GABRIELA VENTURINI DA SILVA

**Identificação de alvos protéicos com potencial
diagnóstico e prognóstico em doença arterial
coronária**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Gabriela Venturini da

Identificação de alvos protéicos com potencial diagnóstico e prognóstico em
doença arterial coronária / Gabriela Venturini da Silva. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Isquