histiócitos e células endoteliais do tecido cardíaco de pacientes com CCC (24-26).

No miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, encontramos expressão aumentada da proteína catepsina D (CATD) aumentada em CCC, CDI e CI, uma proteína lisossomal que aumenta no processo de autofagia (112). A autofagia é um tipo de morte celular progamada que ocorre no desenvolvimento de órgãos e tecidos para eliminação de células não necessárias, mas também está envolvida em condições de estresse como a inanição. Estudos mostraram que em condições de inanição, ocorre um aumento de proteínas relacionadas com o processo de autofagia

como a catepsina D no coração, e que este processo seria necessário para o fornecimento de aminoácidos e lipídeos a partir de proteínas e membranas degradadas via autofagia, mantendo o ciclo do ácido cítrico funcionante e conteúdo de ATP no miocárdio e (113, 114). Também já foi demonstrado um aumento anormal de vacúolos autofágicos na insuficiência cardíaca (115). Sendo assim, o aumento da catepsina D que observamos no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, poderia ser decorrente de estímulos como o estresse oxidativo e hipóxia, podendo também ser um mecanismo compensatório para suprir o provável défice de ATP.

O processo da morte celular programada, apoptose, está envolvido em diversas doenças, inclusive em doenças cardiovasculares. Em nosso estudo, também encontramos proteínas que fazem parte deste processo com expressão alterada. É o caso da proteína AKT2 (*Rac-beta serine/threonine-protein kinase* – AKT2), a qual tem um papel de inibir a apoptose, através da inibição da ativação de JNK e p38 (116). Esta proteína foi encontrada em nosso estudo com expressão reduzida em pacientes com cardiomiopatias, sendo os pacientes com CCC os que apresentaram menor diminuição. Foi demonstrado que camundongos deficientes em AKT2 apresentam aumento de apoptose de cardiomiócitos após infarto do miocárdio e são mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Além do papel de reguladora da sobrevivência do cardiomiócito, a AKT2 também apresenta um papel na regulação do metabolismo cardíaco. Um estudo em cardiomiócitos mostrou que AKT2, mas não AKT1, é necessária para a captação de glicose estimulada por insulina, através da translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície celular 4 (117). A diminuição da expressão da AKT2 observada em nosso estudo poderia

estimular a morte celualr de cardiomiócitos, e até contribuir para o comprometimento do metabolismo energético cardíaco.

A proteína TRAF3 (*TNF receptor –associated factor 3* – TRAF3), encontrada com expressão aumentada em pacientes com CCC, CDI e CI, sendo que pacientes com CCC são os que apresentam maior aumento, reforça a participação do processo de apoptose na insuficiência cardíaca. O TRAF3 está envolvido na ativação de NFk B e JNK e também no processo de apoptose, através da ligação com o domínio citoplasmático do CD40 (118, 119). Também foi detectado um aumento da proteína TR10B (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B* – TR10B) apenas em amostras de pacientes do grupo CCC. A proteína TR10B é um receptor para o ligante TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), que ativa a caspase 8, indutora de apoptose, e também tem papel na ativação do NFkB (120, 121).

5.2.3. Resposta imune

Mecanismos envolvendo a resposta imune já foram relatados como tendo um papel importante em doenças cardíacas crônicas.

A imunoglobulina IgG1 (*Ig gamma-1 chain C region* – IGHG1) e a proteína do complemento C3 (CO3) encontram-se com expressão aumentada no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com o miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. Em estudo com biópsias de endomiocárdio de 21 pacientes com cardiomiopatias crônicas apresentaram deposição de imunoglobulinas e também do

fator do complemento C3 em miofibras (122). Também foi observado por imunofluorescêcia em biópsias de miocárdio de pacientes com CCC depósitos de IgG, IgA, IgN e C3 na área intersticial, em capilares, no endomiocardio e nas miofibras (123). A presença destas proteínas em estruturas do miocárdio sugere uma reação imune e não apenas um depósito passivo secundário aos danos ao miocárdio (123). Em nosso estudo, o fator do complemento C3 e a imunoglobulina IgG1, não apenas estão aumentados nas cardiomiopatias como apresentam um maior aumento em amostras de pacientes com CCC, reforçando os achados da miocardite presente no coração destes pacientes.

Em nosso estudo também encontramos expressão aumentada da proteína galectina-3 (LEG3). As galectinas são uma família de lectinas que se ligam a beta-galacteosídeo que desempenham um importante papel na inflamação, imunidade e câncer. A galectina-3 também já foi descrita tendo um papel na patologia da insuficiência cardíaca e no remodelamento cardíaco. Esta possui expressão aumentada na hipertrofia cardíaca, e possui efeito estimulatório na migração de macrófagos, proliferação de fibroblastos e desenvolvimento de fibrose. A sua alta expressão no miocárdio pode ser relevante como fator prognóstico na insuficiência cardíaca (124). Nível aumentado de galectina-3 também foi encontrado em coração de camundongos transgênicos com expressão aumentada de IFN-gama (125). Sendo assim, o aumento desta proteína em coração de pacientes com CCC pode ser devido à presença de citocinas inflamatórias, em especial o IFN-gama, e também pode estar relacionada ao pior prognóstico observado em pacientes com CCC em comparação com outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória.

5.2.4. Metabolismo energético

A mitocôndria é uma organela intracelular existente na maioria das células eucarióticas, desempenhando um importante papel na produção de ATP celular. A mitocôndria está envolvida na homeostasia celular, tendo um importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteróides e nucleótidos. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético, incluindo, beta-oxidação dos ácidos gráxos, ciclo da ureia e na via final comum de produção de ATP – cadeia respiratória (126).

5.2.4.1. Glicólise

A glicólise converte a glicose em duas unidades de piruvato. No primeiro estágio do processo, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, em uma série de reações que consomem 2 ATPs. No segundo estágio da glicólise, as duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são convertidas em duas moléculas de piruvato, gerando 4 ATPs e 2 NADHs (126).

Na análise proteômica diferencial, encontramos diversas enzimas que participam da glicólise com expressão alterada no miocárdio de pacientes com cardiomiopatias em comparação com miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. As enzimas fosfoglicose isomerase (G6PI), fosfoglicerato mutase 1 (PGAM1) e piruvato quinase isoenzimas M1/M2 (KPYM) apresentaram expressão aumentada

em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI. As enzimas enolase alfa (ENOA) e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase – GAPDH (G3P) apresentaram expressão aumentada apenas em amostras de pacientes com CCC.

É importante ressaltar, que estudos mostraram que a enzima piruvato quinase também pode translocar para o núcleo em resposta a diferentes estímulos apoptóticos. A translocação é suficiente para indução de apoptose independente de caspases, sendo este papel independente da sua atividade catalítica (127). Sendo assim, além de sua importância para o metabolismo energético, o aumento desta proteína pode também ser associado à apoptose de cardiomiócitos, contribuindo para o remodelamento cardíaco.

A enzima enolase alfa, além de participar da glicólise, também participa de vários processos como controle do crescimento celular e tolerância a hipóxia. Estudos também mostram que a enolase pode estimular a produção de imunoglobulinas (128). Como veremos mais adiante, a expressão de imunoglobulinas também está aumentada em pacientes com CCC.

No entanto apenas pacientes com CCC e com CDI, mas não pacientes com CI, apresentaram no miocárdio expressão reduzida das enzimas fosfofrutoquinase 1 (K6PF), enolase beta (ENOB), fosfoglicerato mutase 2 (PGAM2), aldolase A (ALDOA) e aldolase C (ALDOC). A deficiência das enzimas fosfofrutoquinase 1 e enolase beta leva a fraqueza muscular e incapacidade de fazer exercícios físicos (129, 130)

Apenas três reações, as catalisadas pela hexoquinase, pela fosfofrutoquinase e pela piruvato quinase, funcionam com grandes variações negativas de energia livre no músculo cardíaco em condições fisiológicas. Essas reações de não equilíbrio da glicólise são candidatas a pontos de controle (126). Dentre estas a piruvato quinase encontra-se com expressão aumentada e a fosfofrutoquinase com expressão reduzida. Nos músculos a principal enzima controladora do fluxo da glicólise é a fosfofrutoquinase e pode ser inibida por ATP e altas concentrações de citrato (126). Estudos mostram que a glicólise está aumentada na hipertrofia cardíaca causada por aumento de pressão, no entanto, os mecanismos são desconhecidos. Acredita-se que o aumento da glicólise se deve pela ativação da fosfofrutoquinase ou pelo aumento da captação de glicose (131). Em nosso estudo a fosfofrutoquinase encontra-se diminuída, sendo assim não podemos dizer que a glicólise está aumentada ou se a diminuição da enzima faz parte de uma resposta compensatória.

5.2.4.2. Beta-oxidação

A oxidação dos ácidos graxos inicia-se com o grupo acila pela formação de um tioéster com a coenzima A. O grupo acila é transferido à carnitina para transporte à mitocôndria onde é reesterificado à Coezima A. A beta-oxidação ocorre em quatro reações: (1) formação de uma ligação dupla alfa, beta; (2) hidratação da ligação dupla; (3) desidrogenação para formar uma beta-cetoacil-CoA e (4) tiólise pela Coenzima A para produzir acetil-CoA e uma acil-CoA encurtada em dois carbonos. Este processo é repetido até que os ácidos graxos sejam convertidos em acetil-CoA.

A acetil-CoA é oxidada pelo ciclo do ácido cítrico e pela fosforilação oxidativa para geração de ATP (126).

Em nosso estudo, encontramos diversas proteínas que participam do processo de beta oxidação com expressão alterada em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias. A enzima enoil-CoA-hidratase **(**ECHM), a qual participa da segunda reação da beta oxidação apresenta expressão aumentada em amostas de pacientes com CI e CDI, mas não em pacientes com CCC. No entanto, pacientes com CCC apresentam redução das enzimas acil-CoA de cadeia média (ACADM) e acil-CoA de cadeia longa (ACADV), as quais participam do processo da primeira reação do processo de beta-oxidação; da enzima hidroxiacil-CoA-desidrogenase (HCDH), a qual cataliza a terceira reação do processo; e da enzima beta-cetoacil-CoA-tiolase (THIM), a qual cataliza a quarta reação do processo de beta-oxidação. A enzima ACADM também foi encontrada com expressão reduzida em amostras de pacientes com CDI. A diminuição das enzimas ACADM e ACADV pode demonstrar uma incapacidade de metabolização de ácidos graxos de cadeia média e longa no coração dos pacientes com CCC. Pacientes com deficiência da enzima ACADV podem apresentar hipertrofia e cardiomiopatia dilatada (132)

A enzima 2,4-dienoil-CoA redutase (DECR) também apresentou expressão reduzida em amostras de pacientes com CCC e CDI; e a enzima 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (D3D2) apresentou expressão reduzida em amostras de pacientes com CCC e CI. Estas proteínas participam da oxidação de ácidos insaturados.

De uma maneira geral, pacientes com CCC apresentam maior comprometimento no metabolismo de ácidos graxos. Estudos mostram que a ativação do fator nuclear NFkB durante a hipertrofia cardíaca diminui a atividade da proteína PPAR (“peroxisome proliferator-activated receptor) beta/gama, levando a uma diminuição da oxidação de ácidos graxos (133).

5.2.4.3. Ciclo de Krebs

O ciclo do ácido cítrico é uma rota central para a recuperação de energia a partir de vários combustíveis metabólicos, incluindo os carboidratos, os ácidos graxos e os aminoácidos, que são convertidos em acetil-CoA para a oxidação. Também o ciclo do ácido cítrico fornece os reagentes para uma variedade de rotas biossintéticas (126).

Primeiramente a acetil-CoA é formada a partir da descarboxilação oxidativa do piruvato por um complexo enzimático denominado piruvato desidrogenase. Uma das enzimas participantes deste complexo é a diidrolipoil-desidrogenase (DLDH), a qual se encontra com expressão aumentada em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI.

Dentre as enzimas que participam do ciclo do ácido cítrico, a aconitase (ACON) encontra-se com expressão aumentada apenas em amostras de pacientes com CI, sendo que a enzima isocitrato desidrogenase [NAD] (IDH3A) encontra-se com expressão aumentada em amostras de pacientes com CCC e CDI. No entanto, a enzima fumarase (FUMH) apresenta expressão reduzida nas amostras de pacientes

CCC e CDI, e a enzima malato-desidrogenase (MDHM) apresenta expressão reduzida apenas nas amostras de pacientes CCC. Estudos mostram que a enzima MDHM encontra-se com expressão reduzida no miocárdio de coelhos que sofreram isquemia e reperfusão (134). A enzima MDHM é uma das produtoras de NADH, molécula necessária para manter o fluxo de elétrons na cadeia respiratória e para a síntese de ATP, sendo assim sua redução, observada em amostras de pacientes CCC poderia prejudicar a síntese de ATP. Estudos mostram que várias enzimas do ciclo de Krebs podem ser ativadas por cálcio, o qual aumenta durante a contração. Com a ativação das desidrogenases do ciclo de Krebs pelo cálcio, aumentaria a concentração de NADH estimulando a produção de ATP (135). Estudos do nosso grupo mostrou que do gene SERCA Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, envolvido no metabolismo cardíaco de cálcio encontrava-se com expressão reduzida em miocárdio com CCC (37). Níveis da proteína codificada por este gene também foram encontrados diminuídos no miocárdio de pacientes com CCC em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias (dados não mostrados).

5.2.4.4 . Fosforilação oxidativa

O processo de fosforilação oxidativa mitocondrial é essencial na produção de energia para o funcionamento cardíaco. Este sistema é composto essencialmente da cadeia de transporte de elétrons (complexos I ao IV) e o complexo da ATP sintase F1F0 (complexo V) (126). Os componentes da cadeia respiratória localizam-se na

membrana interna da mitocôndria. Em nosso estudo encontramos diversos componentes deste sistema com expressão alterada nas cardiomiopatias.

O complexo I (NADH-Coenzima Q Oxidorredutase) é composto por 45 diferentes subunidades que atuam na transferência de elétrons da molécula NADH para a cadeia respiratória. O complexo catalisa a oxidação de NADH pela coenzima Q (ubiquinona) (126). A subunidade de 30 kDa da NADH-ubiquinona oxidorredutase (NDUS3) apresentou expressão ligeiramente aumentada em amostras de pacientes com CCC e CI. No entanto, a subunidade de 24 kDa (NDUV2) apresentou expressão reduzida em amostras de pacientes com CCC, CI e CDI. Nas amostras de pacientes com CCC e CDI também encontramos expressão reduzida das subunidades de 42 kDa (NDUAA**)** e 51kDa (NDUV1), sendo que a subunidade de 75 kDa (NDUS1) apresentou expressão reduzida apenas nas amostras de pacientes com CCC.

O complexo II (Succinato-Coenzima Q Oxidorredutase) da cadeia respiratória, responsável pela transferência de elétrons do succinato para a coenzyma Q (ubiquinona), é composto por 4 subunidades formadas por flavoproteínas, centros ferro-enxofre e citocromos (126). Neste estudo, encontramos expressão aumentada da subunidade flavoproteína do complexo II (DHSA) em amostras de pacientes com CCC, CI e CDI em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias. No entanto, encontramos expressão reduzida da subunidade com centro ferro-enxofre (DHSB) em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI. É importante considerar que a enzima succinato desidrogenase também participa do ciclo do ácido cítrico, sendo que o complexo I e o complexo II não operam em série, mas ambos

promovem a transferência de elétrons para a coenzima Q a partir de substratos reduzidos (NADH ou succinato). O complexo II permite que elétrons de potencial relativamente alto entrem na cadeia respiratória por uma via independente do complexo I (126).

O complexo III (Coenzima Q-Citocromo c Oxidorredutase) da cadeia respiratória contém 11 subunidades e é também conhecido como citocromo bc1. Este catalisa a oxidação da coenzima Q (reduzida) pelo citocromo c (126). Neste estudo, encontramos a subunidade 1 (QCR1) e a subunidade 2 (QCR2) com expressão reduzida tanto em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quanto em amostras de pacientes com CDI.

O Complexo IV (Citocromo c Oxidase), composto por 13 unidades, catalisa a oxidação do citocromo c reduzido pelo O2, o aceptor terminal de elétrons do processo de transporte de elétrons. Não encontramos nenhum componente deste complexo com expressão alterada nos pacientes aqui estudados.

Cardiomiopatias são frequentemente associadas a mutações nos componentes da cadeia respiratória (136). Estudos também mostram que alterações na cadeia respiratória pode ser conseqüência de danos oxidativos devido ao excesso de radicais livres (137). Estudos realizados com camundongos infectados por *T. cruzi* mostrou alterações em diversos componentes da cadeia respiratória, sendo que a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa foi substancialmente reduzida (37-50%) (57). Foi demonstrado que a atividade dos complexos I e III encontra-se diminuída no miocárdio de acumundongos infectados por T. cruzi (138).

O complexo V, mais comhecido como complexo da ATP sintase F_1F_0, é responsável pela produção de ATP. Os complexos I, III e IV funcionam como uma bomba de prótons. Estes se acumulam no espaço intermembranar, criando uma diferença de potencial electroquímico, utilizado pela ATP sintase na formação de ATP, a partir de ADP e Pi. A ATP sintase mitocondrial é composta por dois componentes funcionais F0 e F1. F0 é um canal de prótons transmembrana contendo pelo menos oito diferentes tipos de subunidades (a, b, c, d ...). F1 é uma proteína da membrana periférica composta de cinco tipos de subunidades (alfa$_3$, beta$_3$, gama$_1$, delta$_1$, epsilon$_1$). As subunidades alfa e beta formam o centro catalítico do componente F1 (126). Na análise proteômica diferencial, encontramos expressão aumentada da subunidade alfa da ATP sintase F1 (ATPA) em amostras de pacientes com CCC, CI e CDI. No entanto, encontramos expressão reduzida da subunidade b da ATP sintase F0 (AT5F1) em amostras de pacientes CCC, CI e CDI e também expressão reduzida da subunidade d da ATP sintase F0 (ATP5H) em amostras de pacientes CCC e CDI.

A função global da cadeia respiratória é a oxidação de nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleótido reduzida (FADH2), provenientes de outras vias metabólicas, bem como o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de uma série de transportadores para o aceitador final, o oxigênio. A velocidade da respiração mitocondrial pode ser controlada pela disponibilidade de ADP. O sistema da fosforilação oxidativa, sendo o mecanismo final de todas as vias metabólicas para a produção de energia, procede à sua regulação e, portanto qualquer déficit na cadeia respiratória tem consequências nesse sistema (126).

A atividade do ciclo de Krebs é regulada pela razão NAD/NADH, que por sua vez está dependente da disponibilidade de ADP e este da utilização do ATP. Adicionalmente, algumas enzimas do ciclo são também reguladas, como é o caso, por exemplo, da citrato sintetase que é inibida alostericamente pelo ATP e acil-CoA de cadeia longa e da isocitrato desidrogenase que é activada pelo ADP e inactivada pelo ATP e NADH. A succinato desidrogenase é inibida pelo oxaloacetato, e a sua disponibilidade é controlada pela malato desidrogenase, que depende da razão NADH/NAD. Assim no caso de existir um déficit na cadeia respiratória, o NADH não vai ser oxidado a NAD+ e consequentemente este não vai estar disponível para o ciclo de Krebs, levando à acumulação dos seus metabolitos intermediários (126).

5.2.4.5 . Complexo da creatina quinase

O complexo da creatina quinase, responsável pela translocação de ATP da mitocôndria para as miofibrilas, também apresentou componentes com expressão alterada em nossos estudos. A enzima creatina quinase M (KCRM) apresentou expressão reduzida em amostras de pacientes cardiopatas em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias, e a creatina quinase mitocondrial (KCRS) apresentou expressão reduzida apenas em amostras de pacientes com CDI e CI. O sistema creatina quinase será discutido mais detalhadamente no item 5.3.

5.2.4.6 . Outros processos metabólicos

Além dos processos metabólicos citados anteriormente, também constatamos outros processos com expressão protéica de seus componentes alterados. É o caso do metabolismo de corpos cetônicos, como a 3-cetoacil-CoA-transferase (SCOT1), com expressão aumentada; e a acetil-CoA-acetiltransferase (THIL), com expressão reduzida, ambas em amostras de pacientes com CCC e CDI.

A gliconeogênese, síntese de glicose a partir de precursores que não os carboidratos, requer o transporte de metabólitos entre a mitocôndria e o citosol. Em nosso estudo encontramos enzimas responsáveis por este processo de transporte com expressão alterada no miocárdio de cardiopatas. A aspartato aminotransferase (AATC) apresenta expressão reduzida em pacientes com CCC, CDI e CI, e a malato desidrogenase (MDHC) apresenta expressão reduzida em pacientes com CCC e CDI.

A redução de expressão da enzima adenilato quinase, ou mioquinase, (KAD1) também foi encontrada em amostras de pacientes com CCC e CDI. Esta enzima cataliza a transferência de grupos fosfatos entre ATP e AMP; também está envolvida no metabolismo energético e síntese de nucleotídeos, que são essenciais para a manutenção e crescimento celular. Estudos mostram que a diminuição na capacidade de transferência de fosfato inorgânico através da diminuição da enzima adenilato quinase ou através do comprometimento do sistema creatina quinase, aumenta o custo do trabalho mecânico e diminui as reservas enesgéticas para a contração, tornando o miocárdio mais susceptíveis aos danos da isquemia (139).

A alteração de algumas enzimas pode também ser resultado de alterações de metabólitos energéticos, como é o caso da glutamato desidrogenase (DHE3), a qual participa do processo biossintético do glutamato, que se encontra aumentada em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI. Esta enzima possui uma regulação alostérica, sendo ativada por ADP e inibida por GTP e ATP.

Encontramos também uma proteína desacopladora da fosforilação oxidativa (UCP2) com expressão reduzida no miocárdio de pacientes com CCC e CDI. O transporte de elétrons e a síntese de ATP promovida pelo gradiente de prótons estão, em geral, firmamente acoplados. Tal acoplamento depende da impermeabilidade da membrana mitocondrial interna, que permite o estabelecimento de um gradiente eletroquímico através dessa membrana, pela translocação de prótons durante o transporte de elétrons. O único caminho para os prótons retornarem a matriz é através da porção F0 da ATP sintase. A presença de um desacoplador, na membrana mitocondrial interna, que aumente a permeabilidade dos prótons desacopla a fosforilação oxidativa do transporte de elétrons por meio da criação de uma rota de dissipação do gradiente eletroquímico de prótons que não requer a síntese de ATP, e que em condições fisiológicas produz calor (50). A diminuição da expressão da proteína UCP2 poderia ser resultado de um mecanismo compensatório com a finalidade de preservar a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa.

A síntese de glicogênio também pode estar alterada em pacientes com cardiomiopatias. Em nosso estudo encontamos em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI expressão aumentada da UDP-glicose-pirofosforilase (UGPA), a qual catalisa uma etapa exergônica da biossíntese de glicogênio.

5.3. Metabolismo energético / Produção e translocação de ATP

A deficiência de energia cardíaca desempenha um importante papel na insuficiência cardíaca (140). O coração consome mais energia do que qualquer órgão, utilizando e reciclando aproximadamente 6 kg de ATP por dia. Assim, qualquer dano na produção de energia poderia levar a uma falha mecânica do coração, além de distúrbios na condução elétrica (50).

Neste estudo, encontramos várias enzimas do metabolismo energético com expressão reduzida no miocárdio de pacientes com CCC em relação a indivíduos sem cardiomiopatia. Em experimentos de análise da expressão protéica diferencial, a enzima creatina quinase M apresentou expressão reduzida em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI, em comparação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatias, sendo que pacientes com CCC foram os que apresentaram a maior redução. A análise da expressão do RNA mensageiro desta enzima também mostrou redução em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em relação às amostras de pacientes sem cardiomiopatia. As amostras de pacientes com CCC também apresentaram níveis reduzidos de RNA mensageiro de outras isoformas da creatina quinase, a B (brain) e a mitocondrial, em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias. A expressão protéica da creatina quinase mitocondrial estava levemente reduzida em amostras de pacientes com CCC em comparação às amostras de indivíduos sem cardiomiopatia, mas apresentou redução estatisticamente significativa em comparação com amostras de pacientes com CI. A redução na expressão das enzimas refletiu em sua atividade enzimática. Observamos redução significativa da atividade

enzimática da creatina quinase total em amostras de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatia, e novamente pacientes com CCC foram os que apresentaram a maior redução. Sendo assim, podemos observar que pacientes com CCC apresentam danos no sistema da creatina quinase.

A creatina quinase está envolvida na geração de ATP citoplasmático para a contração muscular a partir da fosfocreatina mitocondrial (Carvajal e cols., 2003). Neste sistema, a creatina quinase mitocondrial catalisa a transferência da ligação fosfato de alta energia do ATP para a creatina formando a fosfocreatina e ADP. A fosfocreatina é uma molécula menor que o ATP e se difunde rapidamente da mitocôndria para as miofibrilas, onde a creatina quinase miofibrilar catalisa a produção do ATP a partir da fosfocreatina, gerando creatina livre que difunde novamente para a mitocôndria. Uma importante função do sistema da creatina quinase é agir como um tampão energético. Quando a demanda de energia supera a produção, o nível de fosfocreatina cai, mantendo o nível de ATP e aumentando o nível do ADP livre. O aumento na quantidade de ADP livre estimula a produção de ATP pela fosforilação oxidativa; no entanto inibe a função de muitas enzimas intracelulares, podendo causar falhas nos mecanismos de contração do coração (50, 51). Animais deficientes nas enzimas creatina quinase M e mitocondrial apresentam maior susceptibilidade a sofrer danos cardíacos e distúrbios na homeostase de cálcio após isquemia e reperfusão (141). Também foi demostrado que estes animais apresentam hipertrofia e dilatação do ventrículo esquerdo (142). A anormalidade no metabolismo da creatina quinase foi relacionada à severidade da hipertrofia cardíaca

(143); e um estudo “in vitro”, utilizando amostras de pacientes com insuficiência cardíaca submetidos ao transplante, demonstrou redução na atividade enzimática da creatina quinase, e no conteúdo de fosfocreatina e creatina (144).

A análise do ATP e da fosfocreatina em tecidos é complicada devido à instabilidade destas moléculas. Assim, o principal método para a medida destes metabólitos “in vivo” é a ressonância magnética de fósforo-31 (^{31}P-MR) (145). Por esta técnica é possível medir o fluxo de ATP pelo sistema creatina quinase através de medidas suscessivas da quantidade de ATP e fosfocreatina. Foi demostrado que o fluxo de ATP através do sistema da creatina quinase está reduzido em 50% em pacientes com insuficiência cardíaca em relação a indivíduos saudáveis. A concentração da fosfocreatina também estava reduzida em pacientes com insuficiência cardíaca, enquanto que a concentração de ATP não alterou (146). Através de medidas indiretas da produção de ATP pela fosforilação oxidativa, como a medida do consumo de oxigênio, foi demostrado que o coração em repouso possui uma taxa de produção de ATP pelo sistema creatina quinase 7 a 10 vezes maior que a taxa de produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Em corações normais submetidos ao estresse adrenérgico, o fluxo pelo sistema creatina quinase não altera, no entanto, a razão entre a taxa de produção de ATP pelo sistema creatina quinase sobre a taxa de produção de ATP pela fosforilação oxidativa diminui de 7-10 vezes para 3-5 vezes. Esta diminuição da razão mostra que a taxa de produção de ATP pela fosforilação oxidativa aumenta com a demanda. Em corações de pacientes em repouso com insuficiência cardíaca, os autores sugerem que a razão seja de apenas 2-3 vezes (146). A razão fosfocreatina/ATP, medida através de ^{31}P-MR, foi utilizada

como um marcador de prognóstico em pacientes com cardiomiopatia dilatada, mostrando que entre pacientes com baixa razão fosfocreatina/ATP houve uma maior mortalidade (147).

A fosforilação oxidativa mitocondrial é essencial para a produção de energia para o funcionamento cardíaco. Este sistema, como dito anteriormente, compreende a cadeia de transporte de elétrons (complexos I a IV) e o complexo da ATP sintase F_1F_0 (complexo V). Estudos demonstram que certos componentes da fosforilação oxidativa podem estar comprometidos na insuficiência cardíaca. Em pacientes com CDI e CI, foi encontrada uma redução da atividade do complexo III em comparação com controles (148); também em pacientes com CDI foi encontrada redução na atividade da citocromo c oxidase (complexo IV). No entanto outros estudos mostram um aumento no RNAm de componentes da fosforilação oxidativa em corações isquêmicos (149). Anormalidades nas atividades dos complexos da cadeia respiratória I, II, III e IV podem levar a uma inibição secundária do complexo enzimático da ATP sintase "in vivo" (150).

Em nosso estudo, a análise da expressão protéica da ATP sintase alfa e ATP sintase beta (pertencentes à subunidade F_1 do complexo da ATP sintase – complexo V), mostra um aumento de expressão destes componentes no miocárdio de pacientes com CI em comparação ao miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. Em amostras de pacientes com CDI encontramos aumento de expressão da enzima ATP sintase beta em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias. No entanto, em amostras de pacientes com CCC, encontramos a proteína ATP sintase alfa com expressão reduzida em comparação com amostras de indivíduos sem

cardiomiopatias. Já na análise proteômica utilizando marcação fluorescente encontramos a expressão aumentada de “spots” identificados como ATP sintase alfa, sugerindo que estas diferenças são específicas de algumas isoformas desta proteína provavelmente resultado de modificações pós-traducionais. A expressão dos RNAs mensageiros das enzimas ATP sintase alfa e beta também apresentaram diminuição em amostras de pacientes com CCC em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias. Estes resultados mostram que além do sistema creatina quinase, a produção de ATP pelo complexo da ATP sintase também pode estar prejudicada.

Como foi dito anteriormente, a taxa de produção de ATP pela fosforilação oxidativa aumentaria com a demanda em corações saudáveis, enquanto que a taxa de produção de ATP pelo sistema da creatina quinase se manteria inalterado. Em pacientes com CCC, teríamos não apenas a taxa de produção de ATP pelo sistema da creatina quinase alterada, como também a produção de ATP pelo complexo da ATP sintase, diminuindo a capacidade de produção de ATP em resposta à demanda. Estudos realizados com camundongos infectados com *T. cruzi*, mostraram que estes animais apresentaram redução da atividade de complexos da cadeia respiratória e diminuição da capacidade de produção de ATP (57).

A análise proteômica diferencial, em nosso estudo, também mostrou diminuição da enzima aconitase em amostras de pacientes com CCC em comparação com amostras de indivíduos sem cardiomiopatias, e também em comparação com amostras de pacientes com CI. O RNA mensageiro desta enzima também apresentou expressão reduzida em pacientes com CCC em comparação com indivíduos sem

cardiomiopatias. A aconitase participa do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) em duas etapas, na desidratação do citrato a cis-aconitase, e em seguida na hidratação da cis-aconitase a isocitrato. Experimentos utilizando análise proteômica diferencial mostraram que camundongos deficientes em creatina quinase apresentam uma diminuição da forma precursora da aconitase no tecido cardíaco em comparação a camundongos selvagens (54), sugerindo que os níveis reduzidos da creatina quinase observados no miocárdio de pacientes com CCC possam ter papel causal na alteração da aconitase.

Citocinas inflamatórias também podem alterar o metabolismo energético. Foi observado, que em cardiomiócitos, o IFN-gama inibiu o metabolismo oxidativo (58) e reduziu os níveis de ATP (59). Adicionalmente, estudos com cultura de células musculares humanas demonstraram que o IFN-gama poderia inibir a produção gênica e protéica da creatina quinase destas células (60).

Nossos resultados mostram que o miocárdio de pacientes com CCC apresenta expressão reduzida de várias proteínas mitocondriais associadas ao metabolismo energético - nas vias da glicólise, ciclo de Krebs, beta-oxidação, na fosforilação oxidativa, e do complexo creatina-quinase - em comparação com miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatias. Embora algumas dessas alterações tenham sido compartilhadas com a CDI, e em menor grau com a CI, observamos que os pacientes CCC apresentam o maior comprometimento, principalmente do metabolismo de lipídios, em especial a beta-oxidação, e do sistema creatina quinase, incluindo sua atividade enzimática.

Assim, os resultados são compatíveis com a hipótese de que cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica apresentam uma menor eficiência em seu metabolismo energético mitocondrial, causada pela diminuição da expressão de proteínas envolvidas em múltiplos processos essenciais para a geração de ATP (figura 35). Sendo assim, sugerimos que, se os achados puderem ser generalizáveis, a pior evolução da CCC quando comparada a outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória, como a CI e a CDI, poderia estar relacionada a uma hipotética produção mitocondrial insuficiente de ATP no miocárdio.

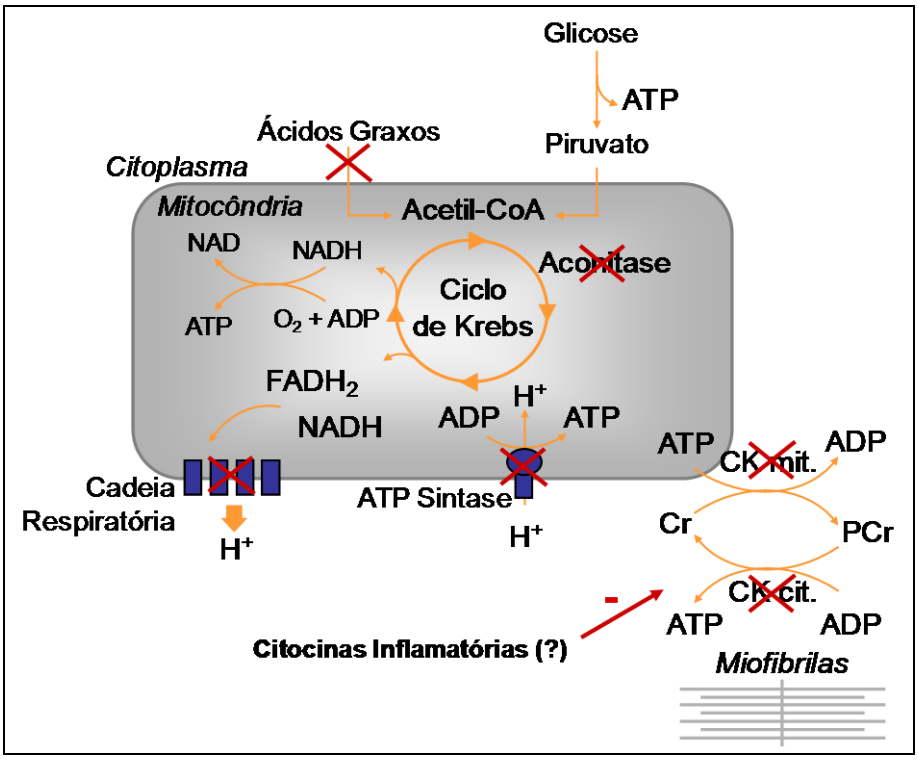


Figura 35. Esquema mostrando de maneira simplificada algumas vias metabólicas envolvidas na geração de ATP, ressaltando as que podem estar alteradas no miocárdio de pacientes com CCC, gerando uma depleção na produção de ATP.

Observamos também, através da análise proteômica, aumento de expressão de proteínas de stress – incluindo estresse oxidativo, associadas à apoptose, e ao sistema imune no miocárdio de pacientes CCC, além da subunidade do imunoproteasomo e de proteínas associadas à degradação protéica. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a diminuição de expressão das proteínas essenciais à geração de ATP, o aumento da expressão de proteínas associadas à apoptose e de proteínas do sistema imune no miocárdio de pacientes com CCC em comparação aos pacientes CI e CDI podem estar relacionados à pior evolução da CCC.

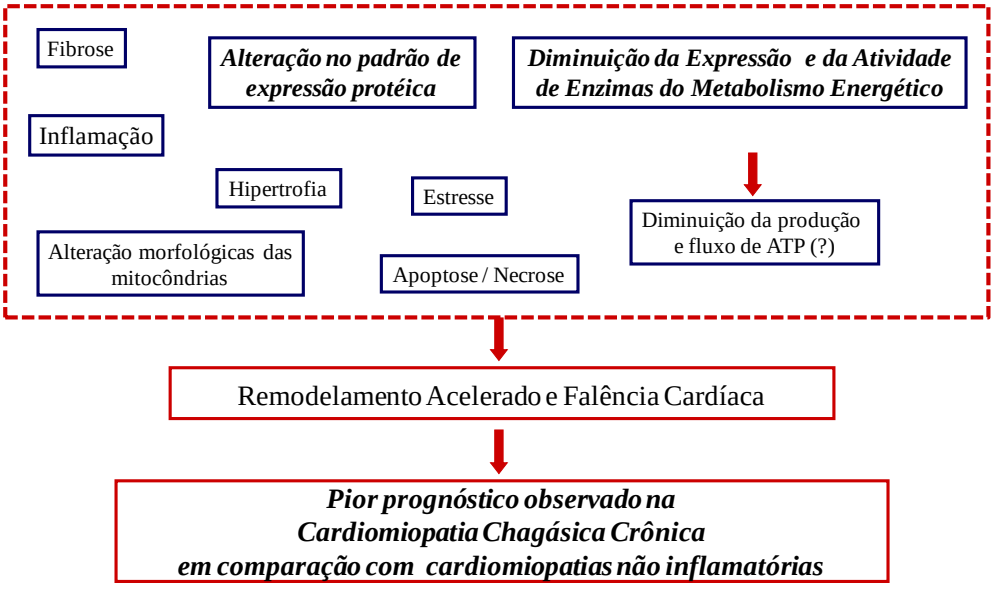


Figura 36. Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica.

6. Conclusões

6.1. Identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica

- As principais classes funcionais de proteínas identificadas no perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com CCC foram proteínas estruturais e contráteis e de metabolismo energético.

- Através da análise proteômica, nós também identificamos proteínas pouco abundantes, como fatores transcripcionais, proteínas da resposta imune e relacionadas ao processo apoptótico.

- A identificação de proteínas envolvidas na apoptose, no processo oxidativo e na resposta imune sugere a possível participação desses processos na patogênese da CCC. A ocorrência de apoptose é sugerida também pela identificação da forma ativada da caspase 8 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

- Apesar das proteínas estruturais corresponderem a apenas 19% da diversidade de proteínas presentes no coração, elas representam 62% da massa das proteínas totais. Enquanto que as proteínas envolvidas no metabolismo celular correspondem a 38% da diversidade, mas 14% da massa de proteínas totais.

6.3. Análise da expressão protéica diferencial no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia

- O padrão de expressão das proteínas presentes no miocárdio de pacientes com CCC foi o mais distinto em relação ao padrão de expressão de proteínas presentes no miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatia.

- O padrão de expressão das proteínas presentes no miocárdio de pacientes com CI foi o que mais se assemelhou ao padrão de expressão de proteínas presentes no miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatia.

- Assim, análise de padrões de expressão poderia auxiliar no diagnóstico e na descoberta de biomarcadores em doenças cardiovasculares.

6.3. Metabolismo energético no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI, e de indivíduos sem cardiomiopatia

- O sistema creatina quinase apresentou-se comprometido no miocárdio de pacientes com CCC, CDI e CI em comparação com o miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatia, sendo que pacientes com CCC foram os que apresentaram o maior comprometimento.

- Várias enzimas participantes da beta-oxidação encontravam-se reduzidas em amostras de pacientes com CCC em comparação com o miocárdio de indivíduos sem cardiomiopatia.

- Componentes da fosforilação oxidativa e complexo enzimático da ATP sintase também se encontravam com expressão alterada em amostras de pacientes com CCC em comparação com indivíduos sem cardiomiopatia.

- Sendo assim, o miocárdio de pacientes com CCC pode apresentar uma menor eficiência em seu metabolismo energético mitocondrial, causada pela diminuição da expressão de proteínas envolvidas em múltiplos processos essenciais para a geração de ATP disponível para a contração muscular. Desta forma, sugerimos que a pior evolução da CCC quando comparada a outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória, como a CI e a CDI, pode estar a um maior comprometimento produção mitocondrial de ATP no miocárdio.

Assim, podemos concluir que mecanismos de apoptose e necrose celular, de resposta ao estresse, o remodelamento cardíaco e a inflamação podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da CCC. O miocárdio de pacientes com CCC também podem apresentar uma menor eficiência em seu metabolismo energético mitocondrial, causada pela diminuição da expressão de proteínas envolvidas em múltiplos processos essenciais para a geração de ATP. Desta forma, estes mecanismos, juntamente com a expressão protéica distinta apresentada no miocárdio de pacientes com CCC, podem estar relacionados à pior evolução da CCC quando comparada a outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória, como a CI e a CDI.

7. Anexos

Anexo A

Tabela I. Lista completa da identificação do perfil de expressão protéica no miocárdio de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

Spot	Símbolo	Descrição	Exp.	Cov. (%)	pI (T)	pI (E)	PM (T)	PM (E)	Vol. Norm.	Acc. nº
51	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,006	10,0	7,4	9,5	86,2	84,6	0,161	Q99798
52	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,006	10,0	7,4	7,6	86,2	84,6	0,027	Q99798
54	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,006	10,0	7,4	7,7	86,2	84,3	0,046	Q99798
57	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,016	6,9	7,4	8,5	86,2	84,2	0,075	Q99798
58	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,115	9,6	7,4	8,3	86,2	84,2	0,118	Q99798
59	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,170	16,0	7,4	8,0	86,2	84,2	0,119	Q99798
60	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0,040	10,0	7,4	7,9	86,2	84,2	0,071	Q99798
187	ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	0,056	18,0	5,2	4,6	42,3	57,7	0,052	P68133
231	ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	0,029	30,8	5,2	5,6	42,3	51,8	0,085	P68133
235	ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	0,027	30,2	5,2	5,5	42,3	51,6	0,196	P68133
196	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,037	26,9	5,3	6,3	42,3	56,0	0,079	P62736
273	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,033	19,7	5,3	4,9	42,3	42,5	0,018	P62736
275	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,010	19,7	5,3	4,8	42,3	42,1	0,034	P62736
281	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,035	25,5	5,3	4,8	42,3	41,1	0,063	P62736
283	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,031	32,1	5,3	4,7	42,3	40,8	0,075	P62736
284	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,021	19,7	5,3	4,6	42,3	40,8	0,031	P62736
285	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,015	21,2	5,3	4,9	42,3	40,2	0,024	P62736
286	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,071	20,0	5,3	4,8	42,3	40,0	0,050	P62736
287	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,045	19,7	5,3	4,7	42,3	39,8	0,032	P62736
289	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,075	22,4	5,3	4,8	42,3	38,5	0,025	P62736
295	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,078	23,6	5,3	4,9	42,3	34,9	0,081	P62736
297	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,020	18,0	5,3	4,6	42,3	34,9	0,023	P62736
298	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,031	18,2	5,3	4,8	42,3	34,7	0,065	P62736
299	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,107	13,0	5,3	5,0	42,3	34,3	0,027	P62736
302	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,107	18,2	5,3	4,9	42,3	33,9	0,019	P62736
105	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,067	18,0	5,2	5,7	42,5	74,0	0,028	P68032
190	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,003	24,9	5,2	6,4	42,5	56,8	0,036	P68032
191	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,012	31,0	5,2	5,0	42,5	56,8	0,105	P68032
197	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,006	28,1	5,2	3,0	42,3	56,0	0,816	P68032
201	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,093	23,6	5,2	7,1	42,3	55,8	0,031	P68032
203	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,133	20,7	5,2	6,4	42,3	55,6	0,039	P68032
204	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,031	28,1	5,2	2,9	42,3	55,6	0,445	P68032

206	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,019	30,5	5,2	5,2	42,3	55,2	1,157	P68032
209	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,023	28,4	5,2	5,3	42,3	54,4	3,557	P68032
211	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,021	33,4	5,2	5,6	42,3	54,3	6,055	P68032
215	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,042	30,5	5,2	5,5	42,3	54,1	5,382	P68032
221	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,093	30,0	5,2	6,8	42,3	53,7	0,033	P68032
224	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,025	26,4	5,2	6,6	42,3	53,4	0,033	P68032
230	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	0,080	19,0	5,2	5,8	42,3	52,2	0,080	P68032
193	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,008	34,0	5,3	6,2	42,3	56,1	0,306	P63267
194	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,029	33,2	5,3	5,1	42,3	56,1	0,266	P63267
195	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,108	20,5	5,3	6,8	42,3	56,0	0,053	P63267
200	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,194	29,8	5,3	6,6	42,3	55,9	0,053	P63267
207	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,019	34,0	5,3	6,0	42,3	55,1	1,212	P63267
208	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,018	34,3	5,3	5,8	42,3	54,7	3,618	P63267
225	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,023	20,2	5,3	6,4	42,3	53,2	0,023	P63267
233	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,056	30,6	5,3	10,3	42,3	51,7	0,399	P63267
14	ACTN2	actinin, alpha 2	0,099	15,7	5,3	5,0	104	94,4	0,021	P35609
15	ACTN2	actinin, alpha 2	0,018	9,6	5,3	5,2	104	94,2	0,033	P35609
17	ACTN2	actinin, alpha 2	0,005	10,1	5,3	5,3	104	93,1	0,127	P35609
18	ACTN2	actinin, alpha 2	0,035	12,2	5,3	5,5	104	92,6	0,059	P35609
19	ACTN2	actinin, alpha 2	0,024	8,2	5,3	6,2	104	92,0	0,040	P35609
20	ACTN2	actinin, alpha 2	0,036	20,9	5,3	5,7	104	91,9	0,079	P35609
22	ACTN2	actinin, alpha 2	0,004	23,9	5,3	5,9	104	91,5	0,116	P35609
23	ACTN2	actinin, alpha 2	0,018	20,9	5,3	5,7	104	91,3	0,165	P35609
228	ADSS	adenylosuccinate synthase	0,043	8,0	8,8	6,0	50,2	52,7	0,034	P30520
361	AK1	adenylate kinase 1	0,084	23,0	7,8	9,5	21,9	25,5	0,121	P00568
79	ALB	albumin precursor	0,055	9,9	5,7	6,3	53,4	80,9	0,017	P02768
82	ALB	albumin precursor	0,085	11,2	5,9	6,2	71,2	80,3	0,031	P02768
97	ALB	albumin precursor	0,073	12,7	5,7	8,0	53,4	77,2	0,026	P02768
99	ALB	albumin precursor	0,057	17,3	5,6	6,2	68,4	76,0	6,653	P02768
106	ALB	albumin precursor	0,067	12,7	5,7	10,3	53,4	73,6	0,118	P02768
150	ALDH2	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	0,010	0,2	6,6	6,2	56,3	65,8	0,070	P05091
238	ALDOA	aldolase Complexed With Frutose 1,6-Biphosphate	0,020	30,0	8,8	9,5	39,7	51,3	0,821	P04075
294	ALG1	beta-1,4 mannosyltransferase	0,129	14,7	5,6	4,7	26,5	35,2	0,023	Q9P2Y2
282	ANXA5	annexin A5	0,090	16,6	4,9	4,9	35,8	41,0	0,024	P08758
339	APOA1	apolipoprotein A-I	0,034	21,9	5,5	5,1	30,8	28,6	0,041	P02647
340	APOA1	apolipoprotein A-I	0,036	24,7	5,5	5,2	30,8	28,3	0,110	P02647
398	APTX	aprataxin	0,088	27,0	9,2	5,0	13,3	12,3	0,015	Q7Z2E3
248	ARFGAP1	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1	0,032	27,8	4,4	5,6	44,7	46,1	0,019	Q8N6T3
134	ATP5A1	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle	0,015	15,7	8,4	4,5	54,6	68,1	0,020	P25705
156	ATP5A1	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle	0,010	21,7	9,3	9,5	59,8	64,6	0,821	P25705
117	ATP5B	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	0,030	20,6	5,3	5,0	56,5	70,2	0,054	P06576
162	ATP5B	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	0,000	46,1	5,3	5,0	56,5	63,6	1,548	P06576
288	ATP5C1	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	0,047	26,1	9,1	9,5	32,3	38,8	0,313	P36542
263	C16orf49	chromosome 16 open reading frame 49	0,020	25,2	5,6	4,9	35,7	43,8	0,026	O75208

264	C16orf49	chromosome 16 open reading frame 49	0,152	17,0	5,6	4,8	35,7	43,7	0,028	O75208
265	C16orf49	chromosome 16 open reading frame 49	0,069	25,2	5,6	5,0	35,7	43,6	0,021	O75208
305	CA1	carbonic anhydrase I	0,001	38,8	6,6	7,4	28,8	32,2	0,019	P00915
274	CASP2	caspase-2 precursor (CASP-2)	0,310	22,0	6,3	3,0	48,8	42,5	0,603	P42575
347	CASP2	caspase-2 precursor (CASP-2)	0,140	18,0	6,1	6,1	34,9	27,1	0,036	P42575
355	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	0,100	12,0	5,7	6,4	30,7	26,7	0,061	Q14790
213	CKM	creatine kinase, M chain	0,001	22,6	6,8	7,7	43,3	54,1	0,031	P06732
216	CKM	creatine kinase, M chain	0,047	19,9	6,8	8,3	43,3	54,0	0,090	P06732
217	CKM	creatine kinase, M chain	0,002	20,7	6,8	8,0	43,3	54,0	0,042	P06732
218	CKM	creatine kinase, M chain	0,066	25,5	6,8	7,6	43,3	53,9	0,099	P06732
219	CKM	creatine kinase, M chain	0,056	25,5	6,8	8,9	43,3	53,8	0,159	P06732
220	CKM	creatine kinase, M chain	0,026	25,5	6,8	8,6	43,3	53,8	0,302	P06732
222	CKM	creatine kinase, M chain	0,005	38,1	6,8	8,1	43,3	53,5	0,578	P06732
223	CKM	creatine kinase, M chain	0,003	28,6	6,8	7,8	43,3	53,5	0,362	P06732
198	CKMT2	creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	0,149	25,1	8,9	9,5	48,0	55,9	1,211	P17540
368	CRYAB	crystallin, alpha B	0,070	29,7	6,8	2,9	20,1	23,8	0,252	P02511
371	CRYAB	crystallin, alpha B	0,012	44,6	6,8	7,0	20,1	23,3	0,085	P02511
372	CRYAB	crystallin, alpha B	0,085	20,0	6,8	7,3	20,1	23,0	0,204	P02511
373	CRYAB	crystallin, alpha B	0,010	44,0	6,8	7,6	20,1	22,6	1,865	P02511
375	CRYAB	crystallin, alpha B	0,013	35,4	6,8	3,0	20,1	20,3	0,709	P02511
249	CRYM	crystallin, mu	0,168	10,5	5,1	5,2	33,9	45,9	0,025	Q14894
253	CRYM	crystallin, mu	0,002	10,5	5,1	5,1	33,9	45,6	0,026	Q14894
255	CRYM	crystallin, mu	0,002	10,5	5,1	5,0	33,9	45,2	0,019	Q14894
292	CTSD	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	0,010	14,5	5,3	5,3	44,5	35,8	0,016	P07339
293	CTSD	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	0,011	14,5	5,3	5,4	44,5	35,3	0,020	P07339
296	CTSD	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	0,069	14,6	6,1	5,9	44,5	34,9	0,034	P07339
130	DES	desmin	0,050	25,3	5,2	4,9	53,6	68,3	0,038	P17661
131	DES	desmin	0,036	30,2	5,2	8,4	53,6	68,2	0,024	P17661
135	DES	desmin	0,078	20,0	5,2	5,6	53,6	67,3	0,043	P17661
136	DES	desmin	0,032	15,7	5,2	5,7	53,6	67,0	0,027	P17661
138	DES	desmin	0,001	44,7	5,2	5,4	53,6	66,5	0,147	P17661
144	DES	desmin	0,000	32,0	5,2	3,1	53,6	66,1	0,055	P17661
147	DES	desmin	0,098	18,9	5,2	5,1	53,6	66,0	1,144	P17661
152	DES	desmin	0,016	34,7	5,2	5,3	53,6	65,6	1,355	P17661
154	DES	desmin	0,000	41,7	5,2	5,2	53,6	65,3	1,506	P17661
170	DES	desmin	0,066	26,8	5,2	5,2	53,6	60,9	0,029	P17661
172	DES	desmin	0,081	29,1	5,2	5,3	53,6	60,8	0,043	P17661
179	DES	desmin	0,077	22,3	5,2	5,2	53,6	59,5	0,051	P17661
180	DES	desmin	0,030	29,1	5,2	5,3	53,6	59,1	0,062	P17661
132	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	0,032	18,7	7,8	8,0	54,7	68,2	0,054	P09622
133	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	0,042	18,7	7,8	7,7	54,7	68,1	0,074	P09622
139	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	0,025	22,0	7,8	8,0	54,7	66,3	0,051	P09622
155	DLST	dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2- oxoglutarate dehydrogenase	0,091	14,8	9,4	6,4	49,0	64,7	0,058	P36957

158	DLST	dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2- oxoglutarate dehydrogenase	0,068	11,0	9,4	6,1	49,0	64,4	0,059	P36957
334	DNAJC 12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	0,150	19,0	5,5	7,3	23,4	29,3	0,038	Q9UKB3
168	DNAJC 13	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13 (RME8)	0,022	18,5	8,4	7,0	50,6	61,3	0,020	O75165
104	DPYSL 2	dihydropyrimidinase-like 2	0,085	12,4	6,0	7,3	62,7	74,3	0,038	Q16555
290	ECH1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	0,044	19,5	9,0	7,3	36,1	37,1	0,018	Q13011
291	ECH1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	0,006	16,2	8,7	7,8	36,1	36,9	0,021	Q13011
316	ECHS1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	0,020	21,0	8,9	6,9	31,8	31,3	0,020	P30084
178	ENO1	enolase 1	0,026	24,4	7,0	7,6	47,5	60,2	0,023	P06733
107	ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	0,002	10,1	6,9	7,9	65,5	73,6	0,013	Q16134
108	ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	0,037	6,7	6,9	5,6	65,5	73,4	0,039	Q16134
110	ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	0,031	7,0	6,9	7,7	65,5	73,3	0,022	Q16134
401	FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	0,130	21,0	7,0	4,8	13,3	12,0	0,122	P05413
402	FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	0,038	25,2	7,0	7,0	13,3	11,9	0,365	P05413
403	FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	0,092	25,2	7,0	6,4	13,3	11,8	0,667	P05413
56	FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	0,090	10,0	5,7	6,6	88,1	84,3	0,088	P22607
181	FH	fumarate hydratase precursor	0,139	18,8	9,0	7,7	54,8	58,5	0,058	P07954
182	FH	fumarate hydratase precursor	0,052	16,0	9,0	7,5	54,8	58,5	0,036	P07954
183	FH	fumarate hydratase precursor	0,018	23,5	9,0	8,1	54,8	58,3	0,058	P07954
185	FH	fumarate hydratase precursor	0,060	22,5	9,0	7,9	54,8	58,2	0,022	P07954
80	FOXP4	forkhead box P4 isoform 1	0,086	24,8	4,5	7,8	16,2	80,8	0,014	Q8IVH2
252	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,019	15,2	8,7	9,5	36,2	45,6	0,665	P04406
169	GJE1	gap junction protein, epsilon 1, 29kDa	0,046	17,0	9,4	6,9	31,3	61,0	0,022	Q8NFK1
171	GJE1	gap junction protein, epsilon 1, 29kDa	0,031	17,0	9,4	6,7	31,3	60,8	0,065	Q8NFK1
38	GOLGA 1	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1 (golgin 97)	0,019	12,0	5,2	5,7	88,3	88,4	0,042	Q92805
234	GOT1	aspartate aminotransferase 1	0,064	17,0	6,8	7,5	46,4	51,6	0,065	P17174
236	GOT1	aspartate aminotransferase 1	0,039	14,8	6,5	7,9	46,5	51,5	0,073	P17174
351	GSTA1	glutathione S-transferase A1	0,073	31,1	5,4	6,2	23,3	26,9	0,030	P08263
374	GZMA	granzyme A precursor	0,033	16,0	9,1	7,3	29,0	21,9	0,077	P12544
406	HBA1	hemoglobin, alpha 1	0,026	14,1	9,1	9,4	15,0	11,2	0,274	P69905
407	HBA1	hemoglobin, alpha 1	0,022	40,1	8,7	8,3	15,0	10,1	0,016	P69905
404	HBB	hemoglobin, beta	0,046	36,3	6,8	8,3	15,0	11,8	0,104	P68871
405	HBB	hemoglobin, beta	0,002	40,6	6,8	7,8	15,0	11,5	0,101	P68871
319	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	0,130	12,0	6,1	7,8	40,5	31,2	0,040	P01889
128	HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G	0,083	32,7	5,0	7,4	19,2	68,4	0,109	P17693
63	HMGC S1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic (HMG-CoA synthase)	0,160	11,9	5,8	7,3	56,0	83,2	0,031	Q01581
69	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	0,035	10,0	5,1	5,0	72,3	83,0	0,147	P11021
89	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	0,001	33,9	5,6	5,5	53,6	79,4	0,168	P11142
90	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	0,002	28,2	5,6	5,6	53,6	79,1	0,283	P11142

91	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	0,024	18,1	5,6	3,3	53,6	78,3	0,029	P11142
92	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	0,000	34,8	5,6	5,6	53,6	77,8	0,158	P11142
93	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	0,000	35,6	5,6	5,8	53,6	77,7	0,234	P11142
83	HSPA9 B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	0,037	14,4	6,0	6,0	74,1	79,7	0,052	P38646
84	HSPA9 B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	0,065	14,2	6,0	5,8	74,1	79,7	0,099	P38646
85	HSPA9 B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	0,065	14,2	6,0	6,0	74,1	79,5	0,048	P38646
86	HSPA9 B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	0,024	16,4	6,0	5,9	74,1	79,5	0,179	P38646
87	HSPA9 B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	0,014	14,4	6,0	5,8	74,1	79,5	0,125	P38646
88	HSPA9 B	heat shock 70kDa protein 9B precursor	0,002	30,2	6,0	5,7	74,1	79,4	0,194	P38646
307	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,056	24,9	6,0	5,0	22,8	32,1	0,011	P04792
309	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,041	33,2	8,1	5,6	22,4	31,9	0,080	P04792
312	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,041	33,2	8,1	5,3	22,4	31,6	0,097	P04792
324	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,083	37,7	8,1	6,1	22,4	30,7	0,090	P04792
325	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,136	24,9	8,1	5,4	22,4	30,7	0,011	P04792
327	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,078	32,2	8,1	6,7	22,4	30,5	0,035	P04792
328	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,074	36,6	8,1	5,7	22,4	30,4	0,219	P04792
329	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	0,051	29,8	8,1	6,3	22,4	30,1	0,099	P04792
376	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin, B6	0,102	23,1	6,0	6,1	17,2	19,6	0,013	O14558
378	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin, B6	0,010	23,0	6,0	6,7	17,2	19,3	0,008	O14558
382	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin, B6	0,072	23,8	6,0	6,4	17,2	19,0	0,017	O14558
399	HSPB7	heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	0,007	32,1	5,4	5,2	15,5	12,2	0,011	Q9UBY9
39	HSPCA	heat shock 90kDa protein 1, alpha	0,009	13,0	4,9	5,0	84,5	88,4	0,036	P07900
109	HSPD1	chaperonin (HSP60)	0,020	18,8	5,7	5,2	61,2	73,4	0,016	P10809
111	HSPD1	chaperonin (HSP60)	0,059	16,9	5,7	5,3	61,2	73,1	0,033	P10809
112	HSPD1	chaperonin (HSP60)	0,059	16,9	5,7	5,4	61,2	72,6	0,117	P10809
114	HSPD1	chaperonin (HSP60)	0,115	15,5	5,7	5,6	61,2	72,3	0,068	P10809
268	IGHG2	Immunoglobulin heavy chain	0,028	31,7	5,2	6,8	35,9	43,3	0,026	P01859
332	IGHG2	Immunoglobulin heavy chain variable region	0,148	33,3	5,8	9,5	13,7	29,7	0,136	P01859
50	IMMT	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	0,047	9,0	6,1	6,3	83,6	85,3	0,033	Q16891
53	IMMT	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	0,000	16,0	6,1	6,4	83,6	84,6	0,047	Q16891
61	IMMT	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	0,000	9,0	6,1	6,5	83,6	84,2	0,112	Q16891
66	IMMT	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	0,100	6,0	6,1	6,6	83,6	83,0	0,067	Q16891
321	KIAA0992	palladin	0,083	12,4	9,3	9,0	45,6	31,0	0,118	Q7Z3W0
254	LDHB	lactate dehydrogenase B	0,013	15,9	5,7	6,7	36,8	45,5	0,103	P07195
258	LDHB	lactate dehydrogenase B	0,011	16,8	5,9	6,2	36,8	45,0	0,054	P07195
261	LDHB	lactate dehydrogenase B	0,150	20,1	5,7	6,7	36,8	44,2	0,156	P07195
142	LMNA	lamin A/C (70 kDa lamin)	0,010	15,0	6,3	8,4	65,0	66,2	0,037	P02545
143	LMNA	lamin A/C (70 kDa lamin)	0,150	13,0	6,3	6,9	65,0	66,2	0,028	P02545
387	MB	myoglobin	0,034	24,0	7,9	2,8	17,2	16,7	0,786	P02144
388	MB	myoglobin	0,018	44,2	7,9	3,1	17,2	15,5	1,120	P02144
389	MB	myoglobin	0,034	24,0	7,9	4,1	17,2	15,3	0,018	P02144
391	MB	myoglobin	0,097	39,6	7,1	8,8	17,2	14,8	0,189	P02144
392	MB	myoglobin	0,086	30,7	7,9	7,3	17,2	14,5	0,022	P02144

393	MB	myoglobin	0,051	48,1	7,9	8,4	17,2	14,5	1,379	P02144
394	MB	myoglobin	0,002	39,6	7,9	7,7	17,2	14,4	0,284	P02144
270	MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	0,099	23,7	9,0	9,5	33,7	42,7	0,103	P40926
25	MLH1	DNA mismatch repair protein Mlh1; MutL protein homolog 1	0,088	10,0	5,5	7,2	84,7	90,8	0,022	P40692
199	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	0,048	25,0	5,3	7,9	53,8	55,9	0,029	P45452
202	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	0,130	25,0	5,3	8,4	53,8	55,6	0,067	P45452
205	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	0,098	25,0	5,3	8,5	53,8	55,5	0,039	P45452
3	MYBPC 3	myosin binding protein C, cardiac	0,001	8,8	6,2	7,5	141	107	0,030	Q14896
4	MYBPC 3	myosin binding protein C, cardiac	0,038	8,6	6,2	7,3	141	106	0,031	Q14896
5	MYBPC 3	myosin binding protein C, cardiac	0,003	7,5	6,2	7,2	141	106	0,025	Q14896
6	MYBPC 3	myosin binding protein C, cardiac	0,063	9,0	6,2	7,1	141	106	0,039	Q14896
1	MYH6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1)	0,001	6,0	5,9	8,3	223	125	0,041	P13533
2	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,017	9,6	5,6	10,3	183	109	0,087	P12883
7	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,055	32,4	5,3	5,2	183	98,9	0,106	P12883
21	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,034	7,4	5,6	5,4	183	91,9	0,115	P12883
26	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,047	8,3	5,2	5,3	183	90,8	0,037	P12883
29	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,047	8,3	5,2	5,5	183	90,6	0,056	P12883
40	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,086	17,9	5,2	5,6	183	88,0	0,038	P12883
49	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,020	22,1	5,2	5,5	183	86,3	0,040	P12883
62	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,040	19,1	5,2	5,4	183	83,5	0,037	P12883
100	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,015	21,9	5,3	5,5	183	75,5	0,042	P12883
101	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,000	31,5	5,3	5,5	183	75,3	0,098	P12883
102	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,000	33,6	5,3	5,6	183	75,0	0,115	P12883
165	MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac, beta	0,040	21,0	5,3	5,8	183	62,7	0,019	P12883
377	MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	0,003	35,5	4,9	4,6	18,8	19,5	0,174	P10916
381	MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	0,004	51,2	4,9	4,7	18,8	19,1	1,855	P10916
383	MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	0,000	69,3	4,9	4,8	18,8	18,9	2,749	P10916
342	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,006	44,8	5,0	3,0	22,0	27,7	0,514	P08590
343	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,080	28,4	5,0	5,8	22,0	27,3	0,034	P08590
344	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,009	30,9	5,0	4,8	22,0	27,2	0,077	P08590
349	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,028	39,2	5,0	5,5	22,0	27,1	0,682	P08590
350	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,048	29,9	5,0	5,7	22,0	27,0	0,041	P08590
353	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,000	56,2	5,0	5,3	22,0	26,9	2,636	P08590
354	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,011	36,6	5,0	4,9	22,0	26,8	0,179	P08590

356	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,048	36,6	5,0	5,0	22,0	26,6	0,960	P08590
357	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,058	36,6	5,0	5,2	22,0	26,6	2,399	P08590
358	MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,010	31,0	5,0	5,9	22,0	26,4	0,016	P08590
330	MYL4	myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic	0,010	36,0	5,0	5,3	21,4	30,0	0,021	P12829
333	MYL4	myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic	0,016	34,0	5,0	5,1	21,4	29,6	0,038	P12829
276	MYOZ2	myozenin 2	0,014	19,7	7,9	6,4	29,9	42,1	0,016	Q9NPC6
280	MYOZ2	myozenin 2	0,040	21,2	7,9	6,7	29,9	41,2	0,026	Q9NPC6
68	NDUFS 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	0,070	20,9	5,9	5,5	80,5	83,0	0,054	P28331
71	NDUFS 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	0,034	14,4	5,8	6,0	80,5	82,7	0,057	P28331
72	NDUFS 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	0,000	19,1	5,9	6,1	80,5	82,5	0,025	P28331
73	NDUFS 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	0,016	16,5	5,9	5,8	80,5	82,5	0,114	P28331
74	NDUFS 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	0,034	14,4	5,9	5,7	80,5	82,5	0,068	P28331
76	NDUFS 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	0,034	14,4	5,9	5,9	80,5	82,4	0,103	P28331
322	NDUFS 3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa	0,012	27,7	7,0	6,0	30,3	30,9	0,035	O75489
323	NDUFS 3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa	0,005	25,0	7,0	6,3	30,3	30,9	0,023	O75489
360	NDUFS 8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa	0,091	18,1	5,5	5,1	24,3	25,6	0,028	O00217
166	NDUFV 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	0,042	8,6	9,1	9,5	50,5	62,2	0,088	P49821
345	NDUFV 2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa	0,015	26,0	7,1	6,6	25,7	27,1	0,058	P19404
226	NOR1	oxidored-nitro domain-containing protein isoform 1	0,132	20,6	9,4	2,9	26,7	53,2	0,132	Q8N7G2
137	NSFL1 C	p47 protein	0,082	17,3	5,1	5,9	41,1	66,5	0,037	Q9UNZ2
141	NSFL1 C	p47 protein	0,082	17,3	5,1	6,0	41,1	66,3	0,036	Q9UNZ2
118	NUP153	nucleoporin 153kDa	0,087	4,0	8,9	6,6	153	69,9	0,018	P49790
24	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	0,100	8,5	6,6	7,6	114	90,8	0,016	Q02218
27	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	0,013	8,5	6,6	7,5	114	90,6	0,026	Q02218
28	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	0,062	7,4	6,6	7,3	114	90,6	0,027	Q02218
30	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	0,086	8,0	6,6	7,6	114	90,4	0,022	Q02218
31	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	0,086	8,0	6,6	7,4	114	90,4	0,028	Q02218
32	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	0,015	9,3	6,6	7,3	114	90,4	0,027	Q02218
127	OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1 precursor	0,002	17,1	7,2	6,9	56,6	68,7	0,072	P55809
129	OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1 precursor	0,098	14,0	7,2	7,1	56,6	68,3	0,107	P55809
266	PDHB	pyruvate dehydrogenase, E1 beta	0,000	26,0	5,4	6,2	36,8	43,5	0,037	P11177
269	PDHB	pyruvate dehydrogenase, E1 beta	0,000	26,0	5,4	6,0	36,8	43,2	0,038	P11177
120	PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3	0,045	15,2	6,0	6,5	57,2	69,7	0,025	P30101
121	PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3	0,045	15,2	6,0	6,0	57,2	69,5	0,020	P30101
123	PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3	0,056	17,8	6,0	6,3	57,2	69,4	0,038	P30101
124	PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3	0,103	9,3	6,0	6,2	57,2	69,4	0,022	P30101

300	PHB	prohibitin	0,002	37,5	5,6	5,9	29,9	34,3	0,042	P35232
301	PHB	prohibitin	0,008	28,7	5,6	5,6	29,9	34,3	0,017	P35232
362	PRDX2	peroxiredoxin 2	0,199	27,4	5,2	6,2	18,5	25,0	0,037	P32119
363	PRDX2	peroxiredoxin 2	0,030	20,0	5,2	5,6	18,5	25,0	0,072	P32119
364	PRDX2	peroxiredoxin 2	0,002	28,0	5,2	5,4	18,5	24,4	0,125	P32119
331	PRDX6	peroxiredoxin 6	0,066	17,4	6,0	6,8	25,1	30,0	0,071	P30041
103	PSMD11	proteasome 26S non-ATPase subunit 11	0,087	17,3	5,5	7,5	43,2	74,3	0,019	O00231
47	PYGB	glycogen phosphorylase, brain form	0,001	15,3	6,5	7,5	99,5	86,8	0,017	P11216
126	RTN1	reticulon 1	0,080	7,1	4,6	6,7	83,9	68,9	0,036	Q16799
279	RTN2	reticulon 2	0,164	16,4	5,3	9,5	33,4	41,3	0,156	O75298
94	SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0,005	14,5	7,1	7,5	73,7	77,4	0,080	P31040
95	SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0,021	11,9	7,1	7,4	73,7	77,4	0,070	P31040
96	SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0,015	16,4	7,1	7,2	73,7	77,4	0,077	P31040
98	SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0,009	13,3	7,1	7,7	73,7	77,1	0,070	P31040
115	SERPINA1	alpha-1 antitrypsin	0,003	26,8	5,4	4,9	46,9	71,6	0,034	P01009
386	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	0,137	32,7	5,8	5,9	15,9	17,7	0,129	P00441
366	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0,000	0,3	6,9	7,3	23,7	23,9	0,035	P04179
369	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0,000	32,3	6,9	7,7	23,7	23,7	0,148	P04179
370	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0,000	22,5	6,9	8,1	23,7	23,5	0,048	P04179
359	SSH3	slingshot homolog 3	0,059	22,0	9,5	5,3	16,5	25,8	0,017	Q8TE77
163	TCRB	T cell receptor beta chain	0,087	24,6	4,7	5,4	19,9	63,2	0,023	P01850
352	TCRB	T cell receptor beta chain	0,002	32,7	6,5	9,5	19,9	26,9	0,081	P01850
64	TF	transferrin	0,084	7,9	7,1	6,9	79,3	83,0	0,123	P02787
70	TF	transferrin	0,030	21,5	6,9	7,2	79,3	82,7	0,037	P02787
75	TF	transferrin	0,040	7,9	7,1	7,0	79,3	82,4	0,336	P02787
212	TNNT2	troponin T2, cardiac	0,027	24,0	4,9	3,0	33,0	54,3	0,098	P45379
227	TNNT2	troponin T2, cardiac isoform 1	0,076	23,0	4,9	3,0	33,0	53,0	0,232	P45379
232	TNNT2	troponin T2, cardiac isoform 1	0,010	20,1	4,9	5,3	33,0	51,8	4,163	P45379
336	TPI1	triosephosphate isomerase 1	0,088	10,0	6,5	7,4	26,8	29,0	0,021	P60174
338	TPI1	triosephosphate isomerase 1	0,054	22,2	6,5	8,1	26,8	28,7	0,018	P60174
277	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	0,095	36,5	4,6	2,9	26,6	42,1	0,213	P09493
278	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	0,014	34,9	4,6	4,4	26,6	42,0	5,375	P09493
12	TRA1	tumor rejection antigen (gp96) 1 (hsp gp96)	0,008	9,1	4,7	4,7	90,4	95,0	0,043	P14625
122	TUBB	tubulin, beta polypeptide	0,019	19,9	4,8	5,2	30,6	69,5	0,066	P07437
188	TUFM	elongation factor Tu, mitochondrial precursor (EF-Tu) (P43).	0,182	16,4	7,9	7,5	49,9	56,8	0,059	P49411
189	TUFM	elongation factor Tu, mitochondrial precursor (EF-Tu) (P43).	0,020	19,0	7,9	7,3	49,9	56,8	0,052	P49411
192	TUFM	elongation factor Tu, mitochondrial precursor (EF-Tu) (P43).	0,193	15,3	7,9	7,7	49,9	56,4	0,035	P49411
173	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core I	0,021	14,2	5,9	6,6	53,3	60,7	0,094	P31930
174	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core I	0,021	14,2	5,9	6,0	53,3	60,7	0,034	P31930
175	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core I	0,013	23,5	5,9	6,2	53,3	60,5	0,083	P31930
176	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core I	0,008	25,0	5,9	6,3	53,3	60,4	0,093	P31930
177	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core I	0,000	26,6	5,9	6,4	53,3	60,3	0,104	P31930

337	UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0,034	12,4	8,9	7,0	29,9	29,0	0,128	P47985
116	VIM	vimentin	0,067	23,6	5,1	5,3	53,7	70,2	0,026	P08670
119	VIM	vimentin	0,067	23,6	5,1	5,1	53,7	69,8	0,062	P08670
125	VIM	vimentin	0,029	33,9	5,0	5,1	53,7	69,3	0,191	P08670
164	VIM	vimentin	0,023	26,2	5,1	5,1	53,7	62,8	0,052	P08670
167	VIM	vimentin	0,004	32,2	5,1	5,0	53,7	62,1	0,066	P08670
308	VIM	vimentin	0,040	17,0	5,1	5,8	53,7	32,0	0,064	P08670

Exp: “Expectation”; Cov.:“Coverage”; pI: ponto isoelétrico; PM: peso molecular; (E): experimental; (T): teórico; Vol. Norm.: Volume normalizado;. Acc. nº: Número de acesso no banco de dados de proteínas.

Anexo B

Tabela I. Esquema de marcação fluorescente das amostras utilizadas para a análise proteômica diferencial, mostrando o número de "spots" detectados em cada gel.

No.	Imagem	Marcação	N. Spots	"Matched"	Grupo
1	Gel 01 (A1) Cy3.gel	Cy3	2196	1355	CCC-F
2	Gel 01 (B1) Cy5.gel	Cy5	2196	1355	CCC-MY
3	Gel 01 STANDARD CY2.gel	Cy2	2196	1355	Standard
4	Gel 02 (B2) Cy3.gel	Cy3	2282	1367	CCC-MY
5	Gel 02 (C2) Cy5.gel	Cy5	2282	1367	CCC-M
6	Gel 02 STANDARD CY2.gel	Cy2	2282	1367	Standard
7	Gel 03 (A2) Cy5.gel	Cy5	2422	1365	CCC-F
8	Gel 03 (C1) Cy3.gel	Cy3	2422	1365	CCC-M
9	Gel 03 STANDARD CY2.gel	Cy2	2422	1365	Standard
10	Gel 04 (D1) Cy5.gel	Cy5	2300	1348	IC-M
11	Gel 04 (E1) Cy3.gel	Cy3	2300	1348	IDC-M
12	Gel 04 STANDARD CY2.gel	Cy2	2300	1348	Standard
13	Gel 05 (E2) Cy5.gel	Cy5	2177	1391	IDC-M
14	Gel 05 (F1) Cy3.gel	Cy3	2177	1391	N-MY
15	Gel 05 STANDARD CY2.gel	Cy2	2177	1391	Standard
16	Gel 06 (D2) Cy3.gel	Cy3	2079	1396	IC-M
17	Gel 06 (F2) Cy5.gel	Cy5	2079	1396	N-MY
18	Gel 06 STANDARD CY2.gel	Cy2	2079	1396	Standard
19	Gel 07 (C2) Cy3.gel	Cy3	2192	1360	CCC-M
20	Gel 07 (E1) Cy5.gel	Cy5	2192	1360	IDC-M
21	Gel 07 STANDARD CY2.gel	Cy2	2192	1360	Standard
22	Gel 08 (A1) Cy5.gel	Cy5	2165	1419	CCC-F
23	Gel 08 (D1) Cy3.gel	Cy3	2165	1419	IC-M
24	Gel 08 STANDARD CY2.gel	Cy2	2165	1419	Standard
25	Gel 09 (E3) Cy3.gel	Cy3	2162	1307	IDC-M
26	Gel 09 (F3) Cy5.gel	Cy5	2162	1307	N-MY
27	Gel 09 STANDARD CY2.gel	Cy2	2162	1307	Standard
28	Gel 10 (A3) Cy3.gel	Cy3	2510	1515	CCC-F
29	Gel 10 (C3) Cy5.gel	Cy5	2510	1515	CCC-M
30	Gel 10 STANDARD CY2.gel	Cy2	2510	1515	Standard

31	Gel 11 (B1) Cy3.gel	Cy3	2316	1372	CCC-MY
32	Gel 11 (D2) Cy5.gel	Cy5	2316	1372	IC-M
33	Gel 11 STANDARD CY2.gel	Cy2	2316	1372	Standard
34	Gel 12 (B2) Cy5.gel	Cy5	2352	1453	CCC-MY
35	Gel 12 (F2) Cy3.gel	Cy3	2352	1453	N-MY
36	Gel 12 STANDARD CY2.gel	Cy2	2352	1453	Standard
37	Gel 13 (D4) Cy3.gel	Cy3	2389	1496	IC-M
38	Gel 13 (E3) Cy5.gel	Cy5	2389	1496	IDC-M
39	Gel 13 STANDARD CY2.gel	Cy2	2389	1496	Standard
40	Gel 14 (C1) Cy5.gel	Cy5	2227	1394	CCC-M
41	Gel 14 (E4) Cy3.gel	Cy3	2227	1394	IDC-M
42	Gel 14 STANDARD CY2.gel	Cy2	2227	1394	Standard
43	Gel 15 (A4) Cy5.gel	Cy5	2211	1392	CCC-F
44	Gel 15 (F4) Cy3.gel	Cy3	2211	1392	N-MY
45	Gel 15 STANDARD CY2.gel	Cy2	2211	1392	Standard
46	Gel 16 (B3) Cy3.gel	Cy3	2394	1326	CCC-MY
47	Gel 16 (F1) Cy5.gel	Cy5	2394	1326	N-MY
48	Gel 16 STANDARD CY2.gel	Cy2	2394	1326	Standard
49	Gel 17 (A2) Cy3.gel	Cy3	2353	1447	CCC-F
50	Gel 17 (D3) Cy5.gel	Cy5	2353	1447	IC-M
51	Gel 17 STANDARD CY2.gel	Cy2	2353	1447	Standard
52	Gel 18 (B4) Cy5.gel	Cy5	2274	1493	CCC-MY
53	Gel 18 (C4) Cy3.gel	Cy3	2274	1493	CCC-M
54	Gel 18 STANDARD CY2.gel	Cy2	2274	1493	Standard
55	Gel 19 (C3) Cy3.gel	Cy3	2444	1545	CCC-M
56	Gel 19 (F4) Cy5.gel	Cy5	2444	1545	N-MY
57	Gel 19 STANDARD CY2.gel	Cy2	2444	1545	Standard
58	Gel 20 (B3) Cy5.gel	Cy5	2227	1488	CCC-MY
59	Gel 20 (E2) Cy3.gel	Cy3	2227	1488	IDC-M
60	Gel 20 STANDARD CY2.gel	Cy2	2227	1488	Standard
61	Gel 21b (C4) Cy5.gel	Cy5	2285	1390	CCC-M
62	Gel 21b (D3) Cy3.gel	Cy3	2285	1390	IC-M
63	Gel 21b STANDARD CY2.gel	Cy2	2285	1390	Standard
64	Gel 22 (D4) Cy5.gel	Cy5	2129	1476	IC-M
65	Gel 22 (F3) Cy3.gel	Cy3	2129	1476	N-MY
66	Gel 22 STANDARD CY2.gel	Cy2	2129	1476	Standard
67	Gel 23 (A3) Cy5.gel	Cy5	2184	1493	CCC-F

68	Gel 23 (B4) Cy3.gel	Cy3	2184	1493	CCC-MY
69	Gel 23 STANDARD CY2.gel	Cy2	2184	1493	Standard
70	Gel 24 (A4) Cy3.gel	Cy3	2253	1577	CCC-F
71	Gel 24 (E4) Cy5.gel	Cy5	2253	1577	IDC-M
72	Gel 24 STANDARD CY2.gel	Cy2	2253	1577	Standard
73	PrepCy2.gel	Cy2	2220	2154	Master

“Master”: Gel utilizado como referência para a comparação; “Matched”: Gel que foi correlacionado com o gel de referência; “Standard”: Imagem que representa o padrão interno (“pool” marcado com Cy2).

Anexo C

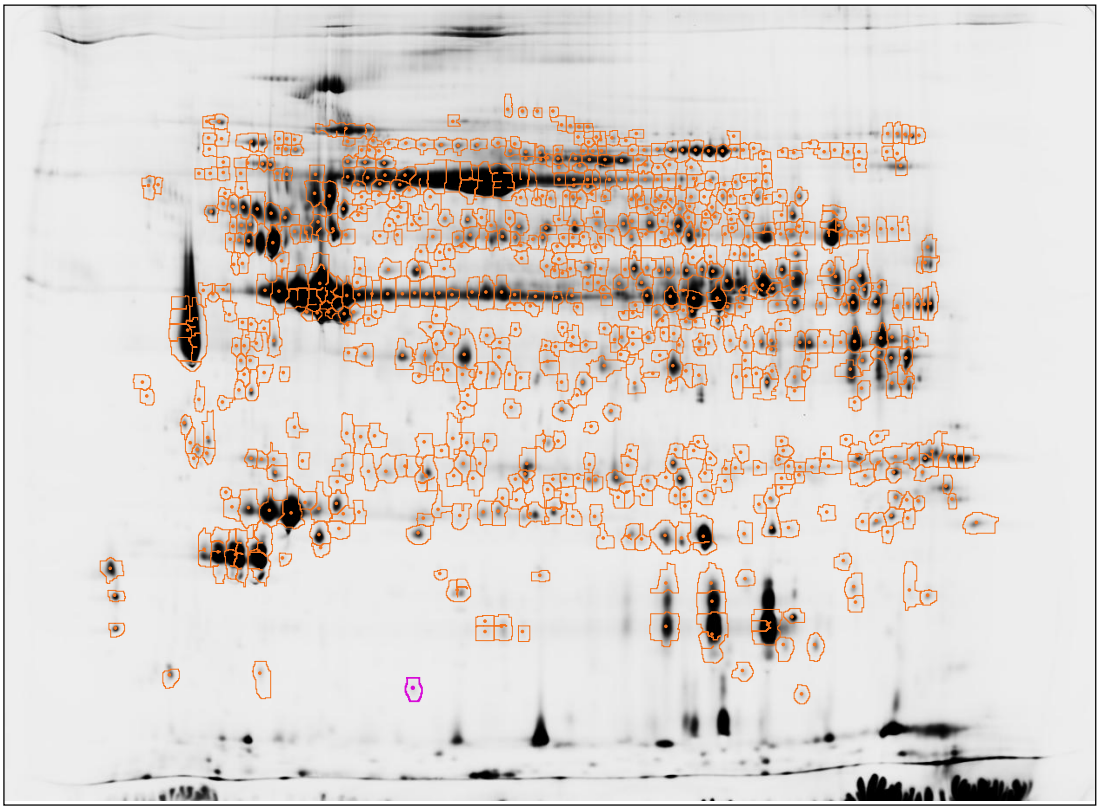


Figura I. Imagem fluorescente do gel preparativo com marcação dos “spots” que foram processados para identificação protéica.

Anexo D

Index	*N. Acesso*	*Sigla*	*Comp. Celular*	*Função*	*Nome*	*Score*	*Pep.*
396	Q96BH1	RNF25	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	E3 ubiquitin-protein ligase	72*	7
400	P18206	VINC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Vinculin (Metavinculin)	65*	9
404	P18206	VINC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Vinculin (Metavinculin)	6.33	5
405	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
434	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
439	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
440	P14625	ENPL	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1)	25.86	5
461	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
466	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
467	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
468	Q02218	ODO1	Mitocôndria	2.1. Glicólise	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	10.44	10
500	Q6WKZ4	RFIP1	Citoplasma	10. Outras funções	Rab11 family-interacting protein 1	54*	6
507	O75112	LDB3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	LIM domain-binding protein 3	59*	5
508	O75112	LDB3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	LIM domain-binding protein 3	63*	7
511	O75112	LDB3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	LIM domain-binding protein 3	70*	8
515	O75112	LDB3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	LIM domain-binding protein 3	5.43	7
516	O75112	LDB3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	LIM domain-binding protein 3	56*	5
522	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		

523	P49588	SYAC	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	53*	4
524	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
527	P14625	ENPL	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1)	7.06	6
528	P29323	EPHB2	Membrane	10. Outras funções	Ephrin type-B receptor 2	59*	7
529	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
531	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
537	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
538	Q9UJD0	RIMS3	Membrane	10. Outras funções	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 3	53*	5
539	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
540	Q96GE5	ZN799	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Zinc finger protein 799	53*	6
546	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
547	P35609	ACTN2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	62*	7
552	P06396	GELS	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	40*	5
553	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
554	P06396	GELS	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	7.74	4
555	P06396	GELS	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	62*	9
556	Q96N16	JKIP1	Membrane	10. Outras funções	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	60*	8
558	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
559	P06396	GELS	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	10.29	8
560	P06396	GELS	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	26.39	7
561	P06396	GELS	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	26.39	7
570	P21980	TGM2	Citoplasma	8. Ligação ao cálcio	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9.19	8
572	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		

573	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
576	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
578	P21980	TGM2	Citoplasma	8. Ligação ao cálcio	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	11.07	6
581	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
582	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	8.74	5
583	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	34.41	5
584	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	7.51	4
585	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
586	P21980	TGM2	Citoplasma	8. Ligação ao cálcio	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	11.86	12
587	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
588	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
590	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
591	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
592	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
594	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	8.08	7
595	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	11.26	14
596	P35609	ACTN2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	76	8
599	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	8.84	5
601	P49674	KC1E	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Casein kinase I isoform epsilon	56*	5
602	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
604	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		

605	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	13.06	23
606	P29400	CO4A5	Matriz extracelular	1. Proteínas estruturais e contráteis	Collagen alpha-5(IV) chain	51*	6
607	Q8WWW8	GAB3	Citoplasma	10. Outras funções	GRB2-associated-binding protein 3	58*	4
608	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
609	Q99798	ACON	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	14.69	21
614	Q16891	IMMT	Mitocôndria	10. Outras funções	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	16.4	5
615	P13010	KU86	Núcleo	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	57*	4
616	P08237	K6PF	Citoplasma	2.1. Glicólise	6-phosphofructokinase, muscle type	72*	6
617	Q9H223	EHD4	Membrane	8. Ligação ao cálcio	EH domain-containing protein 4	53*	5
618	P08237	K6PF	Citoplasma	2.1. Glicólise	6-phosphofructokinase, muscle type	60*	4
619	Q16891	IMMT	Mitocôndria	10. Outras funções	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	32.39	8
622	Q5TYW1	ZN658	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Zinc finger protein 658	57*	11
625	Q6ZNA5	FRRS1	Membrane	7. Transporte	Ferric-chelate reductase 1	52*	6
632	Q16891	IMMT	Mitocôndria	10. Outras funções	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	6.49	7
633	P02787	TRFE	Secretada	10. Outras funções	Serotransferrin precursor (Transferrin)	6.52	8
634	P02787	TRFE	Secretada	10. Outras funções	Serotransferrin precursor (Transferrin)	9.35	9
637	Q16891	IMMT	Mitocôndria	10. Outras funções	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	6.16	9
638	Q9H115	SNAB	Membrane	7. Transporte	Beta-soluble NSF attachment protein	56*	5
640	P02787	TRFE	Secretada	10. Outras funções	Serotransferrin precursor (Transferrin)	11.59	10
641	P02787	TRFE	Secretada	10. Outras funções	Serotransferrin precursor (Transferrin)	13.68	14
643	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
644	P28331	NDUS1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	26.47	7

646	P28331	NDUS1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	13.93	7
648	P28331	NDUS1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	44.12	10
649	P11021	GRP78	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	14.69	16
652	P29597	TYK2	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2	56*	7
653	P11021	GRP78	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	43.5	14
654	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
656	P12883	MYH7	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin-7 (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	6.64	8
657	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
659	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
673	P40939	ECHA	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	9.07	8
674	Q96MP8	KCTD7	Citoplasma	7. Transporte	BTB/POZ domain-containing protein KCTD7	57*	4
677	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
682	Q5T5P2	SKT	Citoplasma	10. Outras funções	Sickle tail protein homolog	53*	11
691	P38646	GRP75	Mitocôndria	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Stress-70 protein, mitochondrial	12.3	14
694	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
697	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
698	P51884	LUM	Matriz extracelular	1. Proteínas estruturais e contráteis	Lumican precursor	27	4
701	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	6.04	11
702	P38646	GRP75	Mitocôndria	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Stress-70 protein, mitochondrial	76*	12
708	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
710	P01024	CO3	Secretada	4. Resposta Imune	Complement C3 precursor	57*	6

712	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	9.69	8
719	P11142	HSP7C	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).	34.98	14
720	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
723	P11142	HSP7C	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).	10.6	10
724	P02768	ALBU	Secretada	10. Outras funções	Serum albumin precursor	7.09	8
725	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
726	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
727	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
729	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
731	P02768	ALBU	Secretada	10. Outras funções	Serum albumin precursor	12.96	12
732	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
735	P02768	ALBU	Secretada	10. Outras funções	Serum albumin precursor	12.32	13
736	P31040	DHSA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	8.47	10
737	P31040	DHSA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	7.3	8
742	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
744	O95831	AIFM1	Núcleo	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	58*	7
747	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
748	P08107	HSP71	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat shock 70 kDa protein 1	14.8	15
749	P00488	F13A	Citoplasma	8. Ligação ao cálcio	Coagulation factor XIII A chain	56*	8
751	P08107	HSP71	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat shock 70 kDa protein 1	14.96	20

753	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
755	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
758	P31040	DHSA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	15.94	14
759	P31040	DHSA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	14.98	14
762	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
766	P12883	MYH7	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin-7 (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	61*	9
772	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
774	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
776	Q9H6S0	YTDC2	Núcleo	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	59*	6
779	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
780	P49748	ACADV	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	9.14	7
781	P49748	ACADV	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	14.69	13
783	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
785	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
788	P42345	FRAP	Retículo endoplasmático	5. Sinalização Celular	Serine/threonine-protein kinase mTOR	60*	12
789	P49748	ACADV	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	26.47	12
793	Q16555	DPYL2	Citoplasma	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	Dihydropyrimidinase-related protein 2	11.43	9
794	Q92736	RYR2	Membrane	8. Ligação ao cálcio	Ryanodine receptor 2	65*	9
795	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		

796	P49748	ACADV	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	13.18	10
797	P49748	ACADV	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	202*	14
798	Q0VD86	INCA1	Núcleo	10. Outras funções	Protein INCA1	50*	8
799	Q16134	ETFD	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	50*	4
800	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
801	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	15.58	20
802	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
803	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
805	A8MWA6	F90AM	Outras	10. Outras funções	Putative protein FAM90A22	73*	5
806	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
808	Q7Z3D6	CN159	Mitocôndria	10. Outras funções	UPF0317 protein C14orf159, mitochondrial	60*	5
809	Q16134	ETFD	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	6.04	6
811	Q16134	ETFD	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	7.4	9
812	Q16134	ETFD	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	6.67	5
817	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	12.54	16
818	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
821	Q8TCG1	CIP2A	Citoplasma	10. Outras funções	Protein CIP2A	53*	7
823	P01009	A1AT	Secretada	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha-1-antitrypsin precursor	11.13	7
824	P01009	A1AT	Secretada	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha-1-antitrypsin precursor	14.13	12
827	P27338	AOFB	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Amine oxidase [flavin-containing] B	71*	6
828	Q13114	TRAF3	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	TNF receptor-associated factor 3	52*	5

831	P36871	PGM1	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Phosphoglucomutase-1	6.53	5
834	P01009	A1AT	Secretada	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha-1-antitrypsin precursor	14.99	11
835	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
837	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
838	Q13114	TRAF3	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	TNF receptor-associated factor 3	50*	5
840	P30038	AL4A1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	9.28	6
842	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
845	P10809	CH60	Mitocôndria	3. Resposta ao estresse e Apoptose	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	18.32	12
847	P07237	PDIA1	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Protein disulfide-isomerase precursor	16.16	4
848	Q13325	IFIT5	Citoplasma	4. Resposta Imune	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	43*	4
851	P01009	A1AT	Secretada	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha-1-antitrypsin precursor	11.33	9
852	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
856	P04040	CATA	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Catalase	6.44	5
858	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
859	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
860	P04040	CATA	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Catalase	45*	4
862	P14618	KPYM	Citoplasma	2.1. Glicólise	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	72*	5
863	P14618	KPYM	Citoplasma	2.1. Glicólise	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	8.6	7
864	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
866	P14618	KPYM	Citoplasma	2.1. Glicólise	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	59*	4
868	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
871	Q9BQE3	TBA1C	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Tubulin alpha-1C chain	12.22	8

872	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
873	Q76G19	PDZD4	Citoplasma	10. Outras funções	PDZ domain-containing protein 4	58*	8
874	P30101	PDIA3	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	8.67	9
875	P30101	PDIA3	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	11.54	11
876	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
878	Q9HCC0	MCCB	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	9.78	6
879	Q96AX9	MIB2	Citoplasma	5. Sinalização Celular	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	64*	9
883	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
888	P09622	DLDH	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	8.12	4
889	P09622	DLDH	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	10.9	7
890	P09622	DLDH	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	8.19	4
893	P42345	FRAP	Retículo endoplasmático	5. Sinalização Celular	Serine/threonine-protein kinase mTOR	51*	10
894	P07437	TBB5	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Tubulin beta-5 chain	6.28	6
895	P07437	TBB5	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Tubulin beta-5 chain	8.66	9
896	P07437	TBB5	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Tubulin beta-5 chain	9.48	10
897	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
899	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
901	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
903	P06744	G6PI	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glucose-6-phosphate isomerase	10.26	6
904	Q9BSD4	YP016	Outras	10. Outras funções	Uncharacterized protein MGC16385	66*	4
906	P55809	SCOT1	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	69*	6

907	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
909	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
911	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
914	P01857	IGHG1	Secretada	4. Resposta Imune	Ig gamma-1 chain C region.	9	5
915	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	65*	9
916	P01857	IGHG1	Secretada	4. Resposta Imune	Ig gamma-1 chain C region.	9.97	5
919	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
921	P00367	DHE3	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	7.84	5
922	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
924	Q02252	MMSA	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	5.99	6
925	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
927	P01857	IGHG1	Secretada	4. Resposta Imune	Ig gamma-1 chain C region.	7.65	5
928	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
931	Q8NEB9	PK3C3	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	67*	10
934	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	11.01	7
935	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
936	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	8.74	6
937	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	6.4	5
939	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	111*	12
941	P05091	ALDH2	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	6.95	6
942	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	68*	7
946	P05091	ALDH2	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	10.81	10

947	P05091	ALDH2	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	13.65	6
949	Q6P2E9	EDC4	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	7.48	5
950	Q86TD4	SRCA	Retículo sarcoplasmático	8. Ligação ao cálcio	Sarcalumenin	92*	13
951	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
952	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
953	P36957	ODO2	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2- oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	10.62	4
955	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
956	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
957	P28838	AMPL	Citoplasma	10. Outras funções	Cytosol aminopeptidase	59*	6
958	P28838	AMPL	Citoplasma	10. Outras funções	Cytosol aminopeptidase	60*	7
959	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	89*	14
965	Q8IWZ8	SF04	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Splicing factor 4	57*	7
966	P06576	ATPB	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	11.71	6
968	P06576	ATPB	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	12.43	6
971	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
973	P46734	MP2K3	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase	63*	7
976	Q8NFQ5	BPIL3	Secretada	10. Outras funções	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3	55*	6
977	P56703	WNT3	Matriz extracelular	5. Sinalização Celular	Proto-oncogene protein Wnt-3	58*	6
978	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
979	P11182	ODB2	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Lipoamide acyltransferase, mitochondrial	57*	6
980	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
983	P68104	EF1A1	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Elongation factor 1-alpha 1	6.93	6

986	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
989	P61158	ARP3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin-like protein 3	7.86	5
991	P42568	AF9	Núcleo	5. Sinalização Celular	Protein AF-9	56*	6
996	P49821	NDUV1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	14.33	10
998	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
999	P49821	NDUV1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	11.29	10
1000	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1001	Q75T13	PGAP1	Retículo endoplasmático	10. Outras funções	GPI inositol-deacylase	56*	5
1002	P49821	NDUV1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	10.53	7
1003	P49821	NDUV1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	12.68	10
1010	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1011	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1012	P14316	IRF2	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Interferon regulatory factor 2	79*	4
1020	A8MQB9	YR007	Outras	10. Outras funções	Putative ankyrin repeat domain-containing protein	63*	5
1024	P35609	ACTN2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	7.32	4
1025	P06733	ENOA	Citoplasma	2.1. Glicólise	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	72*	5
1026	P06733	ENOA	Citoplasma	2.1. Glicólise	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	7.28	5
1028	P06733	ENOA	Citoplasma	2.1. Glicólise	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	61*	4
1029	P06733	ENOA	Citoplasma	2.1. Glicólise	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	9.25	9
1032	P06733	ENOA	Citoplasma	2.1. Glicólise	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	10.44	8
1033	P48735	IDHP	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	6.84	4
1035	P06733	ENOA	Citoplasma	2.1. Glicólise	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	11.29	9

1037	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1040	O75822	EIF3J	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	55*	4
1041	P13929	ENOB	Citoplasma	2.1. Glicólise	Beta-enolase (Skeletal muscle enolase)	6.55	6
1043	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1047	P31930	QCR1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	26.47	6
1048	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1050	P31930	QCR1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	10.75	7
1053	P07954	FUMH	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Fumarate hydratase, mitochondrial	13.19	8
1054	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1055	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1057	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1059	P07954	FUMH	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Fumarate hydratase, mitochondrial	14.21	8
1060	P07954	FUMH	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Fumarate hydratase, mitochondrial	45	9
1063	P60842	IF4A1	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Eukaryotic initiation factor 4A-I	57*	4
1065	P48735	IDHP	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	11.31	13
1067	P48735	IDHP	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	44.27	13
1073	P17540	KCRS	Mitocôndria	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	5.76	7
1077	P17540	KCRS	Mitocôndria	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	56*	4
1080	P17540	KCRS	Mitocôndria	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	13.25	14
1084	P49411	EFTU	Mitocôndria	6. Controle da transcrição e tradução	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor (EF-Tu) (P43).	11.21	8
1086	P49411	EFTU	Mitocôndria	6. Controle da transcrição e tradução	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor (EF-Tu) (P43).	15.47	14
1095	P42765	THIM	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	10.7	9

1099	P42765	THIM	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	35.68	8
1101	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1110	P00558	PGK1	Citoplasma	2.1. Glicólise	Phosphoglycerate kinase 1	25.56	8
1111	P00558	PGK1	Citoplasma	2.1. Glicólise	Phosphoglycerate kinase 1	10.47	7
1115	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1116	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	8.57	6
1117	O75390	CISY	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Citrate synthase, mitochondrial	10.18	8
1120	O75390	CISY	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Citrate synthase, mitochondrial	7.68	5
1121	P17540	KCRS	Mitocôndria	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	10.1	10
1126	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	35.68	5
1129	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	9.99	5
1132	P12277	KCRB	Citoplasma	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase B-type	7.43	7
1133	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1134	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	11.55	6
1135	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	10.83	6
1136	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	10.9	6
1137	P08865	RSSA	Membrane	6. Controle da transcrição e tradução	40S ribosomal protein AS	9.14	4
1138	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1139	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1141	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1142	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1144	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	10.47	6

1145	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	10.74	6
1146	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	9.77	6
1151	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	9.3	6
1153	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	9.82	6
1154	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	11.12	5
1156	P06732	KCRM	Citoplasma	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase M-type	12.87	9
1158	P06732	KCRM	Citoplasma	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase M-type	11.77	10
1160	P06732	KCRM	Citoplasma	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase M-type	11.23	12
1161	P06732	KCRM	Citoplasma	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase M-type	9.16	8
1163	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	11.75	6
1165	P04075	ALDOA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	7.33	10
1167	P04075	ALDOA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	10.61	14
1171	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1174	P04075	ALDOA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	7.13	4
1176	P04075	ALDOA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	7.63	9
1179	P04075	ALDOA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	35.18	9
1180	P00505	AATM	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	9.75	4
1181	P00505	AATM	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	10.67	8
1183	P24752	THIL	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	72*	6
1184	P00505	AATM	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	10.27	11
1185	P00505	AATM	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	9.86	9
1186	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1187	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1189	P04075	ALDOA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	103*	7

1193	Q15019	SEPT2	Citoplasma	10. Outras funções	Septin-2	9.46	7
1194	P09972	ALDOC	Citoplasma	2.1. Glicólise	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	5.84	6
1199	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	7.41	7
1200	Q9UJZ1	STML2	Membrane	1. Proteínas estruturais e contráteis	Stomatin-like protein 2	8.09	3
1202	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	24.36	7
1205	Q99471	PFD5	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Prefoldin subunit 5	56*	7
1206	P00505	AATM	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	6.83	4
1207	P17174	AATC	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	95*	6
1208	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	6.98	5
1210	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1211	P17174	AATC	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	15.37	16
1214	P17174	AATC	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	12.8	11
1215	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	10.7	7
1222	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1228	A8MPP1	DD11L	Núcleo	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX11-like protein	59*	7
1229	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1231	O76021	RL1D1	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	60*	7
1232	O95299	NDUAA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	7.9	10
1237	P58499	FAM3B	Secretada	10. Outras funções	Protein FAM3B	58*	6
1240	Q92618	ZN516	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Zinc finger protein 516	50*	8
1241	Q15056	IF4H	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Eukaryotic translation initiation factor 4H	50*	6
1243	P63218	GBG5	Membrane	5. Sinalização Celular	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	38	
1246	P63218	GBG5	Membrane	5. Sinalização Celular	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	40	

1247	Q68D91	MBLC2	Citoplasma	10. Outras funções	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	49	
1248	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1249	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1250	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1252	P16219	ACADS	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	54*	4
1253	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	6.65	5
1257	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1262	P50213	IDH3A	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	9.8	5
1266	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1267	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1268	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1272	P50213	IDH3A	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	10.73	4
1278	O00151	PDLI1	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	PDZ and LIM domain protein 1	6.66	5
1280	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1282	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1283	P02689	MYP2	Citoplasma	7. Transporte	Myelin P2	57*	4
1284	P04083	ANXA1	Núcleo	5. Sinalização Celular	Annexin A1 (Annexin I)	10.25	5
1285	P40926	MDHM	Mitocôndria	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, mitochondrial	7.67	6
1286	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	8.72	6
1287	P62140	PP1B	Citoplasma	10. Outras funções	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	7.26	5
1288	P07355	ANXA2	Secretada	8. Ligação ao cálcio	Annexin A2 (Annexin II)	15.51	14
1289	P07355	ANXA2	Secretada	8. Ligação ao cálcio	Annexin A2 (Annexin II)	108*	6

1290	Q14894	CRYM	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Mu-crystallin homolog	27.47	5
1292	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	7.4	3
1293	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	8.07	3
1295	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	7.45	3
1297	P47755	CAZA2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	F-actin capping protein subunit alpha-2 (CapZ alpha-2).	14.21	7
1298	Q6P3V2	Z585A	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Zinc finger protein 585A	53*	7
1299	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1300	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	7.15	4
1301	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	58*	5
1302	P04406	G3P	Citoplasma	2.1. Glicólise	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	27.47	5
1304	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1305	Q96L73	NSD1	Núcleo	6. Controle da transcrição e tradução	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific	57*	9
1306	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1307	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1309	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1310	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1311	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1312	Q9Y2K2	QSK	Citoplasma	10. Outras funções	Serine/threonine-protein kinase QSK	56*	7
1316	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	64*	4
1317	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1320	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1321	P07355	ANXA2	Secretada	8. Ligação ao cálcio	Annexin A2 (Annexin II)	51*	3
1331	P22626	ROA2	Núcleo	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	7.52	4

1332	Q9UBT7	CTNL1	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Alpha-catulin	53*	6
1334	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1335	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1336	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1337	P11177	ODPB	Mitocôndria	2.1. Glicólise	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	59*	6
1341	P40926	MDHM	Mitocôndria	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, mitochondrial	10.62	9
1347	P40926	MDHM	Mitocôndria	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, mitochondrial	10.03	6
1349	P11177	ODPB	Mitocôndria	2.1. Glicólise	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	57*	6
1355	P40926	MDHM	Mitocôndria	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, mitochondrial	12.3	9
1357	A6NNV3	W19L5	Outras	10. Outras funções	Putative WBSCR19-like protein 5	58*	4
1358	P22626	ROA2	Núcleo	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	8.12	4
1359	P45379	TNNT2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin T, cardiac muscle	59*	4
1361	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1365	P23276	KELL	Membrane	10. Outras funções	Kell blood group glycoprotein	54*	7
1366	P40925	MDHC	Citoplasma	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	7.65	6
1375	P40925	MDHC	Citoplasma	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	50*	3
1376	P21796	VDAC1	Mitocôndria	7. Transporte	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	9.3	6
1377	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1378	Q16836	HCDH	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	54*	3
1379	Q16836	HCDH	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	64*	4
1380	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		

1381	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1382	Q16836	HCDH	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	69*	5
1383	Q16352	AINX	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Alpha-internexin	52*	5
1384	Q9NPC6	MYOZ2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myozenin-2	6.93	5
1385	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1387	O75208	COQ9	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	51*	3
1388	Q6WCQ1	MPRIP	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	53*	5
1390	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1391	Q9ULU4	PKCB1	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Protein kinase C-binding protein 1	56*	7
1392	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1396	Q6Q0C0	TRAF7	Citoplasma	5. Sinalização Celular	E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7	53*	7
1398	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1399	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1402	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1405	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1407	Q16836	HCDH	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	56*	4
1408	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	66*	4
1409	Q9NPC6	MYOZ2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myozenin-2	68*	6
1412	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1413	Q9NPC6	MYOZ2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myozenin-2	61*	5
1414	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1415	Q16698	DECR	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	6.61	5

1421	Q16698	DECR	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	25.21	3
1423	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1424	P08758	ANXA5	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Annexin A5 (Annexin V)	61*	6
1425	P08758	ANXA5	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Annexin A5 (Annexin V)	10.98	5
1431	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1433	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1435	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1442	P51451	BLK	Citoplasma	5. Sinalização Celular	Tyrosine-protein kinase BLK	58*	9
1443	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1445	P31751	AKT2	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	52*	7
1451	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1453	Q9Y5T4	DJC15	Membrane	3. Resposta ao estresse e Apoptose	DnaJ homolog subfamily C member 15	58*	4
1455	Q13011	ECH1	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	9.06	4
1461	Q13011	ECH1	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	12	5
1475	P62258	1433E	Citoplasma	5. Sinalização Celular	14-3-3 protein epsilon	26.88	5
1482	P25786	PSA1	Citoplasma	9. Proteassoma	Proteasome subunit alpha type-1	62*	4
1489	P07339	CATD	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Cathepsin D	58*	4
1493	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1495	P49588	SYAC	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	22.09	5
1499	P17931	LEG3	Núcleo	4. Resposta Imune	Galectin-3	8.17	4
1500	P07339	CATD	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Cathepsin D	58*	4
1503	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1507	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		

1509	P61981	1433G	Citoplasma	5. Sinalização Celular	14-3-3 protein gamma	85*	6
1510	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1511	Q06323	PSME1	Citoplasma	9. Proteassoma	Proteasome activator complex subunit 1 (Interferon gamma up-regulated I-5111 protein)	8.55	3
1512	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1513	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1516	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1517	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1518	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1522	P00915	CAH1	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Carbonic anhydrase 1	8.24	5
1523	P63104	1433Z	Citoplasma	5. Sinalização Celular	14-3-3 protein zeta/delta	7.73	5
1525	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1526	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1527	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1529	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1532	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1534	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1535	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1541	Q96P53	WDFY2	Núcleo	10. Outras funções	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2	56*	4
1543	P55851	UCP2	Mitocôndria	7. Transporte	Mitochondrial uncoupling protein 2	46*	5
1545	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1546	P15259	PGAM2	Citoplasma	2.1. Glicólise	Phosphoglycerate mutase 2	7.82	9
1547	P15259	PGAM2	Citoplasma	2.1. Glicólise	Phosphoglycerate mutase 2	71*	4
1548	P19429	TNNI3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin I, cardiac muscle	59*	5

1549	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1550	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1552	P38117	ETFB	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Electron transfer flavoprotein subunit beta	61*	4
1554	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1557	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1558	P18669	PGAM1	Citoplasma	2.1. Glicólise	Phosphoglycerate mutase 1	10.92	8
1560	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1563	P18669	PGAM1	Citoplasma	2.1. Glicólise	Phosphoglycerate mutase 1	80*	4
1564	P04792	HSPB1	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein)	53*	3
1565	P30084	ECHM	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	9.51	3
1569	P04792	HSPB1	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein)	9.5	7
1572	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1574	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1575	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1576	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1580	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1586	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1588	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1592	Q9NX63	CHCH3	Mitocôndria	10. Outras funções	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	50*	4
1594	Q9UIJ7	KAD3	Mitocôndria	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	11.73	7
1595	P62736	ACTA	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	9.68	3
1596	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		

1598	P12829	MYL4	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin light polypeptide 4 (Myosin light chain 1, embryonic muscle/atrial isoform)	6.19	5
1599	O75489	NDUS3	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	13.02	10
1602	P12235	ADT1	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	ADP/ATP translocase 1	46*	3
1603	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1606	Q9NX63	CHCH3	Mitocôndria	10. Outras funções	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	58*	4
1608	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1609	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1610	P60174	TPIS	Citoplasma	2.1. Glicólise	Triosephosphate isomerase	8.91	6
1611	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1612	P60174	TPIS	Citoplasma	2.1. Glicólise	Triosephosphate isomerase	13.02	10
1613	P30041	PRDX6	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Peroxiredoxin-6	61*	3
1614	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1616	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1617	P30041	PRDX6	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Peroxiredoxin-6	35.83	7
1618	P30041	PRDX6	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Peroxiredoxin-6	12.28	6
1620	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1621	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1622	O75489	NDUS3	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	10.61	5
1624	P60174	TPIS	Citoplasma	2.1. Glicólise	Triosephosphate isomerase	63*	4
1628	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1632	P50461	CSRP3	Citoplasma	10. Outras funções	Cysteine and glycine-rich protein 3	57*	4
1639	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		

1641	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1645	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1648	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1650	P30042	ES1	Mitocôndria	10. Outras funções	ES1 protein homolog, mitochondrial	69*	4
1651	P24539	AT5F1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit b, mitochondrial	61*	11
1652	P28161	GSTM2	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Glutathione S-transferase Mu 2	48*	4
1653	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1654	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1655	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1659	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1661	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1662	Q9ULI4	KI26A	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Kinesin-like protein KIF26A	72*	10
1663	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1665	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1666	P24539	AT5F1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit b, mitochondrial	68*	8
1667	P02647	APOA1	Secretada	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Apolipoprotein A-I precursor	62*	4
1668	P25787	PSA2	Citoplasma	9. Proteassoma	Proteasome subunit alpha type-2	56*	3
1669	P30043	BLVRB	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Flavin reductase	51*	3
1676	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1678	P08590	MYL3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	10.3	4
1680	P08590	MYL3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	13.84	7
1681	P08670	VIME	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Vimentin	53*	5

1682	P08590	MYL3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	7.41	3
1683	P19404	NDUV2	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	48*	3
1684	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1686	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1687	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1688	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1693	P24539	AT5F1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit b, mitochondrial	64*	7
1701	Q96FI4	NEIL1	Núcleo	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Endonuclease VIII-like 1	54*	3
1702	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1707	P09211	GSTP1	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Glutathione S-transferase P	68*	5
1708	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1709	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1710	P08590	MYL3	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	11.7	7
1712	P04179	SODM	Mitocôndria	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	7.83	6
1713	P00568	KAD1	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Adenylate kinase isoenzyme 1	6.75	4
1715	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1723	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1724	P30086	PEBP1	Citoplasma	10. Outras funções	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	9.18	5
1725	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1727	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1729	P32119	PRDX2	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Peroxiredoxin-2	8.52	6
1730	P02511	CRYAB	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha crystallin B chain	8.13	3
1731	O75947	ATP5H	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase D chain, mitochondrial	9.1	7

1734	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1738	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1739	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1741	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1747	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1756	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1760	P51970	NDUA8	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	50*	3
1767	P63316	TNNC1	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles	91*	6
1769	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1770	Q9UBY9	HSPB7	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat shock protein beta-7	50*	3
1773	Q9Y281	COF2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Cofilin-2 (Cofilin, muscle isoform).	45.49	7
1780	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1785	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1787	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1788	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1791	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1792	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1800	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	42*	2
1803	P05413	FABPH	Citoplasma	7. Transporte	Fatty acid-binding protein, heart	8.45	4
1813	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1816	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1824	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	62*	3

1826	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1831	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	58*	3
1832	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	43*	2
1845	P00568	KAD1	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Adenylate kinase isoenzyme 1	10.94	6
1846	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
1867	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1869	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1870	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1880	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
1883	Q9P0J0	NDUAD	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	7.6	5
2158	P31930	QCR1	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	10.8	7
2159	P02647	APOA1	Secretada	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Apolipoprotein A-I precursor	11.1	8
2160	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
2161	P07195	LDHB	Citoplasma	2.1. Glicólise	L-lactate dehydrogenase B chain	62*	6
2162	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
2163	P02511	CRYAB	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha crystallin B chain	7.83	3
2164	P07900	HS90A	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat shock protein HSP 90-alpha	11.82	15
2165	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	10.55	7
2166	P42126	D3D2	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	48*	3
2167	P22695	QCR2	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	12.89	8
2168	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
2169	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	14.88	13

2170	Q16851	UGPA	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	88*	9
2171	P35609	ACTN2	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	9.8	12
2172	P21912	DHSB	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	24.89	7
2173	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
2174	P09622	DLDH	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	9.31	6
2175	P10916	MLRV	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	65*	5
2176	P10916	MLRV	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	65*	5
2177	P10916	MLRV	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	66*	5
2178	P10916	MLRV	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	129*	9
2179	P55084	ECHB	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	7.89	5
2180	P17540	KCRS	Mitocôndria	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	13.37	13
2181	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	8.38	6
2182	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	9.49	14
2183	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
2184	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	13.35	15
2185	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	15.22	14
2186	P14618	KPYM	Citoplasma	2.1. Glicólise	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	68*	5
2187	P11021	GRP78	Retículo endoplasmático	3. Resposta ao estresse e Apoptose	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	43.5	12
2188	P25705	ATPA	Mitocôndria	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	76*	7
2189	P01024	CO3	Secretada	4. Resposta Imune	Complement C3 precursor	12.31	17

2190	O14763	TR10B	Membrane	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	51*	4
2191	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
2192	P49588	SYAC	Citoplasma	6. Controle da transcrição e tradução	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	58*	8
2193	Q9UHP3	UBP25	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	53*	8
2194	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
2195	P02768	ALBU	Secretada	10. Outras funções	Serum albumin precursor	9.64	8
2196	P55809	SCOT1	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	6.87	4
2197	P11310	ACADM	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	9.86	8
2198	P36957	ODO2	Mitocôndria	2.2. Ciclo de Krebs	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2- oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	9.26	4
2199	P09972	ALDOC	Citoplasma	2.1. Glicólise	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	7.53	4
2200	P00505	AATM	Mitocôndria	2.7. Outros processos metabólicos	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	8.15	5
2201	P07195	LDHB	Citoplasma	2.1. Glicólise	L-lactate dehydrogenase B chain	7.68	3
2202	P40925	MDHC	Citoplasma	2.1. Glicólise	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	50*	5
2203	Q16698	DECR	Mitocôndria	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	33.81	4
2204	P02743	SAMP	Secretada	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Serum amyloid P-component precursor	7.57	4
2205	P04792	HSPB1	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein)	11.02	7
2206	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
2207	P60709	ACTB	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin).	8.9	6
2208	NP	NP	NP	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	NP - Spot não presente no gel preparativo		
2209	P02511	CRYAB	Citoplasma	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Alpha crystallin B chain	7.58	4
2210	Q99497	PARK7	Núcleo	5. Sinalização Celular	Protein DJ-1	61*	4
2211	P30048	PRDX3	Mitocôndria	3. Resposta ao estresse e Apoptose	Peroxiredoxin-3	7.14	4

2212	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	58*	3
2213	P27144	KAD4	Mitocôndria	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	7.55	4
2214	NI	NI	NI	11. NI - Spot não identificado	NI - Spot não identificado		
2215	P17661	DESM	Citoplasma	1. Proteínas estruturais e contráteis	Desmin	64*	11
2216	P02144	MYG	Citoplasma	10. Outras funções	Myoglobin	9.96	6
2217	P36871	PGM1	Citoplasma	2.7. Outros processos metabólicos	Phosphoglucomutase-1	7.2	4
2218	P68032	ACTC	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	10.6	7
2219	P09493	TPM1	Citoesqueleto	1. Proteínas estruturais e contráteis	Tropomyosin-1 alpha chain	8.77	10
2220	P06732	KCRM	Citoplasma	2.4. Complexo Creatina Quinase	Creatine kinase M-type	11.93	8

Anexo E

Tabela I. “Spots” com **expressão aumentada** em CCC-M, CI-M e CDI-M em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
555	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	2.35	1.42	2.01
698	P51884	LUM	Lumican precursor	1. Proteínas estruturais e contráteis	2.68	1.92	2.3
801	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.44	1.44	1.81
915	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.95	1.77	2.92
1548	P19429	TNNI3	Troponin I, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.33	1.41	1.44
903	P06744	G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase	2.1. Glicólise	2.39	1.49	1.53
1558	P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	2.1. Glicólise	1.33	1.2	1.27
1563	P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	2.1. Glicólise	1.22	1.22	1.25
736	P31040	DHSA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	2.3	2.07	1.96
737	P31040	DHSA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	2.3	1.94	1.83
840	P30038	AL4A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.43	1.32	1.52
889	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.23	1.14	1.21
936	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.86	1.29	1.37
939	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.45	1.17	1.18

2188	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.61	1.29	1.44
921	P00367	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.5	1.16	1.29
924	Q02252	MMSA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.86	1.3	1.43
1489	P07339	CATD	Cathepsin D	2.7. Outros processos metabólicos	1.41	1.27	1.59
2170	Q16851	UGPA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7. Outros processos metabólicos	1.56	1.25	1.36
691	P38646	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.65	1.53	1.68
702	P38646	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.68	1.5	1.62
838	Q13114	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.7	1.35	1.85
710	P01024	CO3	Complement C3 precursor	4. Resposta Imune	2.44	1.65	2.25
914	P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	4. Resposta Imune	4.19	2	2.43
916	P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	4. Resposta Imune	5.09	2.07	2.7
927	P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	4. Resposta Imune	4.32	1.86	2.43
625	Q6ZNA5	FRRS1	Ferric-chelate reductase 1	7. Transporte	1.69	1.59	1.84
638	Q9H115	SNAB	Beta-soluble NSF attachment protein	7. Transporte	2.93	1.84	2.55
578	P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	8. Ligação ao cálcio	2.41	1.29	2.3
614	Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	10. Outras funções	1.29	1.16	1.28
619	Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	10. Outras funções	1.3	1.18	1.3
633	P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	10. Outras funções	2.84	1.82	2.6
634	P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	10. Outras funções	2.69	1.93	2.23
641	P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	10. Outras funções	3.46	2.35	3.17
731	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	2.45	1.92	2.01
735	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	2.48	2.29	2.03

904	Q9BSD4	YP016	Uncharacterized protein MGC16385	10. Outras funções	2.44	1.33	1.66
1632	P50461	CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein 3	10. Outras funções	2.26	2.09	2.34
697	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	2.21	1.54	1.94
835	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.4	1.39	1.57
951	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.62	1.23	1.39
1299	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.48	1.25	1.28
1513	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	2.17	1.28	1.49
1554	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.45	1.76	1.99
1880	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	2.47	2.18	1.81
588	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.48	1.32	1.45
590	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.35	1.29	1.37
591	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.44	1.4	1.45
604	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.34	1.2	1.34
725	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.79	2.04	2.28
729	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.29	1.87	1.88
732	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.47	1.8	1.96
911	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	3.35	1.71	1.92
922	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.85	1.31	1.51
1282	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.34	1.26	1.61
1588	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.02	1.6	1.8
1614	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.8	1.45	1.76

Tabela II. Proteínas com **expressão aumentada** em CCC-M e CI-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-M / N-MY	CI-M / N-MY	CDI-M / N-MY
1622	O75489	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.16	1.21	
1606	Q9NX63	CHCH3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	10. Outras funções	1.15	1.19	
901	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.6	1.26	
971	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.64	1.4	
1620	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.19	1.11	

Tabela III. Proteínas com **expressão aumentada** em CCC-M e CDI-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-M / N-MY	CI-M / N-MY	CDI-M / N-MY
554	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	2.16		1.76
559	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.63		1.48
560	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.85		1.62
561	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.74		1.54
701	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.82		1.8
871	Q9BQE3	TBA1C	Tubulin alpha-1C chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.81		1.92
894	P07437	TBB5	Tubulin beta-5 chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.76		1.76
895	P07437	TBB5	Tubulin beta-5 chain	1. Proteínas estruturais e	1.44		1.42

				contráteis			
2215	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.83		2.65
2186	P14618	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.1. Glicólise	1.34		1.2
1262	P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	1.15		1.24
888	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.41		1.34
890	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.21		1.22
793	Q16555	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	1.35		1.35
396	Q96BH1	RNF25	E3 ubiquitin-protein ligase	2.7. Outros processos metabólicos	1.6		1.53
906	P55809	SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.38		1.21
440	P14625	ENPL	Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	2.74		2.21
649	P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.64		1.64
653	P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	2		1.94
748	P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.45		1.4
847	P07237	PDIA1	Protein disulfide-isomerase precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose	2.01		1.78
874	P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.67		1.51
875	P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.64		1.48
2164	P07900	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.56		1.55
2187	P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.51		1.56
879	Q96AX9	MIB2	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	5. Sinalização Celular	1.32		1.29

1284	P04083	ANXA1	Annexin A1 (Annexin I)	5. Sinalização Celular	2.35		1.56
1424	P08758	ANXA5	Annexin A5 (Annexin V)	5. Sinalização Celular	2.49		1.83
1425	P08758	ANXA5	Annexin A5 (Annexin V)	5. Sinalização Celular	2.53		1.88
1523	P63104	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	5. Sinalização Celular	1.64		1.36
622	Q5TYW1	ZN658	Zinc finger protein 658	6. Controle da transcrição e tradução	1.59		1.53
2192	P49588	SYAC	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	6. Controle da transcrição e tradução	1.68		1.61
570	P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	8. Ligação ao cálcio	2.2		2.27
586	P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	8. Ligação ao cálcio	2.39		2.26
749	P00488	F13A	Coagulation factor XIII A chain	8. Ligação ao cálcio	1.41		1.41
1289	P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	8. Ligação ao cálcio	1.7		1.29
1321	P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	8. Ligação ao cálcio	1.62		1.35
632	Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	10. Outras funções	1.3		1.41
724	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	2.46		1.96
873	Q76G19	PDZD4	PDZ domain-containing protein 4	10. Outras funções	1.63		1.37
957	P28838	AMPL	Cytosol aminopeptidase	10. Outras funções	1.49		1.23
2195	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	2.38		1.91
558	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.55		1.4
708	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	2.62		2.13
864	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.63		1.34
872	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.62		1.45
883	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.64		1.59
925	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.58		1.34
1010	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.43		1.29
1518	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.71		1.41
1526	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	4.95		1.95

1535	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.55		1.26
1586	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.66		1.57
1621	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	3.75		2.5
1727	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.71		1.36
2168	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.16		1.26
434	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.5		1.46
694	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.03		2.14
726	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.22		1.81
727	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.19		1.72
779	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.29		1.21
842	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.96		1.47
928	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.36		1.18
952	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.41		1.21
2183	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.6		2.26
2191	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.45		1.46
2194	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.79		1.62

Tabela IV. Proteínas com **expressão aumentada** em CDI-M e CI-M em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
863	P14618	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.1. Glicólise		1.15	1.16

1565	P30084	ECHM	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		1.37	1.36
827	P27338	AOFB	Amine oxidase [flavin-containing] B	2.7. Outros processos metabólicos		1.61	1.56
976	Q8NFQ5	BPIL3	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3	10. Outras funções		1.17	1.19
1493	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.33	1.62
1608	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.21	1.21

Tabela V. Proteínas com **expressão aumentada** apenas em CCC-M em relação a N-MY

Index	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
989	P61158	ARP3	Actin-like protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.45		
1032	P06733	ENOA	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	2.1. Glicólise	1.36		
1292	P04406	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2.1. Glicólise	1.23		
1293	P04406	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2.1. Glicólise	1.27		
1272	P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	1.2		
2184	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.71		
2159	P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I precursor	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	1.91		
878	Q9HCC0	MCCB	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.22		
856	P04040	CATA	Catalase	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.48		
860	P04040	CATA	Catalase	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.22		
1770	Q9UBY9	HSPB7	Heat shock protein beta-7	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.5		
2190	O14763	TR10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.33		

1499	P17931	LEG3	Galectin-3	4. Resposta Imune	1.37		
1442	P51451	BLK	Tyrosine-protein kinase BLK	5. Sinalização Celular	1.86		
1495	P49588	SYAC	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	6. Controle da transcrição e tradução	1.66		
1288	P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	8. Ligação ao cálcio	1.7		
1511	Q06323	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1 (Interferon gamma up-regulated I-5111 protein)	9. Proteassoma	1.67		
805	A8MWA6	F90AM	Putative protein FAM90A22	10. Outras funções	1.26		
958	P28838	AMPL	Cytosol aminopeptidase	10. Outras funções	1.27		
919	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.43		
1011	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.34		
1266	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.29		
1304	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.19		
608	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.27		
643	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.31		
935	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.61		
956	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.35		
1826	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.48		

Tabela VI. Proteínas com **expressão aumentada** apenas em CI-M em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
595	Q99798	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	2.2. Ciclo de Krebs		1.17	
599	Q99798	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	2.2. Ciclo de Krebs		1.16	

605	Q99798	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	2.2. Ciclo de Krebs		1.17	
581	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.22	
1414	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.22	
1433	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.26	

Tabela VII. Proteínas com **expressão aumentada** apenas em CDI-M em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
400	P18206	VINC	Vinculin (Metavinculin)	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.48
404	P18206	VINC	Vinculin (Metavinculin)	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.3
817	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.61
934	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.87
937	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.35
1278	O00151	PDLI1	PDZ and LIM domain protein 1	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.3
2182	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.94
862	P14618	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.1. Glicólise			1.14
953	P36957	ODO2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2- oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs			1.15
1387	O75208	COQ9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos			1.22
2196	P55809	SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos			1.35

719	P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).	3. Resposta ao estresse e Apoptose			1.26
723	P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).	3. Resposta ao estresse e Apoptose			1.21
751	P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1	3. Resposta ao estresse e Apoptose			1.38
828	Q13114	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	3. Resposta ao estresse e Apoptose			1.24
2204	P02743	SAMP	Serum amyloid P-component precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose			1.53
848	Q13325	IFIT5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	4. Resposta Imune			1.55
2189	P01024	CO3	Complement C3 precursor	4. Resposta Imune			1.52
540	Q96GE5	ZN799	Zinc finger protein 799	6. Controle da transcrição e tradução			1.79
461	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado			1.22
466	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado			1.17
553	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado			1.29
907	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado			1.38
537	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.45
592	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.25
859	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.28
1257	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.66
1596	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.52
1628	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.27

Anexo F

Tabela I. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-M, CI-M e CDI-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-M / N-MY	CI-M / N-MY	CDI-M / N-MY
507	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.72	-1.44	-1.46
508	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.96	-1.53	-1.6
511	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-2.18	-1.6	-1.77
515	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-2.31	-1.66	-1.86
516	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.96	-1.54	-1.6
656	P12883	MYH7	Myosin-7 (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-2.2	-2.56	-2.76
1683	P19404	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.29	-1.12	-1.35
1693	P24539	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.59	-1.37	-1.32
1160	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.75	-1.26	-1.81
2220	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.82	-1.3	-1.93
1211	P17174	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2.7. Outros processos metabólicos	-1.4	-1.22	-1.35
1214	P17174	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2.7. Outros processos metabólicos	-1.37	-1.24	-1.4

Tabela II. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-M e CI-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-M / N-MY	CI-M / N-MY	CDI-M / N-MY
596	P35609	ACTN2	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.74	-1.76	
2218	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.15	-1.09	
2166	P42126	D3D2	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.35	-1.24	

Tabela III. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-M e CDI-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-M / N-MY	CI-M / N-MY	CDI-M / N-MY
1135	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.3		-1.24
1136	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.33		-1.29
1146	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.35		-1.35
1151	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.32		-1.34
1153	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.29		-1.27
1316	P45379	TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.65		-1.58
1383	Q16352	AINX	Alpha-internexin	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.32		-1.36
1681	P08670	VIME	Vimentin	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.29		-1.28
1682	P08590	MYL3	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.26		-1.2
1710	P08590	MYL3	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.19		-1.24

2177	P10916	MLRV	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.28		-1.35
616	P08237	K6PF	6-phosphofructokinase, muscle type	2.1. Glicólise	-1.27		-1.25
1041	P13929	ENOB	Beta-enolase (Skeletal muscle enolase)	2.1. Glicólise	-1.66		-1.59
1194	P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	2.1. Glicólise	-1.31		-1.26
1366	P40925	MDHC	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2.1. Glicólise	-1.31		-1.26
1546	P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	2.1. Glicólise	-1.79		-1.89
1547	P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	2.1. Glicólise	-1.65		-1.69
2199	P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	2.1. Glicólise	-1.22		-1.24
1033	P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.38		-1.4
1060	P07954	FUMH	Fumarate hydratase, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.47		-1.34
1065	P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.3		-1.32
1067	P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.27		-1.27
2172	P21912	DHSB	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.55		-1.53
1003	P49821	NDUV1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.4		-1.3
1232	O95299	NDUAA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.28		-1.29
2158	P31930	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.23		-1.17
2167	P22695	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.36		-1.32
1651	P24539	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.43		-1.33
1731	O75947	ATP5H	ATP synthase D chain, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.26		-1.23
1156	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.72		-1.85
1158	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.8		-1.9
1161	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina	-1.48		-1.44

				Quinase			
1421	Q16698	DECR	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.47		-1.34
2197	P11310	ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.34		-1.22
615	P13010	KU86	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	-1.53		-1.52
1174	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos	-1.24		-1.25
1183	P24752	THIL	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	-1.28		-1.21
1445	P31751	AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	2.7. Outros processos metabólicos	-4.4		-3.67
1669	P30043	BLVRB	Flavin reductase	2.7. Outros processos metabólicos	-1.44		-1.46
1713	P00568	KAD1	Adenylate kinase isoenzyme 1	2.7. Outros processos metabólicos	-1.47		-1.26
1617	P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.2		-1.22
1701	Q96FI4	NEIL1	Endonuclease VIII-like 1	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.43		-1.37
1729	P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.16		-1.17
2211	P30048	PRDX3	Peroxiredoxin-3	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.15		-1.13
601	P49674	KC1E	Casein kinase I isoform epsilon	5. Sinalização Celular	-1.56		-1.43
1040	O75822	EIF3J	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	6. Controle da transcrição e tradução	-1.27		-1.22
1241	Q15056	IF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H	6. Controle da transcrição e tradução	-1.33		-1.27
1543	P55851	UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2	7. Transporte	-1.9		-2.3
617	Q9H223	EHD4	EH domain-containing protein 4	8. Ligação ao cálcio	-1.44		-1.45
556	Q96N16	JKIP1	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	10. Outras funções	-1.9		-1.95
607	Q8WWW8	GAB3	GRB2-associated-binding protein 3	10. Outras funções	-1.33		-1.44

1541	Q96P53	WDFY2	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2	10. Outras funções	-1.32		-1.38
1724	P30086	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	10. Outras funções	-1.17		-1.19
980	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.25		-1.24
1048	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.26		-1.24
1210	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.26		-1.25
1402	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.36		-1.26
1572	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.4		-1.66
1661	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-3.35		-2.5
1702	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.29		-1.36
1792	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.35		-1.28
2173	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-2.24		-2.37
2214	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.33		-1.22
585	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.61		-1.48
602	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.4		-1.41
1141	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.24		-1.24
1142	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.26		-1.22
1423	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.24		-1.24
1648	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.37		-1.27
1659	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.32		-1.31
1747	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.29		-1.23

Tabela IV. Proteínas com **expressão reduzida** em CI-M e CDI-M em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
1707	P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	2.7. Outros processos		-1.13	-1.15

				metabólicos			
659	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-2.13	-2.25

Tabela V. Proteínas com **expressão reduzida** apenas em CCC-M em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
1116	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.29		
1154	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.21		
1200	Q9UJZ1	STML2	Stomatin-like protein 2	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.42		
1595	P62736	ACTA	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-3.37		
1598	P12829	MYL4	Myosin light polypeptide 4 (Myosin light chain 1, embryonic muscle/atrial isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-2.38		
2219	P09493	TPM1	Tropomyosin-1 alpha chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.21		
1341	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1. Glicólise	-1.28		
1347	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1. Glicólise	-1.22		
1355	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1. Glicólise	-1.23		
646	P28331	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.25		
648	P28331	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.25		
999	P49821	NDUV1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.42		
1050	P31930	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.18		
2180	P17540	KCRS	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.25		
780	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase,	2.5. Metabolismo de lipídeos /	-1.52		

			mitochondrial	Beta-oxidação			
781	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.51		
796	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.36		
1095	P42765	THIM	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.29		
1378	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.31		
1379	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.28		
1382	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.25		
1407	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.47		
1331	P22626	ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	-1.27		
2205	P04792	HSPB1	Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.13		
682	Q5T5P2	SKT	Sickle tail protein homolog	10. Outras funções	-1.32		
1365	P23276	KELL	Kell blood group glycoprotein	10. Outras funções	-1.21		
1832	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.86		
2212	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.61		
1054	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.41		
1443	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.43		
1557	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-2.03		
1867	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-4.41		
1043	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.64		
1306	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.21		
1335	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.22		
1663	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.98		

2208	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.15		

Tabela VI. Proteínas com **expressão reduzida** apenas em CI-M em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
1662	Q9ULI4	KI26A	Kinesin-like protein KIF26A	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.92	
1357	A6NNV3	W19L5	Putative WBSCR19-like protein 5	10. Outras funções		-1.4	
818	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.37	
1512	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.48	

Tabela VII. Proteínas com **expressão reduzida** apenas em CDI-M em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-M / N-MY**	**CI-M / N-MY**	**CDI-M / N-MY**
1297	P47755	CAZA2	F-actin capping protein subunit alpha-2 (CapZ alpha-2).	1. Proteínas estruturais e contráteis			-1.12
1384	Q9NPC6	MYOZ2	Myozenin-2	1. Proteínas estruturais e contráteis			-1.19
2175	P10916	MLRV	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	1. Proteínas estruturais e contráteis			-1.46
2176	P10916	MLRV	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	1. Proteínas estruturais e contráteis			-1.45
1610	P60174	TPIS	Triosephosphate isomerase	2.1. Glicólise			-1.11
1883	Q9P0J0	NDUAD	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons			-1.25
1077	P17540	KCRS	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	2.4. Complexo Creatina Quinase			-1.3
1415	Q16698	DECR	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação			-1.26

1189	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos			-1.2
1652	P28161	GSTM2	Glutathione S-transferase Mu 2	2.7. Outros processos metabólicos			-1.22
1613	P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	3. Resposta ao estresse e Apoptose			-1.16
1618	P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	3. Resposta ao estresse e Apoptose			-1.19
2209	P02511	CRYAB	Alpha crystallin B chain	3. Resposta ao estresse e Apoptose			-1.39
1246	P63218	GBG5	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	5. Sinalização Celular			-1.69
949	Q6P2E9	EDC4	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	6. Controle da transcrição e tradução			-1.24
1824	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções			-1.23
2181	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções			-1.31
2216	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções			-1.29
1684	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.14
1688	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.14
1869	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.22
1769	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-1.85

Anexo G

Tabela I. Proteínas com **expressão aumentada** em CCC-F, CCC-M e CCC-MY em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-F / N-MY	CCC-M / N-MY	CCC-MY / N-MY
554	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.67	1.6	1.67
555	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.75	2.74	2.92
559	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.65	2.16	2.19
560	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.73	2.35	2.55
561	P06396	GELS	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.66	1.55	1.67
698	P51884	LUM	Lumican precursor	1. Proteínas estruturais e contráteis	2.27	1.63	1.62
701	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.76	1.85	1.67
801	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.61	1.74	1.53
871	Q9BQE3	TBA1C	Tubulin alpha-1C chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.79	2.2	2.68
894	P07437	TBB5	Tubulin beta-5 chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.66	2.41	2.83
895	P07437	TBB5	Tubulin beta-5 chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.45	2.39	2.86
915	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	2.13	1.48	1.29
2215	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.91	1.44	1.33
903	P06744	G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase	2.1. Glicólise	1.92	2.39	1.73

1558	P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	2.1. Glicólise	1.35	2.44	1.8
1563	P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	2.1. Glicólise	1.22	4.19	3.37
840	P30038	AL4A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.56	1.95	2.77
889	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.15	5.09	3.38
890	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.17	1.62	1.34
2188	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.58	1.43	1.33
793	Q16555	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	1.43	1.34	1.21
396	Q96BH1	RNF25	E3 ubiquitin-protein ligase	2.7. Outros processos metabólicos	1.63	2.34	1.81
1489	P07339	CATD	Cathepsin D	2.7. Outros processos metabólicos	1.51	2.35	1.89
2170	Q16851	UGPA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7. Outros processos metabólicos	1.34	2.49	2.12
440	P14625	ENPL	Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	2.16	2.53	2.25
649	P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.75	1.41	1.38
653	P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	2.14	2.17	1.54
691	P38646	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.76	1.71	1.6
702	P38646	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.8	1.64	1.45
838	Q13114	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.66	1.55	1.38
847	P07237	PDIA1	Protein disulfide-isomerase precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose	2.1	1.45	1.8
874	P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.92	1.33	1.31
875	P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	3. Resposta ao estresse e	1.82	1.22	1.19

				Apoptose			
1770	Q9UBY9	HSPB7	Heat shock protein beta-7	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.48	1.66	1.44
2164	P07900	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.72	2.02	1.79
2187	P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.55	1.8	1.73
710	P01024	CO3	Complement C3 precursor	4. Resposta Imune	2.12	2.26	2.59
914	P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	4. Resposta Imune	4.62	1.5	2.15
916	P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	4. Resposta Imune	4.26	1.48	1.63
1284	P04083	ANXA1	Annexin A1 (Annexin I)	5. Sinalização Celular	2.24	1.56	1.68
1424	P08758	ANXA5	Annexin A5 (Annexin V)	5. Sinalização Celular	1.85	1.16	1.31
1425	P08758	ANXA5	Annexin A5 (Annexin V)	5. Sinalização Celular	2.03	1.56	1.26
1523	P63104	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	5. Sinalização Celular	1.52	1.6	2.2
625	Q6ZNA5	FRRS1	Ferric-chelate reductase 1	7. Transporte	1.58	1.51	1.35
638	Q9H115	SNAB	Beta-soluble NSF attachment protein	7. Transporte	2.21	1.61	1.41
570	P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	8. Ligação ao cálcio	1.59	1.79	1.89
578	P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	8. Ligação ao cálcio	1.64	2.38	1.92
586	P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	8. Ligação ao cálcio	1.7	1.83	2.52
614	Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	10. Outras funções	1.23	1.34	1.2
619	Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	10. Outras funções	1.21	1.29	1.16
632	Q16891	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	10. Outras funções	1.32	1.3	1.16
634	P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	10. Outras funções	2.34	1.69	1.77
641	P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	10. Outras funções	2.74	1.3	1.4
724	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	2.18	2.69	3.64
731	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	2.04	2.93	2.19
904	Q9BSD4	YP016	Uncharacterized protein MGC16385	10. Outras funções	2.08	3.46	3.13

1632	P50461	CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein 3	10. Outras funções	3.03	1.64	1.46
2195	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções	1.94	2	1.87
558	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.53	1.65	1.56
697	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.98	2.21	2.44
864	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.56	2.68	3.09
872	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.72	1.82	2.06
883	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.78	1.68	1.5
951	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.51	2.44	3.04
1010	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.32	2.46	2.18
1011	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.37	2.79	2.13
1513	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.5	2.45	1.98
1518	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.7	2.47	2.02
1535	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.52	1.35	1.6
1554	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.53	1.44	1.91
1586	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.84	1.7	1.68
2168	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.32	1.43	1.41
588	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.3	1.96	1.82
591	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.23	2.01	2.03
604	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.29	1.63	1.41
725	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.4	1.81	1.87
732	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.23	1.62	1.47
842	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.67	1.67	1.58
1282	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.94	1.64	1.5

1588	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.06	1.64	1.51
1614	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.84	1.23	1.14
1826	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.63	1.21	1.21
2183	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.71	1.76	1.9
2194	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	2.35	1.44	1.53

Tabela II. Proteínas com **expressão aumentada** em CCC-F e CCC-M em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
989	P61158	ARP3	Actin-like protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.62	1.5	
936	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.65	1.86	
939	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.28	1.45	
2184	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.32	1.41	
888	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.38	1.49	
737	P31040	DHSA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.82	1.64	
921	P00367	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.36	1.45	
924	Q02252	MMSA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.63	1.66	
906	P55809	SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.43	1.67	
927	P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region.	4. Resposta Imune	3.37	1.15	
1495	P49588	SYAC	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	6. Controle da transcrição e	1.71	1.19	

				tradução			
622	Q5TYW1	ZN658	Zinc finger protein 658	6. Controle da transcrição e tradução	1.35	3.75	
1511	Q06323	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1 (Interferon gamma up-regulated I-5111 protein)	9. Proteassoma	1.8	1.71	
1606	Q9NX63	CHCH3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	10. Outras funções	1.14	1.59	
957	P28838	AMPL	Cytosol aminopeptidase	10. Outras funções	1.49	2.84	
873	Q76G19	PDZD4	PDZ domain-containing protein 4	10. Outras funções	1.48	2.3	
633	P02787	TRFE	Serotransferrin precursor (Transferrin)	10. Outras funções	2.15	1.63	
925	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.42	1.41	
971	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.32	1.38	
1620	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.16	3.35	
1621	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	3.67	1.5	
434	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.58	1.85	
911	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	4.56	1.86	
922	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.63	1.58	
928	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.2	4.32	
935	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.34	1.36	
952	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.38	1.61	

Tabela III. Proteínas com **expressão aumentada** em CCC-M e CCC-MY em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
736	P31040	DHSA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons		1.7	1.44
2159	P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I precursor	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		1.48	1.27
748	P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1	3. Resposta ao estresse e Apoptose		1.62	1.5
2192	P49588	SYAC	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	6. Controle da transcrição e tradução		4.95	1.61
1288	P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	8. Ligação ao cálcio		1.71	1.63
1289	P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	8. Ligação ao cálcio		2.47	2.18
1321	P07355	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II)	8. Ligação ao cálcio		1.91	1.79
749	P00488	F13A	Coagulation factor XIII A chain	8. Ligação ao cálcio		1.68	1.83
708	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.35	1.23
835	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		2.27	3.35
1299	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		2.31	3.56
1526	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		2.62	3.18
1727	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		2.29	1.87
1880	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		2.3	1.96
590	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.45	1.46
608	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.41	1.54
643	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.4	1.64
729	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.7	1.47

Tabela IV. Proteínas com **expressão aumentada** em CCC-F e CCC-MY em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
400	P18206	VINC	Vinculin (Metavinculin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.57		1.71
404	P18206	VINC	Vinculin (Metavinculin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.42		1.54
817	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.85		2.83
934	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.4		1.52
1278	O00151	PDLI1	PDZ and LIM domain protein 1	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.34		1.23
2182	P17661	DESM	Desmin	1. Proteínas estruturais e contráteis	1.34		1.22
719	P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.61		1.73
723	P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8).	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.42		1.28
751	P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.3		1.4
1475	P62258	1433E	14-3-3 protein epsilon	5. Sinalização Celular	1.41		1.33
1012	P14316	IRF2	Interferon regulatory factor 2	6. Controle da transcrição e tradução	1.49		1.88
553	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.49		1.36
907	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.4		1.66
537	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.34		1.34
859	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.56		1.25

Tabela V. Proteínas com **expressão aumentada** apenas em CCC-F em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
2174	P09622	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	1.27		
2196	P55809	SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos	1.36		
828	Q13114	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.33		
845	P10809	CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	3. Resposta ao estresse e Apoptose	1.22		
1509	P61981	1433G	14-3-3 protein gamma	5. Sinalização Celular	1.54		
976	Q8NFQ5	BPIL3	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3	10. Outras funções	1.37		
1357	A6NNV3	W19L5	Putative WBSCR19-like protein 5	10. Outras funções	1.32		
1317	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.25		
1493	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.23		
1507	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.54		
1608	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.44		
1791	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado	1.43		
899	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.14		
1510	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.25		
1639	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo	1.57		

Tabela VI. Proteínas com **expressão aumentada** apenas em CCC-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-F / N-MY	CCC-M / N-MY	CCC-MY / N-MY
1548	P19429	TNNI3	Troponin I, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis		2.03	
1032	P06733	ENOA	Alpha-enolase (Non- neural enolase)	2.1. Glicólise		1.36	
1292	P04406	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2.1. Glicólise		1.15	
1293	P04406	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2.1. Glicólise		1.29	
2186	P14618	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.1. Glicólise		1.2	
1262	P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs		1.23	
1272	P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs		1.27	
1622	O75489	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons		1.19	
878	Q9HCC0	MCCB	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos		1.86	
856	P04040	CATA	Catalase	3. Resposta ao estresse e Apoptose		1.37	
860	P04040	CATA	Catalase	3. Resposta ao estresse e Apoptose		1.33	
2190	O14763	TR10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	3. Resposta ao estresse e Apoptose		1.16	
1499	P17931	LEG3	Galectin-3	4. Resposta Imune		1.34	
879	Q96AX9	MIB2	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	5. Sinalização Celular		1.33	
1442	P51451	BLK	Tyrosine-protein kinase BLK	5. Sinalização Celular		1.45	
735	P02768	ALBU	Serum albumin precursor	10. Outras funções		2.22	
805	A8MWA6	F90AM	Putative protein FAM90A22	10. Outras funções		2.19	
958	P28838	AMPL	Cytosol aminopeptidase	10. Outras funções		2.48	
901	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.29	

919	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.26	
1266	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.48	
1304	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado		1.22	
694	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.22	
726	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.32	
727	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.6	
779	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.43	
956	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.35	
2191	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo		1.27	

Tabela VII. Proteínas com **expressão aumentada** apenas em CCC-MY em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
1388	Q6WCQ1	MPRIP	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.46
2171	P35609	ACTN2	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	1. Proteínas estruturais e contráteis			1.37
862	P14618	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.1. Glicólise			1.12
1290	Q14894	CRYM	Mu-crystallin homolog	2.7. Outros processos metabólicos			1.58
1387	O75208	COQ9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos			1.58
2204	P02743	SAMP	Serum amyloid P-component precursor	3. Resposta ao estresse e Apoptose			1.6
848	Q13325	IFIT5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	4. Resposta Imune			1.69

1298	Q6P3V2	Z585A	Zinc finger protein 585A	6. Controle da transcrição e tradução			1.64
1247	Q68D91	MBLC2	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	10. Outras funções			1.5
654	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado			1.54
1311	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI - Spot não identificado			1.15
439	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.55
762	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			2.48
1435	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.4
1596	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.8
1628	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP - Spot não presente no gel preparativo			1.61

Anexo H

Tabela I. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-F, CCC-M e CCC-MY em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-F / N-MY	CCC-M / N-MY	CCC-MY / N-MY
511	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.43	-2.18	-1.85
515	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.52	-2.31	-1.94
1135	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.4	-1.3	-1.25
1136	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.41	-1.33	-1.26
1146	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.49	-1.35	-1.35
1151	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.44	-1.32	-1.41
1153	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.4	-1.29	-1.23
1154	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.31	-1.21	-1.22
1383	Q16352	AINX	Alpha-internexin	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.5	-1.32	-1.33
1681	P08670	VIME	Vimentin	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.29	-1.29	-1.29
616	P08237	K6PF	6-phosphofructokinase, muscle type	2.1. Glicólise	-1.46	-1.27	-1.35
1194	P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	2.1. Glicólise	-1.24	-1.31	-1.34
1366	P40925	MDHC	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2.1. Glicólise	-1.32	-1.31	-1.32
1546	P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	2.1. Glicólise	-1.97	-1.79	-1.99
1547	P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	2.1. Glicólise	-1.73	-1.65	-1.78

2199	P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase)	2.1. Glicólise	-1.39	-1.22	-1.4
1033	P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.63	-1.38	-1.65
1060	P07954	FUMH	Fumarate hydratase, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.32	-1.47	-1.32
1065	P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.42	-1.3	-1.4
1067	P48735	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.36	-1.27	-1.38
2172	P21912	DHSB	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	2.2. Ciclo de Krebs	-1.53	-1.55	-1.67
1232	O95299	NDUAA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.3	-1.28	-1.3
1683	P19404	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.26	-1.29	-1.22
2158	P31930	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.27	-1.23	-1.23
2167	P22695	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.41	-1.36	-1.82
1651	P24539	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.52	-1.43	-1.46
1731	O75947	ATP5H	ATP synthase D chain, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.31	-1.26	-1.34
1156	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-2.45	-1.72	-1.99
1158	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-2.37	-1.8	-2.04
1160	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-2.26	-1.75	-1.98
2220	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-2.33	-1.82	-1.98
781	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.42	-1.51	-1.28
1095	P42765	THIM	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.29	-1.29	-1.27
2197	P11310	ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.5	-1.34	-1.42
615	P13010	KU86	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos	-1.64	-1.53	-1.57

				nucleicos			
1331	P22626	ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos	-1.23	-1.27	-1.29
1174	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos	-1.16	-1.24	-1.33
1211	P17174	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2.7. Outros processos metabólicos	-1.43	-1.4	-1.38
1214	P17174	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2.7. Outros processos metabólicos	-1.5	-1.37	-1.45
1617	P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.18	-1.2	-1.26
1701	Q96FI4	NEIL1	Endonuclease VIII-like 1	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.33	-1.43	-1.35
1543	P55851	UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2	7. Transporte	-2.05	-1.9	-2.23
617	Q9H223	EHD4	EH domain-containing protein 4	8. Ligação ao cálcio	-1.71	-1.44	-1.53
1541	Q96P53	WDFY2	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2	10. Outras funções	-1.4	-1.32	-1.39
980	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.33	-1.25	-1.33
1048	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.38	-1.26	-1.38
1210	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.39	-1.26	-1.33
1572	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.49	-1.4	-1.67
1792	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.4	-1.35	-1.35
2173	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-2.08	-2.24	-2.57
2214	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.31	-1.33	-1.34
1141	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.33	-1.24	-1.23
1142	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.35	-1.26	-1.24
1648	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.36	-1.37	-1.4
1659	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.32	-1.32	-1.49
1747	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.31	-1.29	-1.35

Tabela II. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-F e CCC-M em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
1598	P12829	MYL4	Myosin light polypeptide 4 (Myosin light chain 1, embryonic muscle/atrial isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-3.55	-2.38	
2218	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.18	-1.15	
2219	P09493	TPM1	Tropomyosin-1 alpha chain	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.24	-1.21	
1003	P49821	NDUV1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.39	-1.4	
1050	P31930	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.26	-1.18	
1693	P24539	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.47	-1.59	
1161	P06732	KCRM	Creatine kinase M-type	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.53	-1.48	
780	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.39	-1.52	
796	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.48	-1.36	
1713	P00568	KAD1	Adenylate kinase isoenzyme 1	2.7. Outros processos metabólicos	-1.35	-1.47	
1729	P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	3. Resposta ao estresse e Apoptose	-1.28	-1.16	
601	P49674	KC1E	Casein kinase I isoform epsilon	5. Sinalização Celular	-1.42	-1.56	
1040	O75822	EIF3J	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	6. Controle da transcrição e tradução	-1.49	-1.27	
1365	P23276	KELL	Kell blood group glycoprotein	10. Outras funções	-1.35	-1.21	
1724	P30086	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	10. Outras funções	-1.15	-1.17	
1832	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.71	-1.86	
2212	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.49	-1.61	
1054	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.58	-1.41	

1702	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.33	-1.29	
585	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.63	-1.61	
602	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.42	-1.4	
1306	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.36	-1.21	

Tabela III. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-M e CCC-MY em relação a N-MY

"Spot"	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
507	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.72	-1.53
508	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.96	-1.7
516	O75112	LDB3	LIM domain-binding protein 3	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.96	-1.66
596	P35609	ACTN2	Alpha-actinin-2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2)	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.74	-2.28
656	P12883	MYH7	Myosin-7 (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis		-2.2	-4.09
1200	Q9UJZ1	STML2	Stomatin-like protein 2	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.42	-1.39
1595	P62736	ACTA	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	1. Proteínas estruturais e contráteis		-3.37	-4.61
1682	P08590	MYL3	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.26	-1.17
1041	P13929	ENOB	Beta-enolase (Skeletal muscle enolase)	2.1. Glicólise		-1.66	-1.47
1355	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1. Glicólise		-1.23	-1.26
646	P28331	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons		-1.25	-1.3
2180	P17540	KCRS	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	2.4. Complexo Creatina Quinase		-1.25	-1.32
1378	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		-1.31	-1.35

1379	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		-1.28	-1.37
1382	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		-1.25	-1.33
1407	Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		-1.47	-1.67
1421	Q16698	DECR	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		-1.47	-1.44
1183	P24752	THIL	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	2.7. Outros processos metabólicos		-1.28	-1.23
1445	P31751	AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	2.7. Outros processos metabólicos		-4.4	-5.05
1669	P30043	BLVRB	Flavin reductase	2.7. Outros processos metabólicos		-1.44	-1.51
1241	Q15056	IF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H	6. Controle da transcrição e tradução		-1.33	-1.33
556	Q96N16	JKIP1	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	10. Outras funções		-1.9	-2.48
682	Q5T5P2	SKT	Sickle tail protein homolog	10. Outras funções		-1.32	-1.33
1402	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI		-1.36	-1.69
1661	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI		-3.35	-3.89
1867	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI		-4.41	-6.43
1043	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.64	-1.5
1423	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.24	-1.31
1663	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.98	-2.08

Tabela IV. Proteínas com **expressão reduzida** em CCC-F e CCC-MY em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
1610	P60174	TPIS	Triosephosphate isomerase	2.1. Glicólise	-1.11		-1.09
966	P06576	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e	-1.35		-1.33

				Transporte de elétrons			
1080	P17540	KCRS	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	2.4. Complexo Creatina Quinase	-1.32		-1.31
789	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.61		-1.31
797	P49748	ACADV	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.48		-1.31
1176	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos	-1.17		-1.26
1189	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos	-1.21		-1.16
1652	P28161	GSTM2	Glutathione S-transferase Mu 2	2.7. Outros processos metabólicos	-1.3		-1.28
674	Q96MP8	KCTD7	BTB/POZ domain-containing protein KCTD7	7. Transporte	-1.57		-1.53
1824	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.28		-1.19
795	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.46		-1.33
1715	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.38		-1.46

Tabela V. Proteínas com **expressão reduzida** apenas em CCC-F em relação a N-MY

“Spot”	**N. Acesso**	**Sigla**	**Nome**	**Função**	**CCC-F / N-MY**	**CCC-M / N-MY**	**CCC-MY / N-MY**
1199	P45379	TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.58		
1205	Q99471	PFD5	Prefoldin subunit 5	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.45		
1208	P45379	TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.4		
1297	P47755	CAZA2	F-actin capping protein subunit alpha-2 (CapZ alpha-2).	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.17		
1384	Q9NPC6	MYOZ2	Myozenin-2	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.23		
2165	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e	-1.2		

				contráteis			
2178	P10916	MLRV	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	1. Proteínas estruturais e contráteis	-1.24		
2161	P07195	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	2.1. Glicólise	-1.37		
2201	P07195	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	2.1. Glicólise	-1.36		
2202	P40925	MDHC	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2.1. Glicólise	-1.3		
644	P28331	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons	-1.33		
1099	P42765	THIM	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.32		
2203	Q16698	DECR	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação	-1.48		
1207	P17174	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2.7. Outros processos metabólicos	-1.24		
1237	P58499	FAM3B	Protein FAM3B	10. Outras funções	-1.24		
1800	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.7		
2181	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.23		
2216	P02144	MYG	Myoglobin	10. Outras funções	-1.26		
1267	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.35		
1309	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.26		
1381	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.21		
1725	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.44		
1756	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.21		
1870	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.24		
2160	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI	-1.25		
802	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP	-1.37		

Tabela VI. Proteínas com **expressão reduzida** apenas em CCC-M em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-F / N-MY	CCC-M / N-MY	CCC-MY / N-MY
1116	P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.29	
1316	P45379	TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.65	
1710	P08590	MYL3	Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.19	
2177	P10916	MLRV	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	1. Proteínas estruturais e contráteis		-1.28	
1341	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1. Glicólise		-1.28	
1347	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1. Glicólise		-1.22	
648	P28331	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons		-1.25	
999	P49821	NDUV1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	2.3 Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons		-1.42	
2166	P42126	D3D2	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação		-1.35	
2205	P04792	HSPB1	Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein)	3. Resposta ao estresse e Apoptose		-1.13	
2211	P30048	PRDX3	Peroxiredoxin-3	3. Resposta ao estresse e Apoptose		-1.15	
607	Q8WWW8	GAB3	GRB2-associated-binding protein 3	10. Outras funções		-1.33	
1443	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI		-1.43	
1557	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI		-2.03	
1335	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.22	
2208	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP		-1.15	

Tabela VII. Proteínas com **expressão reduzida** apenas em CCC-MY em relação a N-MY

"Spot"	N. Acesso	Sigla	Nome	Função	CCC-F / N-MY	CCC-M / N-MY	CCC-MY / N-MY
766	P12883	MYH7	Myosin-7 (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	1. Proteínas estruturais e contráteis			-2.36
1215	P45379	TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	1. Proteínas estruturais e contráteis			-1.56
959	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons			-1.13
1666	P24539	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons			-1.37
2185	P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2.3. Fosforilação oxidativa e Transporte de elétrons			-1.2
1077	P17540	KCRS	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	2.4. Complexo Creatina Quinase			-1.42
1415	Q16698	DECR	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2.5. Metabolismo de lipídeos / Beta-oxidação			-1.3
1358	P22626	ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2.6. Metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos			-1.35
1165	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos			-1.21
1167	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos			-1.15
1179	P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	2.7. Outros processos metabólicos			-1.25
1618	P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	3. Resposta ao estresse e Apoptose			-1.18
788	P42345	FRAP	Serine/threonine-protein kinase mTOR	5. Sinalização Celular			-1.64
893	P42345	FRAP	Serine/threonine-protein kinase mTOR	5. Sinalização Celular			-2
949	Q6P2E9	EDC4	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	6. Controle da transcrição e tradução			-1.31
950	Q86TD4	SRCA	Sarcalumenin	8. Ligação ao cálcio			-1.22
798	Q0VD86	INCA1	Protein INCA1	10. Outras funções			-1.98

1037	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.11
1280	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.36
1392	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.44
1534	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.24
1653	NI	NI	NI - Spot não identificado	11. NI			-1.14
587	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-1.55
657	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-1.44
659	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-3.08
803	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-1.97
897	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-1.62
1361	NP	NP	NP - Spot não presente no gel preparativo	12. NP			-1.45

8. Referências Bibliográficas

1. Libby P, Braunwald E. Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine. 8th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008.

2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol2006 Dec;22(12):583-8.

3. Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation1956 Dec;14(6):1035-60.

4. Dias JC. [Epidemiological surveillance of Chagas disease]. Cad Saude Publica2000;16 Suppl 2:43-59.

5. Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. Clin Cardiol2000 Dec;23(12):883-9.

6. Parada H, Carrasco HA, Anez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol1997 Jun 27;60(1):49-54.

7. Andrade ZA. Mechanisms of myocardial damage in Trypanosoma cruzi infection. Ciba Found Symp1983;99:214-33.

8. Macedo V, Prata A, da Silva GR, Castilho E. [Prevalence of electrocardiographic changes in Chagas' disease patients (preliminary information about the National Electrocardiographic survey]. Arq Bras Cardiol1982 Apr;38(4):261-4.

9. Andrade ZA. Pathogenesis of Chagas' disease. Res Immunol1991 Feb;142(2):126-9.

10. Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. Circulation1994 Dec;90(6):3098-102.

11. Nogueira EA, Ueti OM, Vieira WR. The apical ventricular lesion in Chagas' heart disease. Sao Paulo Med J1995 Mar-Apr;113(2):785-90.

12. Acquatella H, Schiller NB, Puigbo JJ, Giordano H, Suarez JA, Casal H, et al. M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chages' heart disease. A clinical and pathologic study. Circulation1980 Oct;62(4):787-99.

13. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. Adv Parasitol1968;6:63-116.

14. Oliveira JS, Mello De Oliveira JA, Frederigue U, Jr., Lima Filho EC. Apical aneurysm of Chagas's heart disease. Br Heart J1981 Oct;46(4):432-7.

15. Samuel J, Oliveira M, Correa De Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. Am J Cardiol1983 Jul;52(1):147-51.

16. Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. Int J Cardiol1991 Mar;30(3):335-40.

17. Higuchi ML, Fukasawa S, De Brito T, Parzianello LC, Bellotti G, Ramires JA. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. Heart1999 Sep;82(3):279-85.

18. Bocchi EA. [Update on indications and results of the surgical treatment of heart failure]. Arq Bras Cardiol1994 Dec;63(6):523-30.

19. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol1997 Jul 25;60(2):187-93.

20. Teixeira AR, Cunha Neto E, Rizzo LV, Silva R. Trypanocidal nitroarene treatment of experimental Trypanosoma cruzi infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. J Infect Dis1990 Dec;162(6):1420.

21. Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML, et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. Am Heart J1986 Feb;111(2):307-12.

22. Higuchi ML, De Morais CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. Clin Cardiol1987 Nov;10(11):665-70.

23. Milei J, Storino R, Fernandez Alonso G, Beigelman R, Vanzulli S, Ferrans VJ. Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings. Cardiology1992;80(5-6):424-37.

24. Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic

myocarditis: comparison with myocardial rejection process. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol1993;423(3):157-60.

25. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. Am J Trop Med Hyg1993 May;48(5):637-44.

26. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection. J Autoimmun2001 Aug;17(1):99-107.

27. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res1998 Jan;31(1):133-7.

28. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. Trends Parasitol2002 Jun;18(6):262-5.

29. Almeida IC, Camargo MM, Procopio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from Trypanosoma cruzi are potent proinflammatory agents. EMBO J2000 Apr 3;19(7):1476-85.

30. Campos MA, Gazzinelli RT. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm2004 Jun;13(3):139-43.

31. Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. J Immunol2004 Feb 1;172(3):1711-8.

32. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. Am J Pathol2001 Nov;159(5):1723-33.

33. Ribeirao M, Pereira-Chioccola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. Parasite Immunol2000 Jan;22(1):49-53.

34. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. Mem Inst Oswaldo Cruz2003 Apr;98(3):407-11.

35. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis2004 Apr 1;38(7):943-50.

36. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun2003 Mar;71(3):1185-93.

37. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenutti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. Am J Pathol2005 Aug;167(2):305-13.

38. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, et al. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. Am J Pathol1998 Jan;152(1):101-11.

39. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. Circ Res1997 Oct;81(4):627-35.

40. Damas JK, Aukrust P, Ueland T, Odegaard A, Eiken HG, Gullestad L, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes. Basic Res Cardiol2001 Jul;96(4):345-52.

41. Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. J Mol Med1997 Nov-Dec;75(11-12):901-20.

42. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. Circulation1997 Mar 4;95(5):1247-52.

43. Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in Trypanosoma cruzi-induced cardiomyocyte hypertrophy. Infect Immun2003 Aug;71(8):4441-7.

44. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. N Engl J Med1994 Dec 8;331(23):1564-75.

45. Spotnitz MD, Lesch M. Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. Prog Cardiovasc Dis2006 Jul-Aug;49(1):42-57.

46. Dos Reis FJ, de Sousa TA, Oliveira MS, Dantas N, Silveira M, Braghiroly MI, et al. Is hepatitis C virus a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy? A systematic review of literature. Braz J Infect Dis2006 Jun;10(3):199-202.

47. Braunwald E. 50th anniversary historical article. Myocardial oxygen consumption: the quest for its determinants and some clinical fallout. J Am Coll Cardiol2000 Apr;35(5 Suppl B):45B-8B.

48. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. Br Heart J1985 Apr;53(4):363-73.

49. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. N Engl J Med1999 Oct 21;341(17):1276-83.

50. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. N Engl J Med2007 Mar 15;356(11):1140-51.

51. Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. Arch Med Res2003 Mar-Apr;34(2):89-99.

52. Johnston DL, Lewandowski ED. Fatty acid metabolism and contractile function in the reperfused myocardium. Multinuclear NMR studies of isolated rabbit hearts. Circ Res1991 Mar;68(3):714-25.

53. Carvajal K, Banos G, Moreno-Sanchez R. Impairment of glucose metabolism and energy transfer in the rat heart. Mol Cell Biochem2003 Jul;249(1-2):157-65.

54. Kernec F, Unlu M, Labeikovsky W, Minden JS, Koretsky AP. Changes in the mitochondrial proteome from mouse hearts deficient in creatine kinase. Physiol Genomics2001 Jul 17;6(2):117-28.

55. Heddi A, Stepien G, Benke PJ, Wallace DC. Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial disease patients. J Biol Chem1999 Aug 13;274(33):22968-76.

56. Garg N, Popov VL, Papaconstantinou J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in Trypanosoma cruzi-infected

murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. Biochim Biophys Acta2003 Jul 14;1638(2):106-20.

57. Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. Biochim Biophys Acta2004 Jun 28;1689(2):162-73.

58. Luss H, Watkins SC, Freeswick PD, Imro AK, Nussler AK, Billiar TR, et al. Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro. J Mol Cell Cardiol1995 Sep;27(9):2015-29.

59. Wang D, McMillin JB, Bick R, Buja LM. Response of the neonatal rat cardiomyocyte in culture to energy depletion: effects of cytokines, nitric oxide, and heat shock proteins. Lab Invest1996 Dec;75(6):809-18.

60. Kalovidouris AE, Plotkin Z, Graesser D. Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. J Rheumatol1993 Oct;20(10):1718-23.

61. Kaasik A, Minajeva A, De Sousa E, Ventura-Clapier R, Veksler V. Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. FEBS Lett1999 Feb 5;444(1):75-7.

62. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev1996;13:19-50.

63. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem1975 May 25;250(10):4007-21.

64. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods1982 Sep;6(4):317-39.

65. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol1993 Jun 1;3(6):327-32.

66. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional

difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. Proteomics2003 Jan;3(1):36-44.

67. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. Circ Res2001 Apr 27;88(8):763-73.

68. Prentice H, Webster KA. Genomic and proteomic profiles of heart disease. Trends Cardiovasc Med2004 Oct;14(7):282-8.

69. McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of heart disease. Hum Mol Genet2003 Oct 15;12 Spec No 2:R135-44.

70. McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of the heart: unraveling disease. Circ Res2006 Feb 17;98(3):309-21.

71. Evans G, Wheeler CH, Corbett JM, Dunn MJ. Construction of HSC-2DPAGE: a two-dimensional gel electrophoresis database of heart proteins. Electrophoresis1997 Mar-Apr;18(3-4):471-9.

72. Muller EC, Thiede B, Zimny-Arndt U, Scheler C, Prehm J, Muller-Werdan U, et al. High-performance human myocardial two-dimensional electrophoresis database: edition 1996. Electrophoresis1996 Nov;17(11):1700-12.

73. Pleissner KP, Sander S, Oswald H, Regitz-Zagrosek V, Fleck E. The construction of the World Wide Web-accessible myocardial two-dimensional gel electrophoresis protein database "HEART-2DPAGE": a practical approach. Electrophoresis1996 Aug;17(8):1386-92.

74. Delcarpio JB, Claycomb WC, Moses RL. Ultrastructural morphometric analysis of cultured neonatal and adult rat ventricular cardiac muscle cells. Am J Anat1989 Dec;186(4):335-45.

75. Teixeira PC, Iwai LK, Kuramoto AC, Honorato R, Fiorelli A, Stolf N, et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res2006 Dec;39(12):1549-62.

76. Schwartz K, Boheler KR, de la Bastie D, Lompre AM, Mercadier JJ. Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. Am J Physiol1992 Mar;262(3 Pt 2):R364-9.

77. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? Circ Res2001 Aug 3;89(3):201-10.

78. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. J Clin Invest2000 Jul;106(1):55-62.

79. Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH, et al. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis1998 Aug;19(11):2031-42.

80. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. Curr Opin Crit Care2002 Oct;8(5):411-6.

81. Tanonaka K, Yoshida H, Toga W, Furuhama K, Takeo S. Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. Biochem Biophys Res Commun2001 May 4;283(2):520-5.

82. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. J Am Coll Cardiol1996 Aug;28(2):506-14.

83. Wen JJ, Vyatkina G, Garg N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. Free Radic Biol Med2004 Dec 1;37(11):1821-33.

84. Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, Ley TJ. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. Immunity1999 May;10(5):595-605.

85. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.

86. Bilate AM, Teixeira PC, Ribeiro SP, Brito TD, Silva AM, Russo M, et al. Distinct Outcomes of Trypanosoma cruzi Infection in Hamsters Are Related to Myocardial Parasitism, Cytokine/Chemokine Gene Expression, and Protein Expression Profile. J Infect Dis2008 Aug 15;198(4):614-23.

87. Quinlan R. Cytoskeletal competence requires protein chaperones. Prog Mol Subcell Biol2002;28:219-33.

88. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. Heart Fail Rev2000 Oct;5(3):271-80.

89. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. Cardiovasc Res2000 Jan 14;45(2):273-8.

90. Spinardi L, Witke W. Gelsolin and diseases. Subcell Biochem2007;45:55-69.

91. Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopulos N, Yin HL, Hayoz D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. Cell Mol Life Sci2004 Oct;61(19-20):2614-23.

92. Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, et al. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. Circulation2000 Dec 19;102(25):3046-52.

93. Baba H, Ishiwata T, Takashi E, Xu G, Asano G. Expression and localization of lumican in the ischemic and reperfused rat heart. Jpn Circ J2001 May;65(5):445-50.

94. de Tombe PP. Altered contractile function in heart failure. Cardiovasc Res1998 Feb;37(2):367-80.

95. Tagawa H, Koide M, Sato H, Cooper Gt. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of cardiocytes from hypertrophied and failing right ventricular myocardium. Proc Assoc Am Physicians1996 May;108(3):218-29.

96. Rappaport L, Samuel JL. Microtubules in cardiac myocytes. Int Rev Cytol1988;113:101-43.

97. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. Circulation1991 Feb;83(2):504-14.

98. Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem2001 May 11;276(19):16168-76.

99. Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. Circulation2000 Jan 4-11;101(1):33-9.

100. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem2005;74:739-89.

101. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev1999 May 15;13(10):1211-33.

102. Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, et al. Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol2007 Sep 11;50(11):1029-37.

103. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. Cardiovasc Res2001 Sep;51(4):637-46.

104. Ellis RJ. The molecular chaperone concept. Semin Cell Biol1990 Feb;1(1):1-9.

105. Polla BS. A role for heat shock proteins in inflammation? Immunol Today1988 May;9(5):134-7.

106. Currie RW. Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts. J Mol Cell Cardiol1987 Aug;19(8):795-808.

107. Robertson JD, Datta K, Biswal SS, Kehrer JP. Heat-shock protein 70 antisense oligomers enhance proteasome inhibitor-induced apoptosis. Biochem J1999 Dec 1;344 Pt 2:477-85.

108. Mearini G, Schlossarek S, Willis MS, Carrier L. The ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction. Biochim Biophys Acta2008 Dec;1782(12):749-63.

109. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev2002 Apr;82(2):373-428.

110. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. Immunol Rev2005 Oct;207:19-30.

111. Kloetzel PM, Soza A, Stohwasser R. The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. Biol Chem1999 Mar;380(3):293-7.

112. Uchiyama Y. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. Arch Histol Cytol2001 Aug;64(3):233-46.

113. Kanamori H, Takemura G, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, et al. Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. Am J Pathol2009 May;174(5):1705-14.

114. Nishida K, Kyoi S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. The role of autophagy in the heart. Cell Death Differ2009 Jan;16(1):31-8.

115. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. Circ Res2003 Apr 18;92(7):715-24.

116. Kim MA, Kim HJ, Jee HJ, Kim AJ, Bae YS, Bae SS, et al. Akt2, but not Akt1, is required for cell survival by inhibiting activation of JNK and p38 after UV irradiation. Oncogene2009 Mar 5;28(9):1241-7.

117. DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. J Biol Chem2006 Oct 27;281(43):32841-51.

118. Sato T, Irie S, Reed JC. A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. FEBS Lett1995 Jan 23;358(2):113-8.

119. Hu HM, O'Rourke K, Boguski MS, Dixit VM. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. J Biol Chem1994 Dec 2;269(48):30069-72.

120. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J1997 Sep 1;16(17):5386-97.

121. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. Immunity1997 Dec;7(6):821-30.

122. Hatle L, Melbye OJ. Immunoglobulins and complement in chronic myocardial disease. A myocardial biopsy study. Acta Med Scand1976;200(5):385-9.

123. Molina HA, Milei J, Storino R. Chronic Chagas' myocardiopathy. Demonstration of in vivo bound immunoglobulins in heart structures by the immunoperoxidase technique. Cardiology1984;71(6):297-306.

124. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. Eur J Heart Fail2009 Sep;11(9):811-7.

125. Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, Steige G, Wiese E, Kupper I, et al. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. Am J Pathol2007 Aug;171(2):463-72.

126. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 3rd ed. New York: J. Wiley & Sons; 2004.

127. Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A. Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. Cancer Res2007 Feb 15;67(4):1602-8.

128. Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci2001 Jun;58(7):902-20.

129. Tsujino S, Servidei S, Tonin P, Shanske S, Azan G, DiMauro S. Identification of three novel mutations in non-Ashkenazi Italian patients with muscle phosphofructokinase deficiency. Am J Hum Genet1994 May;54(5):812-9.

130. Comi GP, Fortunato F, Lucchiari S, Bordoni A, Prelle A, Jann S, et al. Beta-enolase deficiency, a new metabolic myopathy of distal glycolysis. Ann Neurol2001 Aug;50(2):202-7.

131. Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K, et al. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. Hypertension2004 Nov;44(5):662-7.

132. Dyke PC, 2nd, Konczal L, Bartholomew D, McBride KL, Hoffman TM. Acute dilated cardiomyopathy in a patient with deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. Pediatr Cardiol2009 May;30(4):523-6.

133. Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. J Biol Chem2005 Apr 29;280(17):17464-71.

134. Kim N, Lee Y, Kim H, Joo H, Youm JB, Park WS, et al. Potential biomarkers for ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics. Proteomics2006 Feb;6(4):1237-49.

135. Denton RM, McCormack JG. Ca2+ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. Annu Rev Physiol1990;52:451-66.

136. Casademont J, Miro O. Electron transport chain defects in heart failure. Heart Fail Rev2002 Apr;7(2):131-9.

137. Antozzi C, Zeviani M. Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism. Cardiovasc Res1997 Aug;35(2):184-99.

138. Wen JJ, Yachelini PC, Sembaj A, Manzur RE, Garg NJ. Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. Free Radic Biol Med2006 Jul 15;41(2):270-6.

139. Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. Circ Res2004 Jul 23;95(2):135-45.

140. Taegtmeyer H. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. Circulation2004 Aug 24;110(8):894-6.

141. Spindler M, Meyer K, Stromer H, Leupold A, Boehm E, Wagner H, et al. Creatine kinase-deficient hearts exhibit increased susceptibility to ischemia-reperfusion injury and impaired calcium homeostasis. Am J Physiol Heart Circ Physiol2004 Sep;287(3):H1039-45.

142. Nahrendorf M, Spindler M, Hu K, Bauer L, Ritter O, Nordbeck P, et al. Creatine kinase knockout mice show left ventricular hypertrophy and dilatation, but unaltered remodeling post-myocardial infarction. Cardiovasc Res2005 Feb 1;65(2):419-27.

143. Ye Y, Wang C, Zhang J, Cho YK, Gong G, Murakami Y, et al. Myocardial creatine kinase kinetics and isoform expression in hearts with severe LV hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol2001 Jul;281(1):H376-86.

144. Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, et al. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. Circulation1996 Oct 15;94(8):1894-901.

145. Ingwall JS. Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of cardiac and skeletal muscles. Am J Physiol1982 May;242(5):H729-44.

146. Weiss RG, Gerstenblith G, Bottomley PA. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. Proc Natl Acad Sci U S A2005 Jan 18;102(3):808-13.

147. Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. Circulation1997 Oct 7;96(7):2190-6.

148. Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Cardiovasc Res2000 Mar;45(4):860-5.

149. Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease. JAMA1991 Oct 2;266(13):1812-6.

150. Das AM. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. Mol Genet Metab2003 Jun;79(2):71-82.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2006) 39: 1549-1562
ISSN 0100-879X

Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy

P.C. Teixeira[1,3,4], L.K. Iwai[1,4], A.C.K. Kuramoto[1,4], R. Honorato[2], A. Fiorelli[2], N. Stolf[2], J. Kalil[1,3,4] and E. Cunha-Neto[1,3,4]

[1]Laboratório de Imunologia, [2]Divisão de Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, [3]Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
[4]Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto do Milênio, CNPq/MCT, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

Chronic Chagas' disease cardiomyopathy (CCC) is an often fatal outcome of *Trypanosoma cruzi* infection, with a poorer prognosis than other cardiomyopathies. CCC is refractory to heart failure treatments, and is the major indication of heart transplantation in Latin America. A diffuse myocarditis, plus intense myocardial hypertrophy, damage and fibrosis, in the presence of very few *T. cruzi* forms, are the histopathological hallmarks of CCC. To gain a better understanding of the pathophysiology of CCC, we analyzed the protein profile in the affected CCC myocardium. Homogenates from left ventricular myocardial samples of end-stage CCC hearts explanted during heart transplantation were subjected to two-dimensional electrophoresis with Coomassie blue staining; protein identification was performed by MALDI-ToF mass spectrometry and peptide mass fingerprinting. The identification of selected proteins was confirmed by immunoblotting. We demonstrated that 246 proteins matched in gels from two CCC patients. They corresponded to 112 distinct proteins. Along with structural/contractile and metabolism proteins, we also identified proteins involved in apoptosis (caspase 8, caspase 2), immune system (T cell receptor ß chain, granzyme A, HLA class I) and stress processes (heat shock proteins, superoxide dismutases, and other oxidative stress proteins). Proteins involved in cell signaling and transcriptional factors were also identified. The identification of caspases and oxidative stress proteins suggests the occurrence of active apoptosis and significant oxidative stress in CCC myocardium. These results generated an inventory of myocardial proteins in CCC that should contribute to the generation of hypothesis-driven experiments designed on the basis of the classes of proteins identified here.

Correspondence
E. Cunha-Neto
Laboratório de Imunologia
InCor-HC-FM, USP
Av. Dr. Eneas C. Aguiar, 44
Bloco II, 9º andar
05403-000 São Paulo, SP
Brasil
Fax: +55-11-3069-5953
E-mail: edecunha@gmail.com

Research supported by FAPESP (Nos. 00/14549-4 and 01/00729-3). P.C. Teixeira is supported by a FAPESP grant (No. 04/15322-4), and E. Cunha-Neto and J. Kalil are recipients of productivity awards from CNPq (Nos. 302970-2004-5 and 307541-2003-7).

Received December 20, 2005
Accepted August 23, 2006

Key words
- Chagas' disease
- Cardiomyopathy
- Proteomic analysis
- Two-dimensional electrophoresis
- MALDI-ToF

Introduction

Chagas' disease is a significant cause of morbidity and mortality in Central and South America, affecting about 13 million people (1). The disease is caused by infection with the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. About 30% of Chagas' disease patients develop chronic Chagas' disease cardiomyopathy (CCC), an inflammatory cardiomyopathy that occurs decades after the initial infection, and one-third progress further to a particularly aggressive, life-threatening dilated cardiomyopathy. In spite of the recent advances in vector control, the millions of patients already infected deserve more attention from the scientific community. Furthermore, clinical progression, length of survival and overall prognosis are significantly worse in CCC patients compared with patients with dilated cardiomyopathy of non-inflammatory etiology (2,3).

CCC heart lesions show histopathological findings consistent with inflammation and a myocardial remodeling process: T cell/macrophage-rich myocarditis, hypertrophy, and fibrosis with heart fiber damage (4). The local cytokine production profile is consistent with a T1-type response, with interferon-gamma (γ)-induced chemokines (5-12). Gene expression profiling of CCC myocardial tissues showed that 15% of the known genes selectively up-regulated in CCC are IFN-γ-inducible (12). Exposure of cardiomyocytes to IFN-γ can up-regulate the expression of atrial natriuretic factor (12), suggesting that IFN-γ may directly modulate gene expression in myocardial cells. These results are consistent with a possible role of IFN-γ-induced chronic inflammation in modulating myocardial gene expression.

However, gene expression profiling may not be faithfully reflected at the protein level. Advances in two-dimensional (2-D) electrophoresis, mass spectrometry, and bioinformatics, along with progress in genomic sequence analysis now make possible a direct evaluation of large-scale protein profiles (13).

In order to study the global protein profile of the myocardium under the effect of chronic inflammation in CCC heart tissue, and to gain insight about the pathophysiology of CCC, we analyzed the myocardial proteome from end-stage CCC patients.

Patients, Material and Methods

Reagents

Immobilized pH gradient gel buffer, trypsin (sequencing grade), α-cyano-4-hydroxycinnamic acid and other analytical grade reagents were purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden), with the exception of ammonium bicarbonate, analytical grade acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) that were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). ACTH peptide 18-39 and (Ile7)-angiotensin III were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All stock solutions were prepared with deionized water using a Milli-Q Academic System (Millipore Co., Billerica, MA, USA).

Sample preparation

The protocol was approved by the Institutional Review Board of the University of São Paulo School of Medicine and written informed consent was obtained from the patients.

Myocardial left ventricular free wall heart samples were obtained from two end-stage heart failure CCC patients with a diagnosis established by seropositivity to *T. cruzi* in at least two of three tests, i.e., ELISA, indirect immunofluorescence and indirect hemagglutination, and by positive epidemiology. Both patients were female and were 42 and 62 years old, with an ejection fraction <40%. The hearts were explanted on the occasion of heart transplantation at the Heart Institute - InCor, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil. Samples

were dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80ºC. The tissue (100 mg) was homogenized in 1% SDS (w/v) and 0.5 mM TLCK (1 mL), submitted to three sonication cycles and centrifuged at 12,000 *g* for 15 min at 4ºC (14). The samples were passed through Millipore Centricon YM-3 filters (molecular mass cutoff at 3000 Da) and the protein content of the supernatant solution of each extract was quantified by the bicinchoninic acid method (15).

Two-dimensional gel electrophoresis

Isoelectric focusing was carried out on 24-cm long immobilized pH gradient gel strips, with a pH range of 3.0 to 10.0 (Im mobiline DryStrip gels, Amersham Biosciences). The strips were rehydrated in 8 M urea, 0.5% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 0.2% DTT, and traces of bromophenol blue containing 1 mg of cardiac protein extract for 12 h at 20ºC. Isoelectric focusing was performed using the Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences) at 20ºC at 50 mA/strip in an increasing voltage gradient (500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, and 8000 V for 8 h, accumulating a total of 64,000 Vh), according to manufacturer instructions. Before the second dimension electrophoresis, the strips were equilibrated twice for 15 min in a buffer containing 50 mM Tris, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol (v/v), 2% SDS (w/v), 0.002% bromophenol blue (w/v), and in the presence of 10 mg/mL DTT in the first step and 25 mg/mL iodoacetamide in the second step. The second dimension was carried out on a vertical DaltSix system (Amersham Biosciences) at 20ºC on 12.5% polyacrylamide gels (24 x 18 cm) for 5 h at 100 W. Coomassie blue-stained gels were digitized with an ImageScanner and analyzed with the ImageMaster 2D Elite 3.10 software (Amersham Biosciences). The matching spots in the two samples were selected and the volume (related to the quantity of protein) of each spot was normalized on the basis of total volume of all spots in each gel.

Protein digestion

All spots visualized in each gel were excised, subjected to tryptic digestion and processed in a robotic workstation (Ettan Spot Handling Workstation, Amersham Biosciences). Briefly, spots (1.4 mm in diameter) were excised from the gel and then washed in 50 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) in 50% acetonitrile (ACN) until complete destaining and SDS removal and then dried. Dehydrated gel plugs were rehydrated with 30 µL of a solution containing 0.3 µg trypsin in 20 mM NH_4HCO_3. Digestion was performed at 37ºC for 6 h. Digested peptides were extracted by the addition of 50 µL 50% ACN/0.5% TFA at room temperature for 1 h. The procedure was repeated and the supernatants were combined. Samples were concentrated and resuspended in 5 µL 5% ACN/2.5% TFA.

Protein identification

Tryptic fragments were analyzed with the Ettan MALDI-ToF Pro mass spectrometer (Amersham Biosciences). For peptide mass fingerprinting (PMF) analysis, a small quantity of each processed sample (0.5 µL) corresponding to a spot was applied on a metal slide mixed with the same quantity of matrix (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) and taken to the mass spectrometer for analysis. To ensure maximal accuracy, trypsin autolysis peptides (842.51 and 2211.10 Da) were used for internal mass calibration and (Ile7)-angiotensin III (897.53 Da) and ACTH peptide 18-39 (2465.20 Da) were used for external calibration of the instrument. The m/z values for trypsin autolysis peptides and for contaminants (842.5, 1045.8, 1066.4, 2211.1, 2225.1, and 2299.2) were excluded from the list of tryptic peptides representing the PMF of proteins.

Proteins were identified by comparing the PMF of each spot to virtual tryptic digestion of proteins using the MALDI-ToF Evaluation software (Amersham Biosciences) and the non-redundant NCBI databank (*H. sapiens*), using as search parameters 0.2-Da peptide mass tolerance and 1 maximum missed cleavage sites. The mass lists of each spectrum were also submitted to the Mascot tool (http://www.matrixscience.com) and Swiss-Prot databank (*H. sapiens*) with mass tolerance of 0.5 Da and 1 maximum missed cleavage as parameters. The only allowed post-translational modification was oxidation. We considered expectation values ≤0.1 as significant protein identifications. After protein identification in both gels, a composite image of the two gels was constructed by matching the spots. We could enumerate the protein spots that were matched and identified as the same protein in the two gels, as well as those that were only identified in one of the gels. The functional classification of the proteins identified in both gels was adapted from the Gene Ontology classification using the FatiGO tool (http://fatigo. bioinfo.cipf.es).

Western blot analysis

Cardiac tissue homogenates in SDS-PAGE sample buffer were heated (95ºC, 5 min), run on SDS-polyacrylamide gels and then blotted onto nitrocellulose membranes. Next, the membranes were incubated with monoclonal antibodies against heat shock protein 60, protein disulfide isomerase, Cu/Zn superoxide dismutase, caspase 8 (Stressgen Bioreagents, Victoria, British Columbia, Canada) and caspase 2 (rabbit polyclonal antibody). Antibodies were kindly provided by Drs. Celio X. Santos, Francisco Laurindo, and Gustavo Amarante-Mendes (University of São Paulo). After incubation with the appropriate horseradish peroxidase-coupled conjugate, blots were developed by chemiluminescence using ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Results

Two-dimensional electrophoresis of the myocardium from CCC patients allowed us to observe ca. 400 spots on each gel (Figure 1). Using MALDI-ToF analysis with SWISS-PROT and the non-redundant NCBI databases, we identified proteins in 316 spots on the gel from patient 1 and 259 spots on the gel from patient 2, 246 of which were matched on both gels. Of the identified proteins, 112 were distinct proteins (Table 1). A representative spectrum of the tryptic fragments of a protein is shown in Figure 2, illustrating the mass/charge values from the trypsin autolysis products.

Table 2 shows the distribution of the 112 distinct proteins among functional categories according to the Gene Ontology classification (http://fatigo. bioinfo.cipf.es). As expected, proteins of the contractile apparatus and involved in energy generation were among the most abundant groups in CCC heart tissue. This analysis was able to identify less abundantly expressed proteins, such as transcriptional factors and proteins produced by the inflammatory infiltrate and related to the apoptotic process.

Structural proteins (19% of all distinct proteins) included multiple constituents of the sarcomeric actomyosin complex (15 proteins) such as heavy and light chains of cardiac myosin, several isoforms of actin, troponin and tropomyosin, actin-binding and Z-band proteins, as well as cytoskeletal proteins (6 proteins). The atrial isoform of myosin light chain (MYL4), which is normally suppressed after birth (16), was identified in the ventricular CCC samples. We identified six spots corresponding to vimentin, which is expressed by fibroblasts, suggesting the occurrence of a fibrotic process, a hallmark of CCC myocardium (17).

More than 38% of all distinct proteins

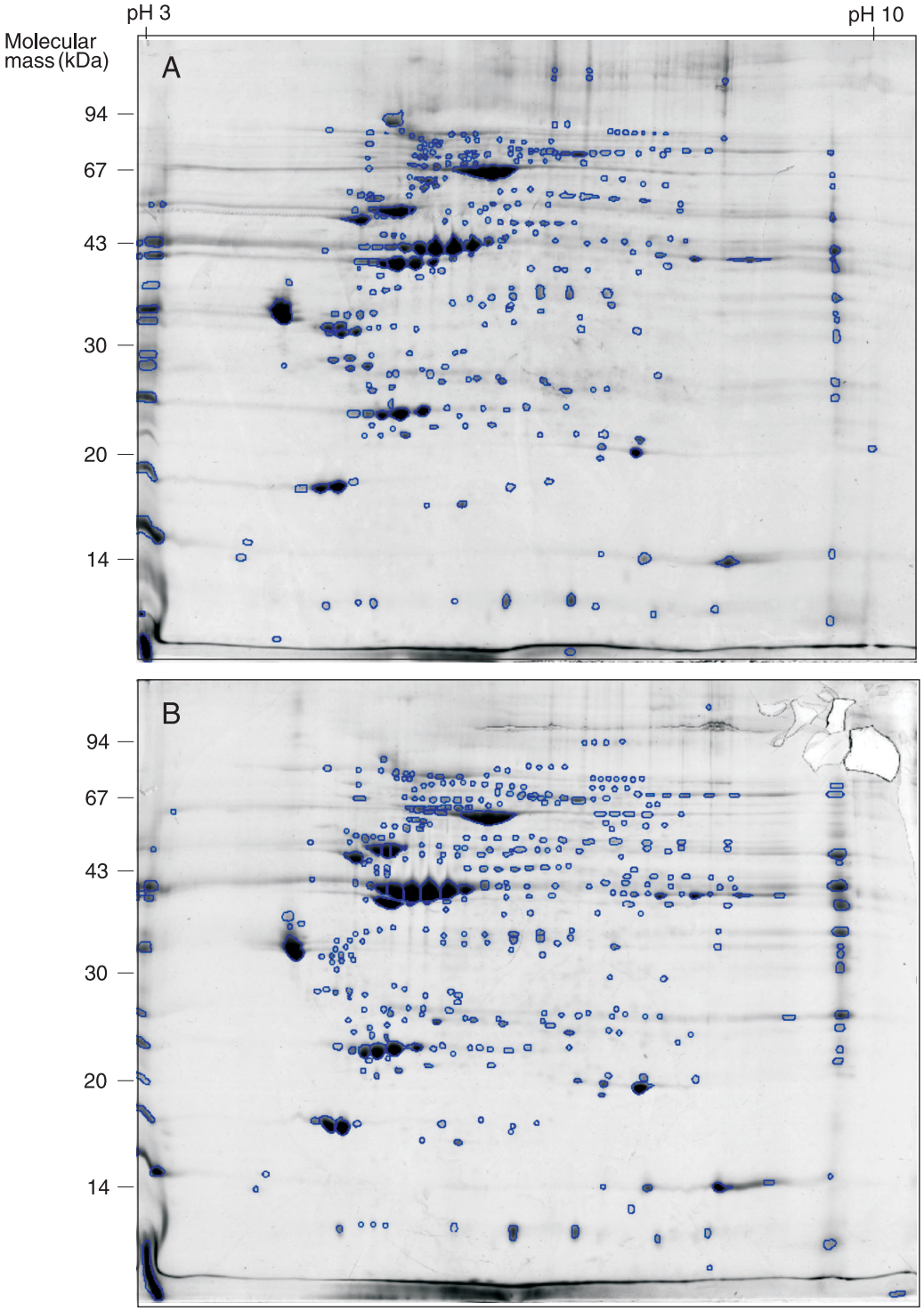


Figure 1. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins in the myocardium of patients with chronic Chagas' disease cardiopathy (CCC). *A* and *B*, Samples from CCC patients #1 and #2; the outlines of spots that were selected for protein identification are shown. Myocardium proteins were separated by isoelectric focusing on 24-cm long immobilized pH gradient gel strips containing a linear 3-10 pH gradient, followed by SDS-PAGE on vertical 12.5% gels. Proteins were detected by Coomassie blue R-250 staining.

Table 1. Proteins identified in the myocardium of patients with chronic Chagas' disease cardiopathy by 2-D gel electrophoresis-peptide mass fingerprinting analysis.

Symbol	Description	Exp.[1]	Cov.[2] (%)	pI (T)	pI (E)	Mass (T)	Mass (E)	N. Vol.[3]	Accession number	No. Spots[4]	T. Vol.[5]
1. Structural and Contractile Proteins											
ACTA1	actin, α1, skeletal muscle	0.027	30.2	5.2	5.5	42.3	51.6	0.196	P68133	3	0.20
ACTA2	actin, α2, smooth muscle, aorta	0.010	19.7	5.3	4.8	42.3	42.1	0.034	P62736	15	0.03
ACTC	actin, α, cardiac muscle	0.006	28.1	5.2	3.0	42.3	56.0	0.816	P68032	14	0.82
ACTG2	actin, γ2, smooth muscle, enteric	0.018	34.3	5.3	5.8	42.3	54.7	3.618	P63267	8	3.62
ACTN2	actinin, α2	0.018	20.9	5.3	5.7	104.4	91.3	0.165	P35609	8	0.17
DES	desmin	0.000	41.7	5.2	5.2	53.6	65.3	1.506	P17661	13	1.51
KIAA0992	palladin	0.083	12.4	9.3	9.0	45.6	31.0	0.118	Q7Z3W0	1	0.12
LMNA	lamin A/C (70-kDa lamin)	0.010	15.0	6.3	8.4	65.0	66.2	0.037	P02545	2	0.06
MYBPC3	myosin-binding protein C, cardiac	0.001	8.8	6.2	7.5	141.8	107.2	0.030	Q14896	4	0.12
MYH6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, α	0.001	6.0	5.9	8.3	223.5	125.0	0.041	P13533	1	0.04
MYH7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, ß	0.000	33.6	5.3	5.6	183.1	75.0	0.115	P12883	12	0.79
MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	0.000	69.3	4.9	4.8	18.8	18.9	2.749	P10916	3	4.78
MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali, ventricular, skeletal, slow	0.000	56.2	5.0	5.3	22.0	26.9	2.636	P08590	10	7.54
MYL4	myosin, light polypeptide 4, alkali, atrial, embryonic	0.010	36.0	5.0	5.3	21.4	30.0	0.021	P12829	2	0.06
MYOZ2	myozenin 2	0.014	19.7	7.9	6.4	29.9	42.1	0.016	Q9NPC6	2	0.04
RTN2	reticulon 2	0.164	16.4	5.3	9.5	33.4	41.3	0.156	O75298	1	0.16
SSH3	slingshot homolog 3	0.059	22.0	9.5	5.3	16.5	25.8	0.017	Q8TE77	1	0.02
TNNT2	troponin T2, cardiac	0.010	20.1	4.9	5.3	33.0	51.8	4.163	P45379	3	4.49
TPM1	tropomyosin 1 (α)	0.014	34.9	4.6	4.4	26.6	42.0	5.375	P09493	2	5.59
TUBB	tubulin, ß polypeptide	0.019	19.9	4.8	5.2	30.6	69.5	0.066	P07437	1	0.07
VIM	vimentin	0.004	32.2	5.1	5.0	53.7	62.1	0.066	P08670	6	0.46
2. Metabolism											
2.1. Glycolysis											
ALDOA	fructose 1,6-biphosphate aldolase	0.020	30.0	8.8	9.5	39.7	51.3	0.821	P04075	1	0.82
ENO1	enolase 1	0.026	24.4	7.0	7.6	47.5	60.2	0.023	P06733	1	0.02
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.019	15.2	8.7	9.5	36.2	45.6	0.665	P04406	1	0.66
LDHB	lactate dehydrogenase B	0.013	15.9	5.7	6.7	36.8	45.5	0.103	P07195	3	0.31
PDHB	pyruvate dehydrogenase, E1 beta	0.000	26.0	5.4	6.0	36.8	43.2	0.038	P11177	2	0.07
2.2. Tricarboxylic Acid Cycle											
ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0.006	10.0	7.4	7.7	86.2	84.3	0.046	Q99798	7	0.62
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	0.025	22.0	7.8	8.0	54.7	66.3	0.051	P09622	3	0.18
DLST	dihydrolipoamide succinyltransferase	0.068	11.0	9.4	6.1	49.0	64.4	0.059	P36957	2	0.12
FH	fumarate hydratase precursor	0.018	23.5	9.0	8.1	54.8	58.3	0.058	P07954	4	0.17
MDH2	malate dehydrogenase 2, mitochondria	0.099	23.7	9.0	9.5	33.7	42.7	0.103	P40926	1	0.10
OGDH	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)	0.015	9.3	6.6	7.3	114.7	90.4	0.027	Q02218	6	0.15
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0.005	14.5	7.1	7.5	73.7	77.4	0.080	P31040	4	0.30
2.3. Oxidative Phosphorylation and Electron Transport											
ATP5A1	ATP synthase, F1 complex, α polypeptide 1	0.010	21.7	9.3	9.5	59.8	64.6	0.821	P25705	2	0.82
ATP5B	ATP synthase, F1 complex, ß polypeptide	0.000	46.1	5.3	5.0	56.5	63.6	1.548	P06576	2	1.55
ATP5C1	ATP synthase, F1 complex, γ polypeptide 1	0.047	26.1	9.1	9.5	32.3	38.8	0.313	P36542	1	0.31
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	0.002	10.1	6.9	7.9	65.5	73.6	0.013	Q16134	3	0.07

Continued on next page

Table 1 continued.

Symbol	Description	Exp.[1]	Cov.[2] (%)	pI (T)	pI (E)	Mass (T)	Mass (E)	N. Vol.[3]	Accession number	No. Spots[4]	T. Vol.[5]
NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	0.016	16.5	5.9	5.8	80.5	82.5	0.114	P28331	6	0.42
NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3	0.012	27.7	7.0	6.0	30.3	30.9	0.035	O75489	2	0.06
NDUFS8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	0.091	18.1	5.5	5.1	24.3	25.6	0.028	O00217	1	0.03
NDUFV1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1	0.042	8.6	9.1	9.5	50.5	62.2	0.088	P49821	1	0.09
NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	0.015	26.0	7.1	6.6	25.7	27.1	0.058	P19404	1	0.06
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	0.000	26.6	5.9	6.4	53.3	60.3	0.104	P31930	5	0.41
UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0.034	12.4	8.9	7.0	29.9	29.0	0.128	P47985	1	0.13
2.4. Energy Transduction											
CKM	creatine kinase, M chain	0.005	38.1	6.8	8.1	43.3	53.5	0.578	P06732	8	0.58
CKMT2	creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	0.149	25.1	8.9	9.5	48.0	55.9	1.211	P17540	1	1.21
2.5. Lipid Metabolism/ß-Oxidation											
ALG1	ß-1,4 mannosyltransferase	0.129	14.7	5.6	4.7	26.5	35.2	0.023	Q9P2Y2	1	0.02
APOA1	apolipoprotein A-I	0.036	24.7	5.5	5.2	30.8	28.3	0.110	P02647	2	0.11
ECH1	enoyl co-enzyme A (CoA) hydratase 1, peroxisomal	0.006	16.2	8.7	7.8	36.1	36.9	0.021	Q13011	2	0.02
ECHS1	enoyl CoA hydratase 1, mitochondrial	0.020	21.0	8.9	6.9	31.8	31.3	0.020	P30084	1	0.02
FABP3	fatty acid-binding protein 3, muscle and heart	0.038	25.2	7.0	7.0	13.3	11.9	0.365	P05413	3	1.15
HMGCS1	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0.160	11.9	5.8	7.3	56.0	83.2	0.031	Q01581	1	0.03
2.6. Nucleotide and Nucleic Acid Metabolism											
ADSS	adenylsuccinate synthase	0.043	8.0	8.8	6.0	50.2	52.7	0.034	P30520	1	0.03
AK1	adenylate kinase 1	0.084	23.0	7.8	9.5	21.9	25.5	0.121	P00568	1	0.12
DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	0.085	12.4	6.0	7.3	62.7	74.3	0.038	Q16555	1	0.04
2.7. Other Metabolism Proteins											
ALDH2	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	0.010	0.2	6.6	6.2	56.3	65.8	0.070	P05091	1	0.07
GOLGA1	Golgi autoantigen (golgin 97)	0.019	12.0	5.2	5.7	88.3	88.4	0.042	Q92805	1	0.04
GOT1	aspartate aminotransferase 1	0.039	14.8	6.5	7.9	46.5	51.5	0.073	P17174	2	0.14
NSFL1C	p47 protein	0.082	17.3	5.1	5.9	41.1	66.5	0.037	Q9UNZ2	2	0.07
OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1 precursor	0.002	17.1	7.2	6.9	56.6	68.7	0.072	P55809	2	0.18
PSMD11	proteasome 26S non-ATPase subunit 11	0.087	17.3	5.5	7.5	43.2	74.3	0.019	O00231	1	0.02
PYGB	glycogen phosphorylase, brain form	0.001	15.3	6.5	7.5	99.5	86.8	0.017	P11216	1	0.02
TPI1	triosephosphate isomerase 1	0.054	22.2	6.5	8.1	26.8	28.7	0.018	P60174	2	0.04
3. Stress Response											
APTX	aprataxin	0.088	27.0	9.2	5.0	13.3	12.3	0.015	Q7Z2E3	1	0.02
CRYAB	crystallin, α B	0.010	44.0	6.8	7.6	20.1	22.6	1.865	P02511	5	1.86
CRYM	crystallin, mu	0.002	10.5	5.1	5.1	33.9	45.6	0.026	Q14894	3	0.03
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	0.150	19.0	5.5	7.3	23.4	29.3	0.038	Q9UKB3	1	0.04
DNAJC13	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13 (RME8)	0.022	18.5	8.4	7.0	50.6	61.3	0.020	O75165	1	0.02
GSTA1	glutathione S-transferase A1	0.073	31.1	5.4	6.2	23.3	26.9	0.030	P08263	1	0.03
HSPA5	heat shock 70-kDa protein 5	0.035	10.0	5.1	5.0	72.3	83.0	0.147	P11021	1	0.15
HSPA8	heat shock 70-kDa protein 8 isoform 2	0.000	35.6	5.6	5.8	53.6	77.7	0.234	P11142	5	0.87
HSPA9B	heat shock 70-kDa protein 9B precursor	0.002	30.2	6.0	5.7	74.1	79.4	0.194	P38646	6	0.70

Continued on next page

Table 1 continued.

Symbol	Description	Exp.[1]	Cov.[2] (%)	pI (T)	pI (E)	Mass (T)	Mass (E)	N. Vol.[3]	Accession number	No. Spots[4]	T. Vol.[5]
HSPB1	heat shock 27-kDa protein 1	0.074	36.6	8.1	5.7	22.4	30.4	0.219	P04792	8	0.64
HSPB6	heat shock protein, α-crystallin-related, B6	0.010	23.0	6.0	6.7	17.2	19.3	0.008	O14558	3	0.04
HSPB7	heat shock 27-kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	0.007	32.1	5.4	5.2	15.5	12.2	0.011	Q9UBY9	1	0.01
HSPCA	heat shock 90-kDa protein 1, α	0.009	13.0	4.9	5.0	84.5	88.4	0.036	P07900	1	0.04
HSPD1	chaperonin (HSP60)	0.059	16.9	5.7	5.4	61.2	72.6	0.117	P10809	4	0.23
NOR1	oxidored-nitro domain-containing protein isoform 1	0.132	20.6	9.4	2.9	26.7	53.2	0.132	Q8N7G2	1	0.13
PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3	0.045	15.2	6.0	6.5	57.2	69.7	0.025	P30101	4	0.11
PRDX2	peroxiredoxin 2	0.002	28.0	5.2	5.4	18.5	24.4	0.125	P32119	3	0.23
PRDX6	peroxiredoxin 6	0.066	17.4	6.0	6.8	25.1	30.0	0.071	P30041	1	0.07
SERPINA1	α-1 antitrypsin	0.003	26.8	5.4	4.9	46.9	71.6	0.034	P01009	1	0.03
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	0.137	32.7	5.8	5.9	15.9	17.7	0.129	P00441	1	0.13
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0.000	32.3	6.9	7.7	23.7	23.7	0.148	P04179	3	0.23
TRA1	tumor rejection antigen (gp96) 1 (heat shock protein gp96)	0.008	9.1	4.7	4.7	90.4	95.0	0.043	P14625	1	0.04
4. Immune Response											
GZMA	granzyme A precursor	0.033	16.0	9.1	7.3	29.0	21.9	0.077	P12544	1	0.08
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	0.130	12.0	6.1	7.8	40.5	31.2	0.040	P01889	1	0.04
HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G	0.083	32.7	5.0	7.4	19.2	68.4	0.109	P17693	1	0.11
IGHG2	immunoglobulin heavy chain	0.028	31.7	5.2	6.8	35.9	43.3	0.026	P01859	2	0.16
TCRB	T cell receptor ß chain	0.002	32.7	6.5	9.5	19.9	26.9	0.081	P01850	2	0.10
5. Apoptosis											
CASP2	caspase-2 precursor	0.140	18.0	6.1	6.1	34.9	27.1	0.036	P42575	2	0.04
CASP8	caspase 8	0.100	12.0	5.7	6.4	30.7	26.7	0.061	Q14790	1	0.06
CTSD	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	0.010	14.5	5.3	5.3	44.5	35.8	0.016	P07339	3	0.02
6. Cell Division and Proliferation											
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	0.090	10.0	5.7	6.6	88.1	84.3	0.088	P22607	1	0.09
MLH1	DNA mismatch repair protein Mlh1	0.088	10.0	5.5	7.2	84.7	90.8	0.022	P40692	1	0.02
7. Cell Signaling and Control of Transcription and Translation											
FOXP4	forkhead box P4 isoform 1	0.086	24.8	4.5	7.8	16.2	80.8	0.014	Q8IVH2	1	0.01
GJE1	gap junction protein, epsilon 1, 29 kDa	0.031	17.0	9.4	6.7	31.3	60.8	0.065	Q8NFK1	2	0.08
PHB	prohibitin	0.002	37.5	5.6	5.9	29.9	34.3	0.042	P35232	2	0.06
TUFM	elongation factor Tu, mitochondrial precursor (EF-Tu) (P43)	0.020	19.0	7.9	7.3	49.9	56.8	0.052	P49411	3	0.15
8. Other Functions											
ALB	albumin precursor	0.057	17.3	5.6	6.2	68.4	76.0	6.653	P02768	5	6.65
ANXA5	annexin A5	0.090	16.6	4.9	4.9	35.8	41.0	0.024	P08758	1	0.02
ARFGAP1	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1	0.032	27.8	4.4	5.6	44.7	46.1	0.019	Q8N6T3	1	0.02
C16orf49	chromosome 16 open reading frame 49 (unknown gene product)	0.020	25.2	5.6	4.9	35.7	43.8	0.026	O75208	3	0.03
CA1	carbonic anhydrase I	0.001	38.8	6.6	7.4	28.8	32.2	0.019	P00915	1	0.02
HBA1	hemoglobin, α1	0.026	14.1	9.1	9.4	15.0	11.2	0.274	P69905	2	0.29
HBB	hemoglobin, ß	0.002	40.6	6.8	7.8	15.0	11.5	0.101	P68871	2	0.20
IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	0.000	9.0	6.1	6.5	83.6	84.2	0.112	Q16891	4	0.26
MB	myoglobin	0.018	44.2	7.9	3.1	17.2	15.5	1.120	P02144	7	3.79
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	0.130	25.0	5.3	8.4	53.8	55.6	0.067	P45452	3	0.13
NUP153	nucleoporin 153 kDa	0.087	4.0	8.9	6.6	153.8	69.9	0.018	P49790	1	0.02
RTN1	reticulon 1	0.080	7.1	4.6	6.7	83.9	68.9	0.036	Q16799	1	0.04
TF	transferrin	0.040	7.9	7.1	7.0	79.3	82.4	0.336	P02787	3	0.50

[1]Expectation; [2]coverage; [3]normalized volume; [4]number of spots identified as the same protein; [5]total volume (total volume of all spots identified as the named protein). (E) = experimental; (T) = theoretical.

belonged to a metabolic pathway. Most of the proteins identified in this group were enzymes or enzyme subunits related to energy metabolism, belonging to the glycolysis (5 proteins), β-oxidation (2 proteins), tricarboxylic acid cycle (7 proteins) and electron transport and oxidative phosphorylation (11 proteins) pathways. As examples, aconitase, fumarate hydratase, pyruvate dehydrogenase, and enolase play important roles in the tricarboxylic acid cycle and NADH dehydrogenase isoforms and cytochrome c reductase are subunits of the complexes from the respiratory chain. We also identified members of the energy transduction (creatine kinase) pathway; significantly, a high number of spots were identified as creatine kinase M isoforms (Table 1, Figure 1), which catalyzes the transphosphorylation reaction of mitochondrial ATP to phosphocreatine and ADP for cytoplasmic ATP synthesis (18). The creatine kinase pathway is an important complementary pathway under conditions of high ATP demand (19). We also identified other members of the lipid metabolism pathway, as well as three proteins involved in nucleotide/nucleic acid metabolism.

The identification of a significant number of proteins involved in stress (19%), in the immune response (4%) and in apoptotic (3%) processes reinforces their importance in the pathogenesis of CCC. Among the stress proteins, the most frequently identified were heat shock proteins (HSP) and cognates. In the present study, 10 HSP were identified (isoforms of HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, and HSP90). Crystallin is also a member of this protein superfamily (20). Oxidative stress-related proteins such as peroxiredoxin and both Cu/Zn and Mn superoxide dismutases were also frequently identified; these proteins are antioxidants and protect the cell against free radicals, especially reactive oxygen intermediates (21).

Analysis of the proteomic profile of the CCC myocardium also identified proteins

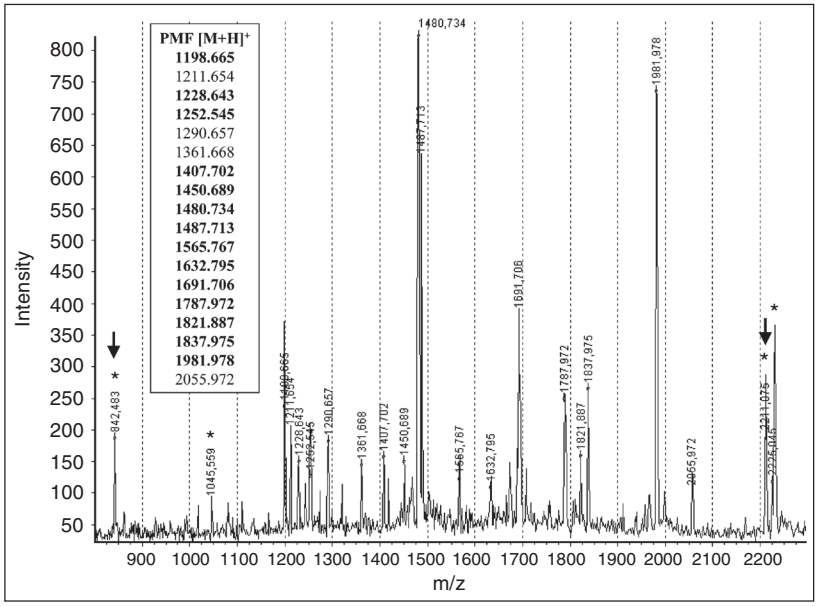


Figure 2. MALDI-ToF mass spectrum of the tryptic products from a spot. The peptide mass fingerprinting (PMF) list used for protein identification in the databanks is shown. *Trypsin autolysis peptides used for internal calibration. Peaks that appeared in all spectra were not included in the PMF list. In bold, the m/z values from the PMF list that were matched with the identified protein from the database. This spectrum was identified as a heat shock 70-kDa protein 8 isoform 2 (expectation: 0.003, coverage: 37.1%) using the non-redundant NCBI databank (*Homo sapiens*).

Table 2. Functional classification of the proteins identified in the myocardium from patients with chronic Chagas' disease cardiopathy.

Functional classification	%
1. Structural and contractile proteins	19
2. Metabolism	38
2.1. Glycolysis	12
2.2. Tricarboxylic acid cycle	17
2.3. Oxidative phosphorylation and electron transport	26
2.4. Energy transduction	5
2.5. Lipid metabolism/ß oxidation	14
2.6. Nucleotide and nucleic acid metabolism	7
2.7. Other metabolism proteins	19
3. Stress response	20
4. Immune response	4
5. Apoptosis	3
6. Cell division and proliferation	2
7. Cell signaling and control of transcription and translation	4
8. Other functions	12

The functional classification of the identified proteins was adapted from the Gene Ontology classification using the FatiGO tool (http://fatigo.bioinfo.cipf.es).

related to the immune system, such as immunoglobulins, T cell receptor ß chain, HLA class I molecule, and granzyme A. The expression of HLA class I and granzyme A is increased expression in the myocardium from CCC patients (7,8). Granzyme A, a protein known to be produced by CD8+ cytotoxic T cells - which are highly abundant in CCC myocardium (22) - triggers apoptosis of target cells in the presence of CD8+ T cell cytotoxicity (23). Regarding proteins related to the apoptotic process, we found caspases 2 and 8 in CCC heart whose sequential activation plays a central role in cell apoptosis (24).

Proteins related to cell division and proliferation and related to cell signaling and to the control of transcription and translation were 2 and 4% of the identified proteins, respectively. Some of these proteins were: prohibitin, which plays a role in regulating proliferation and inhibits DNA synthesis (25), Forkhead box P4 isoform 1, which is a transcriptional repressor that has been involved in cardiac morphogenesis (26), and protein disulfide isomerase-associated 3, which is classified as a signal transduction protein, but which could also be classified as an electron transport protein and plays a role in the oxidative process (27).

Several spots from the CCC gels, with different pI and mass, were identified by PMF as the same protein, such as aconitase, creatine kinase M chain, and heat shock 70-kDa protein, which were identified in 7, 8, and 6 spots, respectively. Structural and contractile proteins, such as several forms of actin (ACTA1, ACTA2, ACTC, ACTG2, ACTN2), desmin, myosin (MYL3 and MYL7), and vimentin were also identified with different pI values. These could be a result of post-translational modifications such as oxidation, phosphorylation, acetylation, or other processes. Some proteins presented differences in both mass and pI compared to the Swiss-Prot database, such as class I major histocompatibility complex G (HLA-G), which shows a difference between the experimental and theoretical value of 2.4 pI units, while the theoretical mass was 49 kDa less than the experimental mass. The same occurred with immunoglobulin heavy chain (IGHG2) which showed a difference between the experimental and theoretical value of 1.6 pI units, and the theoretical mass was 7.4 kDa less than the experimental mass.

In order to validate the mass spectrometric identification of proteins, we selected 5 representative identified proteins (caspase 8, caspase 2, hsp60, Cu/Zn superoxide dismutase, and protein disulfide isomerase 3) for further analysis by immunoblot with the aid of specific monoclonal antibodies, in tissue samples from 6 CCC patients (Figure 3). We identified protein bands of the expected molecular weights reacting with the 5 specific antibodies in all samples tested, con-

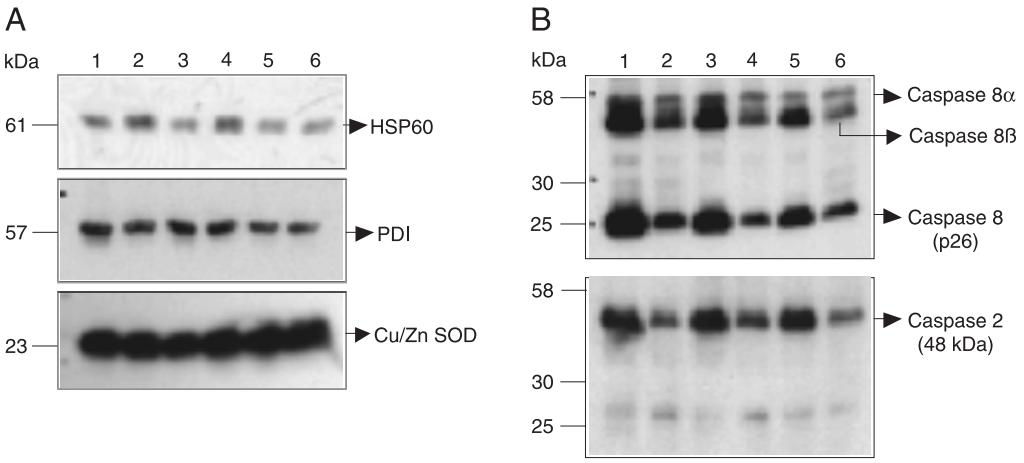


Figure 3. Validation of selected proteins by Western blot analysis of 6 myocardium samples from patients with chronic Chagas' disease cardiopathy. *A*, Identification of HSP60 (61 kDa), PDI (~55 kDa) and CuZn SOD (~23 kDa), which are involved in the oxidative stress process. *B*, Identification of apoptotic proteins, α and ß caspase 8 (~58 kDa) and caspase 2 (48 kDa). The processed form of caspase 8 (~26 kDa) was also identified. HSP = heat shock protein; PDI = protein disulfide isomerase; SOD = superoxide dismutase.

firming the existence of proteins identified by PMF. Furthermore, we observed the processed forms of caspase 8, indicating its possible activation.

Discussion

We describe the protein profile of the myocardium from patients with chronic Chagas' disease cardiomyopathy. To our knowledge, although data from several differential proteome analyses in myocardial samples are available in the literature, the present study is the first report on the myocardial protein profile of CCC patients. Besides identifying the abundant structural and contractile myocardial proteins, this approach allowed us to identify proteins not expected to be found in normal myocardium, such as stress and oxidative stress proteins, apoptosis effector molecules and proteins involved in the immune response.

Structural proteins such as sarcomeric actomyosin complex constituents, as well as cytoskeletal proteins, were frequently identified, as expected, since sarcomeric contractile proteins are the most abundant proteins in the myocardium. Among the structural proteins, the atrial isoform of MYL4 was identified in the CCC ventricle samples. Ventricular expression of atrial proteins has been observed in cardiac hypertrophy and has been ascribed to reversal of myocytes to an embryonic program of gene transcription (16). Vimentin, highly expressed in fibroblasts, was also identified, in agreement with the intense fibrotic process known to occur in CCC heart tissue (17). We could also identify matrix metalloproteinase 13 (MMP13), also called collagenase-3, which is expressed by different cell types including stromal fibroblasts. MMP13 degrades collagens I, II, III, gelatin, fibronectin, laminin, and tenascin (28). Other MMP such as MMP9 (29) has been reported to play a role in cardiac remodeling. Thus, we may suggest that MMP13 could also be involved in the intense remodeling that occurs in the CCC myocardium.

The finding that 27% of the identified proteins belong to the different pathways of energy metabolism that directly participate in the generation of ATP (glycolysis, ß-oxidation, tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation, and creatine kinase system) (Table 1) is consistent with the fact that the heart requires significant energy for normal cardiac function (19,30). Moreover, most of the cardiac diseases in which mechanical dysfunction development occurs are associated with a deficit in energy production, often generated by disturbances in one or more metabolic steps of the ATP production pathways (19).

A significant number of HSP and cognates (40 spots, 13 distinct HSP) were identified in CCC myocardium. Transient HSP synthesis protects cellular homeostasis after exposure to heat and to a wide spectrum of stressful and potentially deleterious stimuli (31,32). Accumulating evidence has implicated HSPs as mediators of myocardial protection, particularly in experimental models of ischemia and reperfusion injury (31). Different protective functions have been attributed to HSPs, including repairing ion channels, restoring redox balance, interacting with nitric oxide-induced protection, inhibiting proinflammatory cytokines, and preventing activation of the apoptosis pathway (31). The significant number of spots identified as HSPs in the CCC samples supports their role in myocardial protection. We could identify 12 spots as isoforms of HSP70, which is expressed at low levels in normal tissue and is rapidly induced in response to ischemic stress (33). The increase in myocardial HSP60 production has also been associated with the development of chronic heart failure (32).

Multiple spots were identified as oxidative stress-related proteins, such as peroxiredoxin and both Cu/Zn and Mn superoxide dismutase. Studies on animal models have

suggested that a chronic increase in oxidative stress in the myocardium, possibly due to impairment of superoxide dismutase and other antioxidant pathways, could contribute to myocardial remodeling and failure (34). A murine model of *T. cruzi* infection showed that the progressive severity of disease of infected mice is associated with increased oxidative damage in the myocardium, which seems to result from enhanced oxidant production coupled with diminishing antioxidant defense (35).

Proteins that play a role in immune processes were also detected in CCC myocardium. T cell receptor and immunoglobulin are consistent with the mononuclear infiltrate that is a hallmark of CCC. Moreover, these findings are technically interesting, since 2-D gel electrophoresis/PMF proteomic analysis is expected to identify only the most abundantly expressed proteins from the cardiac cells, rather than proteins from a comparatively small infiltrating inflammatory cell population observed in CCC myocardium. We also identified granzyme A, that initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis (36) and is one of the three key components of the lytic granules of CD8+ T cells, which constitute the majority of the mononuclear infiltrate (22). However, one cannot rule out the possibility that these findings are due to blood contamination.

In our profile experiment we found caspases 2 and 8. Caspase 8 plays a role in CD95- and tumor necrosis factor-induced cell death (24). Apoptosis has been associated with heart damage in numerous diseases, such as viral infection, myocardial infarction, diabetes, and regression of hypertrophy (37,38). Apoptosis assessed by the TUNEL method has been shown in CCC, and myocardial cell loss by apoptosis may contribute to heart failure (39). This is reinforced by the identification of activated caspase 8 forms in all 6 CCC myocardium samples (Figure 3).

The observation of several spots identified by PMF as the same protein, but showing distinct pI's may represent different isoforms of the protein, post-translational modifications or technical artifacts of the 2-D methodology. Post-translational modifications such as phosphorylation or acetylation may be visualized on 2-D electrophoresis gels as a "train of spots" differing only by their pI, and have been observed previously by other investigators. These protein modifications were not characterized in the present study, but such trains of spots were observed in some structural and contractile proteins such as several forms of actin (ACTA1, ACTA2, ACTC, ACTG2, ACTN2), desmin, MYL3 and MYL7, and vimentin, that were identified with different pI values. Other spots from the CCC gels, with different pI and mass, were also identified as the same protein, such as aconitase, creatine kinase M chain, and heat shock 70-kDa protein that were identified in 7, 8, and 6 spots, respectively. The reason for this large number of isoforms shown by some proteins is not known. Literature data suggest that a subset of proteins from cardiac mitochondria appear to be susceptible to double oxidation of their tryptophan residues (40). The fact that some proteins presented differences between experimental and theoretical mass and pI (e.g., HLA-G and IGHG2) could be due to the matching with sequence fragments in the databanks, rather than complete protein sequences.

Several isoforms of the same protein showing distinct experimental mass and pI may also represent hydrolytic fragments formed during breakdown of the parent molecules *in vivo* or *in vitro*, with oxidation forms resulting from the 2-D gel processing and precursors arising during protein assembly. Another limitation of the present study was that the proteins identified here may not originate from the cardiac tissue itself. As in most mammalian organs, the involvement of vascular tissue needs to be considered, and this may explain the identification of

smooth muscle forms of actin. Blood-derived proteins were also found, including albumin, hemoglobin and transferrin.

Proteomic analysis including 2-D gel electrophoresis and PMF has allowed us to identify 246 matched protein spots, representative of 112 distinct proteins, in myocardial tissue from end-stage CCC patients. This paper has described for the first time a significant expression of oxidative stress and apoptosis-related proteins in CCC heart tissue, suggesting the possible participation of such processes in CCC pathogenesis, a subject that is currently under investigation.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Mario Palma (Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, SP, Brazil) and Drs. Simone Fonseca, Angelina Bilate and Kellen Fae (Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil) for critical readings and discussion.

References

1. Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 14-15.
2. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1997; 60: 187-193.
3. Freitas HF, Chizzola PR, Paes AT, Lima AC, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 2005; 102: 239-247.
4. Higuchi ML, De Morais CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol* 1987; 10: 665-670.
5. Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83: 165-172.
6. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 2001; 17: 99-107.
7. Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 637-644.
8. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 192-200.
9. Cunha-Neto E, Kalil J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2001; 34: 187-192.
10. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 2002; 18: 262-265.
11. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003; 71: 1185-1193.
12. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenutti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005; 167: 305-313.
13. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ Res* 2001; 88: 763-773.
14. Sutton CW, Pemberton KS, Cottrell JS, Corbett JM, Wheeler CH, Dunn MJ, et al. Identification of myocardial proteins from two-dimensional gels by peptide mass fingerprinting. *Electrophoresis* 1995; 16: 308-316.
15. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
16. Schwartz K, Boheler KR, de la Bastie D, Lompre AM, Mercadier JJ. Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. *Am J Physiol* 1992; 262: R364-R369.
17. Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 1991; 30: 335-340.
18. Wallimann T. Dissecting the role of creatine kinase. *Curr Biol* 1994; 4: 42-46.
19. Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res* 2003; 34: 89-99.
20. Ingolia TD, Craig EA. Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 2360-2364.
21. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-1312.
22. Higuchi MD, De Brito T, Reis MM, Bellotti G, Pereira-Barretto AC, Pileggi F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol* 1993; 2: 101-105.
23. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Mullbacher A, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 2004; 167: 457-468.
24. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1): 1-16.

25. Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, Murphy LJ. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* 2005; 11: 192-197.
26. Li S, Zhou D, Lu MM, Morrisey EE. Advanced cardiac morphogenesis does not require heart tube fusion. *Science* 2004; 305: 1619-1622.
27. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40813-40819.
28. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89: 201-210.
29. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000; 106: 55-62.
30. Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH, et al. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 2031-2042.
31. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 411-416.
32. Tanonaka K, Yoshida H, Toga W, Furuhama K, Takeo S. Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 520-525.
33. Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995; 95: 1446-1456.
34. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 506-514.
35. Wen JJ, Vyatkina G, Garg N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1821-1833.
36. Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, Ley TJ. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity* 1999; 10: 595-605.
37. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000; 87: 1123-1132.
38. Freude B, Masters TN, Kostin S, Robicsek F, Schaper J. Cardiomyocyte apoptosis in acute and chronic conditions. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 85-89.
39. Tostes S Jr, Bertulucci Rocha-Rodrigues D, de Araujo Pereira G, Rodrigues V Jr. Myocardiocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol* 2005; 99: 233-237.
40. Taylor SW, Fahy E, Murray J, Capaldi RA, Ghosh SS. Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 19587-19590.

MAJOR ARTICLE

Distinct Outcomes of *Trypanosoma cruzi* Infection in Hamsters Are Related to Myocardial Parasitism, Cytokine/Chemokine Gene Expression, and Protein Expression Profile

Angelina M. Bilate,[1,2,a] Priscila C. Teixeira,[1,2] Susan P. Ribeiro,[1,2] Thales de Brito,[3] Ana Maria Silva,[3] Momtchilo Russo,[4] Jorge Kalil,[1,2,5] and Edecio Cunha-Neto[1,2,5]

[1]Heart Institute (InCor) and [2]Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo Medical School, and [3]Institute of Tropical Medicine and [4]Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, and [5]Institute for Investigation in Immunology—Millennium Institutes, São Paulo, Brazil

Background. *Trypanosoma cruzi*–infected outbred hamsters reproduce the range of different outcomes of Chagas disease noted in humans. We tested whether myocarditis, its mediators, and myocardial protein expression are related to the severity of the acute phase of *T. cruzi* infection in the hamster model.

Methods. Myocardium left ventricles (LVs) obtained from Syrian hamsters infected with *T. cruzi* were collected 21 days after infection. Myocarditis and the *T. cruzi* nest/antigen area were analyzed by histological and morphometric analysis. Cytokine and chemokine messenger RNA (mRNA) expression was analyzed using real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Differentially expressed proteins were identified by 2-dimensional electrophoresis, followed by mass spectrometry.

Results. While in the acute phase of infection, 50% of animals displayed weight loss and signs of acute-phase infection (hereafter referred to as "acute-phase signs" [APS]) (e.g., lethargy, vomiting, and diarrhea). Both the *T. cruzi* nest/antigen area and the expression of interferon-γ, tumor necrosis factor–α, interleukin-10, and CCL3 mRNA were significantly increased in the LVs of animals with APS, compared with the LVs of animals without APS. Animals with APS, those without APS, and uninfected animals demonstrated distinct myocardial expression of contractile, stress response, and metabolism proteins.

Conclusions. The distinct outcomes of acute *T. cruzi* infection in Syrian hamsters are related to cardiac parasitism, cytokine expression, and changes in the expression of structural/contractile and stress response proteins that may be associated with alterations in the cardiomyocyte cytoskeleton.

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects ~13 million people in Latin America [1]. The consequences of acute *T. cruzi* infection can range from asymptomatic myocarditis, which affects the majority of infected individuals, to intense myocarditis accompanied by blood and tissue parasitism, which is found in ~10% of those who are infected [2, 3]. This subset of individuals may develop fulminant myocarditis, which is often fatal [4, 5]. On the other hand, the majority of infected individuals do not show clinical symptoms of myocarditis, but they may, decades later, develop an inflammatory cardiomyopathy known as "chronic Chagas disease cardiomyopathy." The mechanisms that govern this differential progression remain unknown.

Data from murine models show that inflammatory cytokines play a central role in *T. cruzi* infection. The innate and adaptive immune responses triggered by the parasite lead to exacerbated production of such inflam-

Received 16 July 2007; accepted 12 November 2007; electronically published 3 July 2008.

Potential conflicts of interest: none reported.

Presented in part: 16th European Congress of Immunology, Paris, France, 6–9 September 2006 (abstract 2650); Experimental Biology 2006, San Francisco, California, 1–5 April 2006 (abstract 5401).

Financial support: São Paulo State Research Foundation (FAPESP; grants 00/14549-4 and 01/00729-3). A.M.B. and P.C.T. were supported by FAPESP (grants 06/56514-9 and 04/15322-4), and E.C.-N. and J.K. are recipients of productivity awards from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (grants 302970-2004-5 and 307541-2003-7).

[a] Present affiliation: Program of Molecular Pathogenesis, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine, New York, New York.

Reprints or correspondence: Dr. Edecio Cunha-Neto, Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Bloco II, 9° andar, São Paulo, SP 05403-000, Brazil (edecunha@gmail.com).

The Journal of Infectious Diseases 2008; 198:614–23
© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2008/19804-0022$15.00
DOI: 10.1086/590347

matory cytokines as interleukin (IL)–12, tumor necrosis factor (TNF)–α, and interferon (IFN)–γ and such chemokines as CCL3 (macrophage inflammatory protein [MIP]–1α), CXCL10 (IFN-γ–inducible protein–10), and CCL5 (RANTES [regulated on activation, normally T cell expressed and secreted]) [6, 7]. Production of inflammatory cytokines is associated with protection against *T. cruzi* infection, and TNF receptor 1 (TNFR1)– or IFN-γ receptor (IFNγR)–deficient mice die of infection more rapidly than do wild-type mice [8, 9]. On the other hand, it has been reported that, after *T. cruzi* infection, susceptible mouse strains display higher production of TNF-α than do resistant strains [10]. Accordingly, elevated levels of TNF-α were associated with increased parasitemia, wasting, and mortality during acute *T. cruzi* infection [11]. Even though cytokines and chemokines are essential for controlling parasite dissemination, excessive production of these mediators often results in tissue damage.

Advances in high-throughput proteomic analysis now allow for direct evaluation of large-scale protein profiles and identification of differentially expressed proteins, contributing to our understanding of disease mechanisms [12]. Using a proteomics approach, we recently described an inventory of myocardial proteins from patients with severe chronic Chagas disease cardiomyopathy [13], which allowed us to identify proteins of high abundance in the tissue, including proteins with structural, metabolic, and stress response functions.

To investigate the mechanisms involved in differential progression of Chagas disease, we developed a hamster model of *T. cruzi* infection that reproduces the range of different outcomes of Chagas disease in humans [14]. In the present study, we used the hamster model to investigate whether myocarditis and its mediators are related to the severity of the acute phase of *T. cruzi* infection. To identify novel molecular markers of disease severity, we also analyzed protein expression profiles in the myocardium of *T. cruzi*–infected hamsters, by use of the proteomics approach. On the basis of our previous findings, which showed that a subset of animals that died 21–28 days after infection displayed a high cardiac parasitism but a virtual absence of parasites in the bloodstream (A.M.B. and E.C.-N., unpublished data), we chose, in the present study, to use 21 days after infection as the time point for all analyses. In our model, high cardiac parasitism in the acute phase of infection was associated with expression of TNF-α, IFN-γ, IL-10, and CCL3 (MIP-1α), as well as with differential myocardial expression of structural/contractile, stress response, and metabolism proteins.

METHODS

Hamsters, parasites, and infection. Twelve-week-old, female, outbred Syrian hamsters *(Mesocricetus auratus)* were infected intraperitoneally with 10^5 *T. cruzi* (Y strain) blood trypomastigotes obtained from infected BALB/c mice. As a control, healthy hamsters were injected with saline solution. Parasitemia was measured at 4, 7, 13, and 21 days post infection (PI) by means of direct parasite counting, as described elsewhere [15]. All protocols were approved by our internal review board.

Systemic signs of acute-phase infection (hereafter referred to as "acute-phase signs" [APS]) and weight loss. Twenty-one days PI, animals were evaluated for the presence of such APS as lethargy and wasting. For weight loss calculation, animals were weighed before and 21 days after infection.

Myocardial histopathological and immunohistochemical analysis. Ventricles were cut at the level of the papillary muscles, fixed in buffered formalin solution, embedded in paraffin, and cut into 5-μm sections. Sections were stained with hematoxylin-eosin or were used for the detection of *T. cruzi* antigens by means of the immunoperoxidase method. For the latter use, sections were deparaffinized and incubated with polyclonal anti–*T. cruzi* serum obtained from rabbits immunized with *T. cruzi* whole homogenate. Biotinylated goat anti–mouse/rabbit IgG and Duet Strepto ABComplex (Dako) were used as a secondary antibody and for amplification, respectively. Diaminobenzadine (Sigma Chemical) was used as chromogen. Preimmune rabbit serum was used as a negative control. Inflammation and *T. cruzi* nest/antigen areas were measured using computer-aided morphometric analysis with MetaMorph software (version 5.0; Molecular Devices). The area of myocarditis or *T. cruzi* nest/antigen of all fields (20 fields/section; original magnification, $\times$200) from 2 nonconsecutive sections was calculated and then was divided by the total area of the section. The *T. cruzi* nest/antigen area includes the area of intact amastigote nests and of antigens scattered throughout the myocardium.

RNA isolation, reverse transcription, and real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated from left ventricle samples by use of the RNeasy kit for fibrous tissue (Qiagen). Contaminating DNA was removed by treatment with ribonuclease-free deoxyribonuclease I. cDNA was obtained from 5 μg of total RNA by use of SuperScript I reverse transcriptase (Invitrogen). mRNA expression was analyzed by real-time quantitative RT-PCR performed with SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 250 nmol/L of sense and antisense primers, with the use of an ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems). The following primers were designed using Primer Express software (version 3.0; Applied Biosystems): glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) (DQ403055), 5'-CTGACATGCCGCCTGGAG-3' and 5'-TCAGTGTAGCCCAGGATGCC-3'; TNF-α (AF315292), 5'-TCAAAATTCGAACGACAAGCC-3' and 5'-TTGGCCAGGAGGGCATT-3'; IFN-γ (AF034482), 5'-GAAGCTCACCAAGATTCCGGTAA-3' and 5'-TTTTCGTGACAGGTGAGGCAT-3'; IL-10 (AF046210), 5'-GGCAACTGCAGCGCTGTC-3' and 5'-AGACGCCTTTCTCTTGGAGCTTAT-3'; CCL3 (AY819019), 5'-TGCTCTGAGCCAGGTGTCATT-3' and 5'-CAGCGACGTACTCTTGGACCC-3'; CCL5 (NM_013653), 5'-CGTGCCCAC-

ATCAAGGAGTATT-3' and 5'-CACACACTTGGCGGTTCTT-TC-3'; CXCL10 (AY007988), 5'-TCCACGTGTTGAGATCATTG-CTA-3' and 5'-GCTTTCAGTAAATTCTTGATGGCC-3'; CXCR3 (NM_009910), 5'-TCAAGTGCTAGATGCCTCGGA-3' and 5'-TC-GCTCTCGTTTTCCCCAT-3'; and CCR2 (NM_009915), 5'- TCT-TCTTGACCACCTTCCAGGA-3' and 5'-TGCAGCAGTGTGTCA-TTCCAA-3'. After every PCR, an amplicon melting point curve was obtained. This yielded a single peak with the expected temperature provided by Primer Express software, confirming the specificity of the PCR. GAPDH mRNA expression was used for normalization. The relative amount of mRNA was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [16].

Myocardial protein expression profile. Left ventricular samples obtained from uninfected and infected animals were pooled into 3 groups: CTR, defined as uninfected controls ($n = 6$); APS$^-$, defined as infected animals without APS ($n = 6$); and APS$^+$, defined as infected animals with APS ($n = 6$). Protein separation and identification were performed as described elsewhere [13]. In brief, left ventricle tissue was homogenized in 1% SDS and 0.5 mmol/L TLCK (*N*-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone). Proteins (250 μg/pool/gel) were separated using 2-dimensional electrophoresis. Isoelectrofocusing was performed on immobilized pH gradient gel strips with a linear pH range (pH, 3.0–10.0) (Immobiline DryStrip gels; Amersham Biosciences). SDS-PAGE was run on a 12.5% polyacrylamide gel. Colloidal Coomassie blue–stained gels were digitized using ImageScanner, and spots were selected and matched in the 3 gels by use of ImageMaster 2D Elite software (version 3.10; Amersham Biosciences). Differentially expressed spots were analyzed as follows: first, the normalized volume of spots was calculated by dividing the volume of each spot by the total volume of all spots in the same gel. Next, the normalized volumes for spots of the APS$^+$ and APS$^-$ gels were divided by those for corresponding spots in CTR. Volume ratios >2.0-fold or <0.5-fold were considered to be up- or downregulated, respectively. For protein identification, all selected spots were excised, subjected to trypsin digestion (10 μg/mL), and processed using a robotic workstation (Ettan Spot Handling Workstation; Amersham Biosciences). Tryptic fragments were analyzed using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Proteins were identified by comparing the peptide mass fingerprint (PMF) of each spot with virtual tryptic digestion fragments, by use of (1) MALDI-TOF Evaluation software (Amersham Biosciences) along with the nonredundant National Center for Biotechnology Information database restricted to Rodentia proteins or (2) the Mascot tool (http://www.matrixscience.com) and Swiss-Prot databases. For differential protein expression analysis, we matched spots in the 3 gels and considered the PMF identification of 1 of the gels. The functional classification of the identified proteins was adapted from the Gene Ontology classification by use of the FatiGO tool (http://fatigo.bioinfo.cipf.es).

Statistics. Descriptive statistics are presented as the median value and range. The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used for comparison of 2 groups. Correlation analysis was performed using a nonparametric Spearman correlation test. $P < .05$ was considered to be statistically significant.

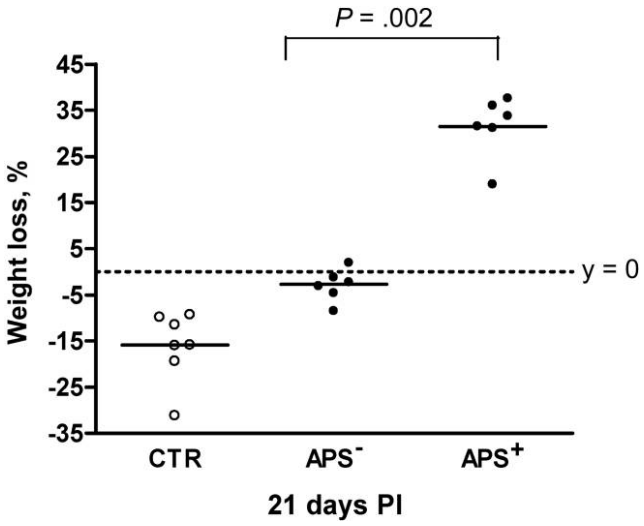


Figure 1. Weight loss during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *T. cruzi*–infected hamsters were weighed before infection and 21 days post infection (PI). Weight loss was calculated using the following equation: 100 − (BW 21 days PI/BW before infection × 100), where "BW" denotes body weight. APS$^-$, infected animals without signs of acute-phase *T. cruzi* infection; APS$^+$, infected animals with signs of acute-phase *T. cruzi* infection; CTR, uninfected controls.

RESULTS

APS, weight loss, and parasitemia. Twenty-one days PI, 6 of 12 infected animals displayed systemic APS, including lethargy, vomiting, and diarrhea, whereas the remaining animals did not show any signs of disease. Weight loss at 21 days PI was significantly greater among APS$^+$ animals than among APS$^-$ animals (figure 1). Uninfected animals showed no significant weight loss (figure 1). Parasitemia was measured 4, 7, 13, and 21 days PI. Two of 6 APS$^+$ animals had detectable parasitemia only at day 7 PI, and 1 of 6 APS$^-$ animals had detectable parasitemia at days 4 and 7 PI. At days 13 and 21 PI, none of the infected animals displayed detectable parasitemia, regardless of APS status (data not shown).

Histopathological analysis: parasitism and myocarditis. The *T. cruzi* nest/antigen area in myocardium was significantly higher in APS$^+$ animals than in APS$^-$ animals (figure 2). Animals in both infected groups displayed intense myocarditis. Although no significant differences in the area of inflammation were observed between APS$^+$ and APS$^-$ animals, the pattern of inflammatory cell distribution differed between APS$^+$ and APS$^-$ animals. Whereas APS$^+$ animals showed numerous intact nests in the myocardium and inflammatory infiltrate in areas distant from these nests, nests in APS$^-$ animals were frequently disrupted and were surrounded by inflammatory cells (figure 2). The area of *T. cruzi* nest/antigen was

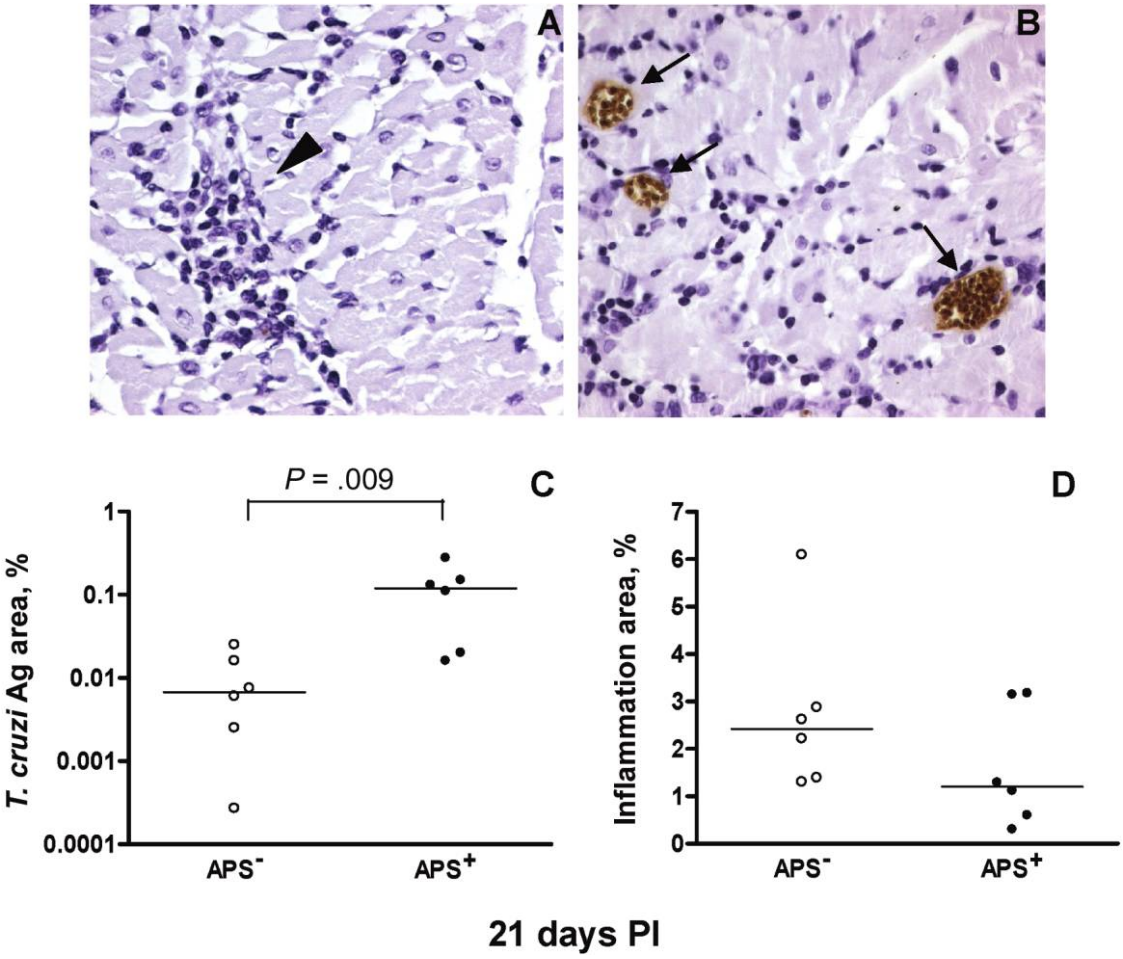


Figure 2. Cardiac parasitism and myocarditis in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Representative myocardial sections from an infected animal without signs of acute-phase infection (APS$^-$) *(A)* and an infected animal with signs of acute-phase infection (APS$^+$) *(B). T. cruzi* nests *(in brown)* after use of the immunoperoxidase method with *T. cruzi* antiserum. The arrows point to amastigote nests, and the arrowhead points to an inflammatory infiltrate. The area of *T. cruzi* nest/antigen (Ag) *(C)* and the area of inflammation *(D)* were measured using computer-aided morphometry. PI, post infection.

not significantly correlated to the area of myocarditis, suggesting that intensity of parasitism was not associated with local inflammation.

Expression of cytokine and chemokine mRNA. Myocardial expression of TNF-α, IL-10, IFN-γ, and CCL3 mRNA was significantly higher in the APS$^+$ animals than in the APS$^-$ animals (figure 3). Expression of CCL5, CXCL10, CXCR3, and CCR2 mRNA did not differ significantly between the infected groups. Nevertheless, all infected animals demonstrated high levels of expression of these cytokines, chemokines, and chemokine receptors (a >2-fold increase compared with uninfected controls) (figure 3). Moreover, we found a positive correlation between the *T. cruzi* nest/antigen area and expression of TNF-α, IL-10, CCL3, and CXCR3 in all infected animals (table 1).

Differential protein expression in myocardium. Figure 4 shows the 2-dimensional electrophoresis gels of all 3 groups (CTR, APS$^-$, APS$^+$) and all spots selected for analysis. Table 2 shows the protein expression profile of healthy uninfected young hamsters. As expected, the majority of spots that were identified correspond to abundant proteins, such as structural/contractile and metabolism proteins (table 2). We were also able to identify less abundant proteins, such as cellular stress response and immune response proteins (table 2). Because of the limited availability of *M. auratus* sequences in the databases used, most identified proteins were matched to other Rodentia species.

The presence of several spots with a different isolelectric point (pI) or molecular weight (MW) (multiple electrophoretic forms) corresponding to the same protein (one with the same accession number in the database) suggests the occurrence of posttranslational modifications, such as oxidation, phosphorylation, acetylation, and glycosylation, among others [17]. We were able to identify several proteins that may have undergone such modifications, such as cardiac muscle α actin (ACTC1); myosin regulatory light chain–2 (MYL2); myosin, light polypeptide 3 (MYL3); desmin (DES); and α crystallin B chain (CRYAB) (tables 2 and 3).

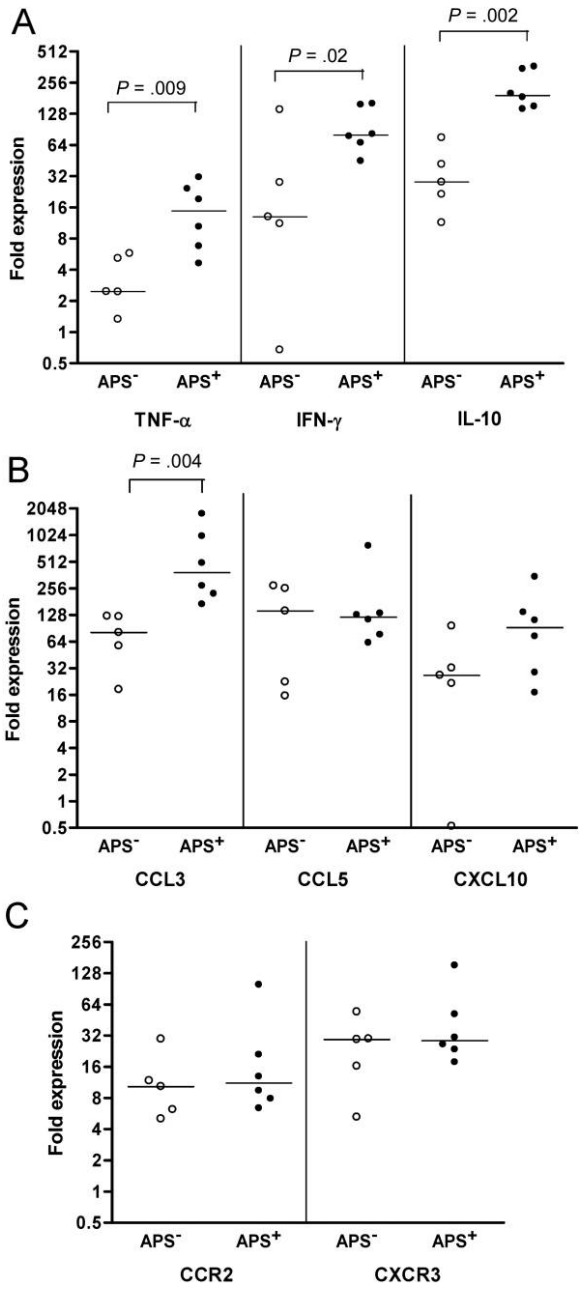


Figure 3. Cytokine and chemokine mRNA expression in the myocardium. Fold expression of mRNA in *Trypanosoma cruzi*–infected animals without signs of acute-phase infection (APS^-) and in *T. cruzi*–infected animals with signs of acute-phase infection (APS^+), compared with that in uninfected controls, was analyzed using real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. The horizontal bar denoted the median value. *A,* Cytokines. *B,* Chemokines. *C,* Chemokine receptors. IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

Table 3 shows the identification of 12 of 29 spots differentially expressed in APS^+ or APS^- animals compared with uninfected animals. Spots corresponding to the structural/contractile proteins DES, ACTC1, MYL2, and MYL3 were exclusively up-regulated in the myocardium of APS^+ animals (table 3). On the other hand, 2 of 3 electrophoretic forms corresponding to cardiac muscle α-actin were down-modulated in the myocardium of APS^- animals (table 3). As for stress response proteins, 2 electrophoretic forms of α-crystallin B chain were up-regulated in both infected groups, but, for form 1, the fold increase in the APS^- group was 2.5 higher than that in the APS^+ group (table 3). In addition, 2 different heat shock proteins (HSPA5 and HSPA9) were up-regulated only in APS^- animals (table 3). We also found that 2 metabolism proteins, aspartate aminotransferase and pyruvate dehydrogenase–β, were up-regulated in APS^- animals only.

Because some, but not all, electrophoretic forms of a given protein were modulated in the myocardium of APS^- or APS^+ animals, we analyzed fold expression by considering the sum of all spots corresponding to a same protein. This analysis showed that none of the proteins present in several electrophoretic forms (ACTC1, DES, MYL2, MYL3, and CRYAB) were up- or down-regulated in the pools from APS^- or APS^+ animals, compared with pools from CTR animals (table 3).

DISCUSSION

In the present study, using a single combination of a parasite strain (Y strain) and a genetically heterogeneous host (Syrian hamster), we observed 2 distinct disease profiles upon acute *T. cruzi* infection: (1) absence of APS, low cardiac parasitism, and modestly increased expression of cytokine mRNAs; decreased expression of selective isoforms of structural/contractile proteins; and increased expression of stress response and metabolism proteins; and (2) presence of APS, high cardiac parasitism, markedly increased expression of cytokine mRNAs, and in-

Table 1. Correlation between the intensity of cardiac parasitism and the expression of cytokines and chemokines.

Fold expression of mRNA	*T. cruzi* nest/antigen area[a]	
	r	*P*
TNF-α	0.66[b]	.025[b]
IFN-γ	0.42	.194
IL-10	0.69[b]	.019[b]
CCL3	0.75[b]	.008[b]
CCL5	0.36	.270
CXCL10	0.45	.164
CCR2	0.37	.264
CXCR3	0.66[b]	.029[b]

NOTE. Ag, antigen; IFN, interferon; IL, interleukin; *T. cruzi, Trypanosoma cruzi;* TNF, tumor necrosis factor.

[a] The *r* and *P* values were obtained using the Spearman correlation test.

[b] Significant correlation.

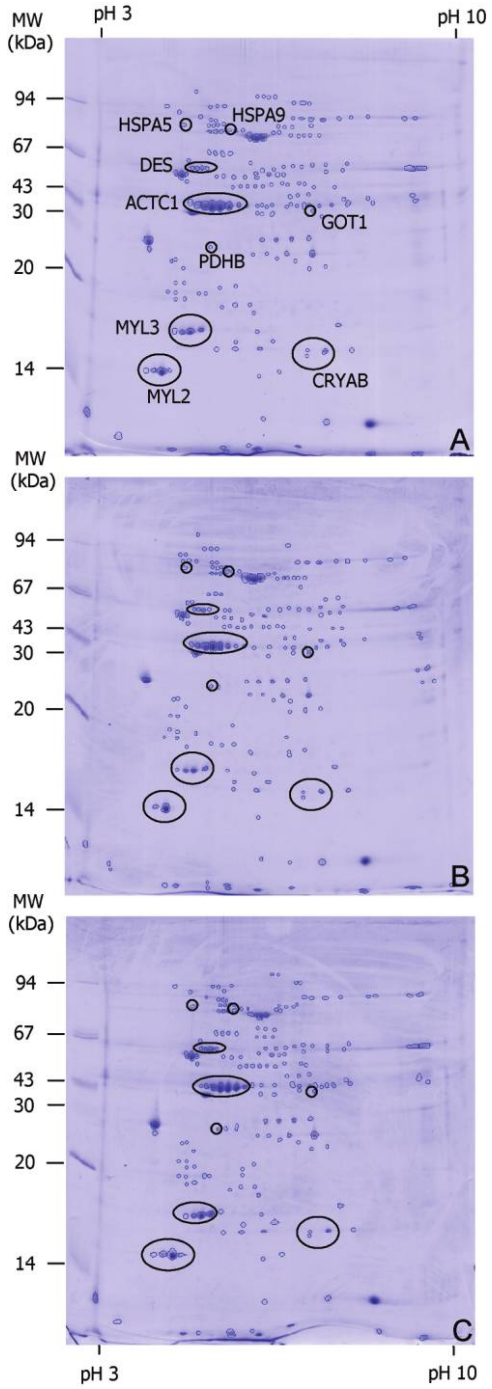


Figure 4. Two-dimensional electrophoresis gels of left ventricle homogenates obtained from uninfected animals *(A), Trypanosoma cruzi*–infected animals without signs of acute-phase infection *(B),* and *T. cruzi*–infected animals with signs of acute-phase infection *(C).* MW, molecular weight; pI, isoelectric point. All the spots selected for mass spectrometry analysis are outlined. Differentially expressed proteins are denoted by ellipses and gene symbols in panel *A*. Matched spots are also denoted by ellipses in panels *B* and *C*. ACTC1, cardiac muscle α actin; CRYAB, α crystallin B chain; DES, desmin; GOT1, glutamate oxaloacetate transaminase 1; HSPA5, heat shock protein 5; HSPA8, heat shock protein 8; MYL2, myosin regulatory light chain–2; MYL3, myosin, light polypeptide 3; PDHB, pyruvate dehydrogenase β.

creased expression of distinct isoforms of structural/contractile and stress response proteins.

The low frequency of hamsters with detectable parasitemia after infection is consistent with the findings of previous studies using the hamster model of *T. cruzi* infection [18, 19]. The apparent dichotomy between low parasitemia observed after different time points of the acute infection in both infected groups—those with high or low cardiac parasitism (data not shown)—and tissue parasitism suggests that, even though hamsters were able to efficiently control parasite growth in the bloodstream, this control was not sufficient to prevent parasite migration and replication in the heart. Moreover, these findings also suggest that the mechanisms of initial parasite control in the blood are shared both by hamsters able to control tissue parasitism and by those unable to control it. The presence of APS concomitant with high levels of tissue parasitism in a subset of infected animals probably resulted from a *T. cruzi*–induced "cytokine storm." Using a susceptible mouse strain (BALB/c), Truyens et al. [11] showed that elevated levels of TNF-α were associated with increased parasitemia, wasting, and mortality during the acute phase of *T. cruzi* infection. In addition, IL-10–deficient mice infected with *T. cruzi* were noted to develop a syndrome similar to endotoxic shock as a result of the enhanced production of TNF-α and IFN-γ [20]. The dichotomy between clinical signs and the intensity of cardiac parasitism in *T. cruzi*–infected hamsters suggests that a subset of animals controlled parasitism—either systemically or locally—more effectively than did the remaining animals. Because Syrian hamsters are outbred, it is possible that this difference may be based on a genetic component.

The higher myocardial expression of TNF-α, IFN-γ, IL-10, and CCL3 among APS$^+$ animals (figure 3) could be associated with increased cytokine stimulation due to higher cardiac parasitism. The positive correlation between the expression of TNF-α, IL-10, CCL3, and CXCR3 mRNAs and the *T. cruzi* antigen area in the heart (table 1) corroborates this hypothesis. The correlation between the levels of cytokines and chemokines produced by macrophages, dendritic cells, or Th1 cells and the intensity of parasitism suggests the participation of both innate and adaptive immune responses triggered by *T. cruzi.* This correlation argues against a protective effect of increased levels of cytokines on the control of tissue parasitism in our model.

All infected animals, regardless of intensity of cardiac parasitism and presence of disease signs, showed similar expression of CCL5, CXCL10, CCR2, and CXCR3 (figure 3) and intense myocarditis (figure 2). These findings suggest that these chemokines, although involved in the recruitment of inflammatory cells to the heart after infection, may not be essential for the control of local parasitism. Similarly, mRNA expression for CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL2 (MCP-1), and CCL5 (RANTES) is augmented in the myocardium of *T. cruzi*–infected mice during the acute phase [21].

Table 2. Protein expression profile of the uninfected hamster myocardium.

Protein function[a] and symbol	Description	UniProt[b] accession no.	Species	Expectation	Coverage, %	Peptide masses[c]	MW/pI E	MW/pI T	Normalized volume
Structural/ contractile									
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.000	23.6	6/10	39.8/4.8	42.3/5.2	0.610
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.000	23.6	6/13	39.1/5.0	42.3/5.2	1.699
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.000	23.6	6/14	38.9/5.6	42.3/5.2	3.078
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.053	17.5	6/19	38.9/5.1	42.3/5.2	3.704
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.024	24.7	3/7	20.5/4.6	17.7/5.6	0.069
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.071	24.7	4/8	20.6/4.4	17.7/5.6	0.081
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.019	15.8	4/8	38.7/6.3	42.3/5.2	0.156
ACTC1	α cardiac actin	P68033	*M. musculus*	0.000	23.6	6/10	39.1/5.7	42.3/5.2	0.777
CNN3	Calponin-3	Q9DAW9	*M. musculus*	0.045	17.0	4/6	13.6/5.7	36.6/5.5	0.232
DES	Desmin	P48675	*R. norvegicus*	0.028	13.2	5/8	51.5/5.2	53.5/5.2	0.215
DES	Desmin	P48675	*R. norvegicus*	0.000	34.8	14/26	51.2/5.1	53.5/5.2	0.606
DES	Desmin	P48675	*R. norvegicus*	0.007	17.9	7/11	51.2/5.0	53.5/5.2	0.631
MYL2	Myosin regulatory light chain–2, ventricular/ cardiac muscle isoform	P51667	*M. musculus*	0.083	22.0	4/5	11.6/4.2	18.9/4.7	0.484
MYL3	Myosin, light polypeptide 3	P09542	*M. musculus*	0.049	32.4	5/9	15.6/5.0	22.5/5.0	1.054
MYL3	Myosin, light polypeptide 3	P09542	*M. musculus*	0.013	22.1	4/9	13.6/6.1	22.5/5.0	0.351
TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	P50752	*M. musculus*	0.010	23.5	6/17	36.9/4.9	34.4/5.2	2.372
TPM1	Tropomyosin-1 α chain	P04692	*R. norvegicus*	0.000	27.0	12/25	30.1/4.1	32.7/4.7	4.037
TPM1	Tropomyosin-1 α chain	P04692	*R. norvegicus*	0.097	13.0	5/9	28.3/4.1	32.7/4.7	0.476
Metabolism									
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P47738	*M. musculus*	0.000	23.0	9/14	49.1/6.3	54.8/5.8	0.506
ATP5A1	ATP synthase subunit α, mitochondrial precursor	Q03265	*M. musculus*	0.000	23.3	8/16	51.2/9.1	58.9/9.3	1.506
ATP5B	ATP synthase subunit β, mitochondrial precursor	P56480	*M. musculus*	0.000	24.8	8/13	49.7/4.6	51.2/4.9	0.742
ATP5B	ATP synthase subunit β, mitochondrial precursor	P56480	*M. musculus*	0.000	33.9	11/21	49.1/4.8	51.2/4.9	0.612
ATP5B	ATP synthase subunit β, mitochondrial precursor	P56480	*M. musculus*	0.000	34.9	11/26	48.8/4.7	51.2/4.9	2.691
ATP5B	ATP synthase subunit β, mitochondrial precursor	P56480	*M. musculus*	0.000	16.2	5/11	46.5/4.8	51.2/4.9	0.138
NDUFS1	NADH dehydrogenase[d] Fe-S 1 protein	Q91VD9	*M. musculus*	0.009	9.4	5/5	72.9/5.3	80.8/5.5	0.136
DLST	Dihydrolipoamide *S*-succinyltransferase	Q9D2G2	*M. musculus*	0.000	18.1	6/6	48.2/5.5	49.3/9.2	0.193
DLST	Dihydrolipoamide *S*-succinyltransferase	Q9D2G3	*M. musculus*	0.000	22.7	7/8	48.2/5.6	49.3/9.2	0.227
UQCRC2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor	Q9DB77	*M. musculus*	0.006	15.0	5/8	40.3/9.0	46.9/9.0	0.330
Stress response									
CRYAB	α crystallin B chain	Q9EPF3	*S. judaei*	0.094	33.7	5/17	13.4/7.4	20.0/6.8	0.824
CRYAB	α crystallin B chain	Q9EPF3	*S. judaei*	0.057	33.7	4/12	13.0/7.0	20.0/6.8	0.02
HSPA5	78-kDa GRP (GRP78)[e]	P07823	*M. auratus*	0.026	9.2	4/6	70.4/4.7	72.6/5.1	0.238
HSPA8	heat shock protein 8	Q9QZ38	*M. musculus*	0.001	12.5	6/9	67.4/5.4	71.1/5.3	0.309
HSPA8	heat shock protein 8	Q9QZ38	*M. musculus*	0.001	13.8	7/11	67.0/5.3	71.1/5.3	0.445
HSPD1	Hspd1 protein	Q8VEF4	*M. musculus*	0.041	13.9	4/6	57.4/5.6	59.6/8.2	0.118
PRDX6	1-cys peroxiredoxin protein 2[f]	O08709	*M. musculus*	0.158	17.9	4/7	17.7/6.0	24.9/6.0	0.121
Signal transduction									
IL15RA	IL-15R α chain	Q810T6	*M. musculus*	0.038	42.3	4/11	27.3/6.6	14.0/9.8	0.359
LIME1	Lck-interacting transmembrane adapter 1	Q9EQR5	*M. musculus*	0.052	24.3	4/11	22.1/4.6	24.8/9.9	0.035
S100C	S100 calcium-binding protein A11[g]	P50543	*M. musculus*	0.073	34.4	3/7	18.8/5.7	6.9/5.0	0.173
Other									
ADAM9	Meltrin-γ[h]	Q61072	*M. musculus*	0.039	31.3	4/4	67.8/5.6	17.5/4.9	0.132
HBA	Hemoglobin subunit α	P01945	*M. auratus*	0.014	28.4	3/8	6.3/8.2	15.3/8.1	2.769
NALD2	*N*-acetylated α-linked acidic dipeptidase 2	Q9C2ZR2	*M. musculus*	0.097	19.2	3/7	24.9/7.4	19.9/5.1	0.054
NALD2	*N*-acetylated α-linked acidic dipeptidase 3	Q9CZR2	*M. musculus*	0.089	19.2	3/7	24.6/4.7	19.9/5.1	0.075
ZMYND12	Zinc finger, MYND domain containing 12	Q56GB0	*M. musculus*	0.069	12.4	4/8	6.5/6.1	41.9/5.9	2.359

NOTE. Different spots corresponding to the same protein (with the same accession no.) were considered to be different electrophoretic forms, and those with different accession nos. were considered to be different proteins. The peptide mass fingerprintings of the indicated gel were submitted to the matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) evaluation tool or the Mascot tool, by use of the nonredundant National Center for Biotechnology Information database (restricted to Rodentia). ATP, adenosine triphosphate; E, experimental molecular weight and isoelectric point; GRP, glucose-related protein; *M. auratus, Mesocricetus auratus; M. musculus; Mus musculus;* MW, molecular weight (in kilodaltons); MYND, myeloid, Nervy, and DEAF-1; pI, isoelectric point; *R. norvegicus, Rattus norvegicus; S. judaei, Spalax judaei;* T, theoretical MW and pI.

[a] Functions of the proteins were determined according to gene ontology conducted with the use of the FatiGO tool, available at: http://fatigo.bioinfo.cnio.es.
[b] Accession nos. were obtained using the UniProt tool, available at: http://www.ebi.uniprot.org.
[c] The ratio of the no. of peptides matched to the total no. of peptides.
[d] Ubiquinone.
[e] Heat shock protein 70-kDa protein 5.
[f] Peroxiredoxin 6.
[g] Calgizzarin.
[h] A desintegrin and metalloprotease domain 9.

Table 3. Differentially expressed proteins from the myocardium of *Trypanosoma cruzi*–infected hamsters.

Protein function[a] and symbol	Description	UniProt[b] accession no.	MW/pI E	MW/pI T	PMF[c]	Coverage, %	Expectation	Peptide masses[d]	Normalized volume[e]	Fold change: In APS+/CTR	Fold change: In APS−/CTR	Fold change: In APS+/APS−
Structural/contractile												
DES	Desmin	P48675	51.2/5.1	53.5/5.2	CTR	34.8	0.000	14/26	0.606	2.51[g]	1.07	2.36[g]
	Desmin (sum of 3 spots)[f]								1.452	1.85	1.01	1.83
MYL2	Myosin regulatory light chain–2	P51667	12.5/4.2	18.9/4.7	APS−	29.0	0.010	5/7	0.484	2.27[g]	1.11	2.06[g]
	Myosin regulatory light chain–2 (sum of 4 spots)[f]								4.763	1.43	1.13	1.27
MYL3	Myosin, light polypeptide 3	P09542	15.6/5.0	22.5/5.0	CTR	32.4	0.049	5/9	1.054	2.53[g]	0.96	2.63[g]
	Myosin, light polypeptide 3 (sum of 4 spots)[f]								4.798	1.49	0.81	1.83
ACTC1	Alpha-cardiac actin (form 1)	P68033	42.1/5.9	42.3/5.2	APS+	16.2	0.038	5/8	0.38	2.10[g]	0.93	2.26[g]
ACTC1	Alpha-cardiac actin (form 2)	P68033	41.7/5.8	42.3/5.2	APS+	26.5	0.000	7/16	1.076	1.38	0.44[g]	3.18[g]
ACTC1	Alpha-cardiac actin (form 3)	P68033	41.5/5.6	42.3/5.2	APS+	26.5	0.000	7/18	3.753	1.22	0.42[g]	2.90[g]
	Alpha-cardiac actin (sum of 8 spots)[f]								17.391	0.81	0.96	0.84
Metabolism												
GOT1	APT	P05201	38.4/7.1	46.5/6.7	APS−	11.6	0.014	5/7	0.406	1.61	2.15[g]	0.75
PDHB	Pyruvate dehydrogenase β	Q505N8	30.1/5.3	35.2/5.6	APS−	21.3	0	5/10	0.225	1.24	2.08[g]	0.60
Stress response												
CRYAB	α crystallin B chain (form 1)	Q9EPF3	13.5/7.0	20.9/6.8	APS−	33.7	0.003	5/9	0.020	2.75[g]	6.80[g]	0.40[g]
CRYAB	α crystallin B chain (form 2)	Q9EPF3	14.8/7.0	20.9/6.8	APS+	33.7	0.014	4/10	0.029	2.72[g]	2.41[g]	1.13
	α crystallin B chain (sum of 3 spots)[f]								0.874	0.91	1.51	0.60
HSPA5	78-kDa GRP (GRP78)[h]	P07823	74.1/4.8	72.5/5.1	APS+	18.3	0.002	6/15	0.261	1.10	2.06[g]	0.53
HSPA9	70-kDa heat shock protein precursor[i]	O35501	69.3/5.6	74.0/5.9	APS−	14.9	0.091	7/9	0.406	1.39	2.06[g]	0.67
Nonidentified												
NI 1			11.1/6.1						0.066	1.53	0.71	2.15[g]
NI 2			13.4/7.8						0.082	1.28	4.79[g]	0.27[g]
NI 3			14.3/5.7						0.072	2.39[g]	1.44	1.65
NI 4			14.3/6.4						0.113	3.14[g]	1.85	1.70
NI 5			26.4/6.5						0.074	1.97	0.73	2.70[g]
NI 6			30.6/7.0						0.351	1.02	0.32[g]	3.21[g]
NI 7			36.6/6.4						0.208	0.77	0.42[g]	1.85
NI 8			39.1/6.7						0.287	1.35	0.55	2.43[g]
NI 9			39.1/7.0						0.199	1.40	0.56	2.50[g]
NI 10			39.6/7.8						0.475	0.60	0.38[g]	1.59
NI 11			42.0/6.8						0.164	1.07	0.54	2.00[g]
NI 12			52.4/7.1						0.177	0.75	1.50	0.50[g]
NI 13			64.3/6.1						4.072	0.72	1.57	0.46[g]
NI 14			64.6/6.2						1.777	0.64	1.39	0.46[g]
NI 15			70.3/5.3						0.124	1.16	2.53[g]	0.46[g]
NI 16			73.3/7.3						0.528	0.33[g]	1.02	0.32[g]
NI 17			74.2/7.6						0.174	0.87	5.02[g]	0.17[g]

NOTE. Different spots corresponding to the same protein (those having the same accession no.) were considered to be different electrophoretic forms, and those having different accession nos. were considered to be different proteins. APS−, infected animals without acute phase signs; APS+, infected animals with acute phase signs; APT, aspartate aminotransferase; CTR, uninfected controls; E, experimental MW and pI; GOT1, glutamate oxaloacetate transaminase 1; GRP, glucose-regulated protein; MW, molecular weight (in kilodaltons); NI, nonidentified spot; pI, isoelectric point; PMF, peptide mass fingerprinting of the indicated gel; T, theoretical MW and iP.

[a] Functions of the proteins were determined according to gene ontology conducted with the use of the FatiGO tool, available at: http://fatigo.bioinfo.cnio.es.

[b] Accession nos. were obtained using the UniProt tool, available at: http://www.ebi.uniprot.org.

[c] The PMFs were submitted to the matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) evaluation tool or MASCOT tool, by use of the nonredundant National Center for Biotechnology Information database (restricted to Rodentia).

[d] The ratio of the no. of peptides matched to the total no. of peptides.

[e] Normalized volume of the corresponding spot in the control gel.

[f] Sum of the normalized volume of all the spots corresponding to the given protein.

[g] Differentially expressed spots (>2.0, up-regulated; <0.5, down-regulated)

[h] Heat shock protein 70-kDa protein 5.

[i] 75-kDa glucose regulated protein.

Using the proteomics approach with 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, we described, for the first time, the protein expression profile of myocardia from healthy young Syrian hamsters *(M. auratus)* (table 2). We were also able to identify 29 differentially expressed protein spots in the myocardium of *T. cruzi*–infected animals, compared with uninfected animals (table 3). Because a very small number of sequenced proteins are available for *M. auratus,* we used databases restricted to all Rodentia, which allowed us to identify hamster proteins that are similar to those of other Rodentia. Most of the proteins identified in the hamster myocardium were also identified by our group in a previous study that described the protein expression profile in the myocardium of patients with Chagas disease cardiomyopathy [13].

In our study, the up-regulation of selective forms of the structural/contractile proteins (ACTC), muscle-specific intermediate filament (DES), proteins involved in cardiac myofibril assembly (MLC2), and proteins involved in actin cytoskeleton regulation (MYL3) in APS^+ animals but not in APS^- animals (table 3), might be associated with the greater cardiac parasitism observed among infected animals with APS (figure 2). Several studies have shown that *T. cruzi*–infected cells display significant alterations in cytoskeleton and sarcomeric architecture [22–24] induced by trypomastigote-derived factors [25]. Moreover, independent groups have shown that *T. cruzi*–infected *Calomys callosus* or hamsters display disruption of heart cytoskeleton [23, 26]. In our study, the altered expression of structural/contractile proteins could be a consequence of compensatory mechanisms triggered by disruption of sarcomeres and microfilaments caused by the presence of large nests of *T. cruzi.* On the other hand, we cannot rule out the possibility that the increased expression of cytokines among APS^+ animals may also play a role in the modulation of contractile proteins of the host cells. It has been shown that inflammatory cytokines induce the expression of natriuretic peptides that are associated with a hypertrophic response that also regulates the expression of contractile proteins [27, 28].

The increased expression of stress response proteins, such as CRYAB, HSPA5, and HSPA9, in infected animals, compared with uninfected controls (table 3), might be associated with a stress response triggered by *T. cruzi* infection. CRYAB, a member of the small heat shock proteins family, acts as chaperone, protects against oxidative stress and apoptosis, regulates actin filament dynamics, and protects the integrity of desmin intermediate filaments against extracellular stress [29, 30]. Mutations of the CRYAB gene in humans lead to myopathy and cardiomyopathy [31]. Glucose-related proteins, such as HSPA5 and HSPA9, are endoplasmic reticulum chaperones whose primary function is the folding of nascent proteins. The inverse relation observed between parasitism and expression of stress response protein is paradoxical, because one could expect that a high parasite load could cause increased stress and, therefore, augmented stress response protein production. Given the observed changes in contractile protein expression (table 3), our data are consistent with a possible protective effect of CRYAB against *T. cruzi*–induced cytoskeletal damage. Moreover, knowing that heat shock proteins mediate myocardium protection [32], one can hypothesize that APS^- animals may have an enhanced ability to cope with parasitism and with *T. cruzi*–induced cardiomyocyte damage. However, we cannot exclude the possibility that the increased CRYAB is not causally related to parasite restraint.

The up-regulation of the energy metabolism proteins glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) and pyruvate dyhydrogenase–β in the myocardium of APS^- animals may be associated with a high ATP demand after *T. cruzi* infection. GOT1 and PHDB are involved in the tricarboxylic acid cycle and the glycolysis pathway, respectively. The identification of GOT1 in the myocardium could also result from a contamination from plasma, because high levels of this enzyme are frequently observed after infections, including acute *T. cruzi* infection [33]. PDHB is usually present in low levels in the heart, but glucose metabolism is found to be up-regulated during cardiac dysfunction [34]. Up-regulation of these energy metabolism proteins exclusively in the myocardium of APS^- animals may be associated with an increased metabolic rate of cardiomyocytes.

The differential expression of some electrophoretic forms of ACTC1, DES, MYL2, MYL3, and CRYAB in APS^+ or APS^- myocardium suggests that protein expression modulation occurred at the posttranslational level. We can hypothesize that the balance between isoforms of a given protein may be involved in differential progression of the acute phase of *T. cruzi* infection. Posttranslational modifications occur as a result of several biological processes, such as the inflammatory response [35], oxidative stress, and energy metabolism [36]. It is unlikely that the presence of distinct eletrophoretic forms in CTR and APS^+ animals but not in APS^- animals was due to technical problems, such as manipulation-induced alterations, because the samples were handled in the same way and because all 3 gels were run on the same day.

We demonstrated that acute *T. cruzi* infection in Syrian hamsters leads to distinct outcomes. APS^+ animals have high cardiac parasitism that could be the underlying reason for the increased expression of the cytokines TNF-α, IFN-γ, and IL-10 and the chemokine CCL3 (MIP-1α). The local changes in the expression of structural/contractile proteins could be related either to the high parasitism or to the increased expression of cytokines/chemokines. The finding that animals with low parasitism display increased levels of CRYAB and unchanged levels of structural proteins, whereas animals with high parasitism show lower levels of CRYAB, increased expression of structural proteins, and increased production of cytokines, is in line with a possible protective effect of CRYAB isoforms against cytoskeleton disruption [29, 30] and the reported inhibitory action of such isoforms on inflammatory cytokine production [32]. Although our data indicate a dichotomy between tissue parasitism and modulated

CRYAB isoform expression, it would be interesting to investigate whether the intense parasitism limits CRYAB expression in APS^+ hamsters or whether CRYAB protects against intracellular *T. cruzi* infection.

Acknowledgments

We thank José Maria Alavarez Mosig, Fernando Pretel, and Luís Sardinha for providing the parasites, Alexandre Keller for technical assistance with the Metamorph software, Andréia C. Kuramoto for technical assistance with the proteomics, and Kellen C. Faé for critical reading of the manuscript.

References

1. Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. Nat Rev Microbiol **2003**; 1:14–5.
2. Chagas C. New human trypanosomiasis: studies on morphology and life cycle of *Schizotrypanum cruzi*, n. gen, n. sp. etiological agent of new human disease [in Portuguese]. Mem Inst Oswaldo Cruz **1909**; 1:159–218.
3. Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation **1956**; 14:1035–60.
4. Parada H, Carrasco HA, Anez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol **1997**; 60:49–54.
5. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz **1999**; 94:71–80.
6. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res **1998**; 31:133–7.
7. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol **2002**; 18:262–5.
8. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-γ- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol **2001**; 158:1433–40.
9. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol **2001**; 159:1723–33.
10. Russo M, Starobinas N, Ribeiro-Dos-Santos R, Minoprio P, Eisen H, Hontebeyrie-Joskowicz M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi.* Parasite Immunol **1989**; 11: 385–95.
11. Truyens C, Torrico F, Lucas R, De Baetselier P, Buurman WA, Carlier Y. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi.* Infect Immun **1999**; 67:5579–86.
12. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. Circ Res **2001**; 88:763–73.
13. Teixeira PC, Iwai LK, Kuramoto AC, et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res **2006**; 39:1549–62.
14. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. Microbes Infect **2003**; 5: 1116–24.
15. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo **1962**; 4:389–96.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}$T method. Methods **2001**; 25:402–8.
17. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. Nat Rev Mol Cell Biol **2006**; 7:391–403.
18. Ramérez LE, Lages-Silva E, Soares-Júnior JM, Chapadeiro E. The hamster *(Mesocricetus auratus)* as experimental model in Chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. Rev Soc Bras Med Trop **1994**; 27:163–9.
19. Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, Chapadeiro E, Ramérez LE. *Trypanosoma cruzi:* characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters *(Mesocricetus auratus).* Exp Parasitol **2001**; 99:160–7.
20. Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, et al. Tumor necrosis factor α-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*–infected interleukin 10-deficient mice. Infect Immun **2000**; 68:4075–83.
21. Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi.* Microbes Infect **2000**; 2:851–66.
22. Pereira MCS, Costa M, Chagas-Filho C, de Meirelles MN. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi:* immunological and ultrastructural study. J Submicrosc Cytol Pathol **1993**; 25:559–69.
23. Taniwaki NN, Andreoli WK, Calabrese KS, da Silva S, Mortara RA. Disruption of myofibrillar proteins in cardiac muscle of *Calomys callosus* chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with immunosuppressive agent. Parasitol Res **2005**; 97:323–31.
24. Melo TG, Almeida DS, Meirelles MN, Pereira MC. Disarray of sarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi.* Parasitology **2006**; 133:171–8.
25. Rodríguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca^{2+} mobilization and microfilament rearrangement in host cells. J Cell Biol **1995**; 129:1263–73.
26. Colmanetti FH, Teixeira Vde P, Rodrigues ML, Chica JE, Reis MG, dos Santos VM. Myocardiocyte ultrastructure and morphometrical analysis in hamsters experimentally infected with *Trypanosoma cruzi.* Ultrastruct Pathol **2005**; 29:139–47.
27. Chandrasekar B, Mummidi S, Claycomb WC, Mestril R, Nemer M. Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. J Biol Chem **2005**; 280:4553–67.
28. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. Am J Pathol **2005**; 167:305–13.
29. Quinlan R. Cytoskeletal competence requires protein chaperones. Prog Mol Subcell Biol **2002**; 28:219–33.
30. Arrigo AP, Ducasse C. Expression of the anti-apoptotic protein Hsp27 during both the keratinocyte differentiation and dedifferentiation of HaCat cells: expression linked to changes in intracellular protein organization? Exp Gerontol **2002**; 37:1247–55.
31. Vicart P, Caron A, Guicheney P, et al. A missense mutation in the αB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. Nat Genet **1998**; 20:92–5.
32. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. Curr Opin Crit Care **2002**; 8:411–6.
33. Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, et al. Contribution of NK, NK T, γδ T, and αβ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi.* Infect Immun **2006**; 74:2031–42.
34. Augustus AS, Buchanan J, Park TS, et al. Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. J Biol Chem **2006**; 281:8716–23.
35. Proost P, Struyf S, Van Damme J. Natural post-translational modifications of chemokines. Biochem Soc Trans **2006**; 34:997–1001.
36. Sheeran FL, Pepe S. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. Biochim Biophys Acta **2006**; 1757:543–52.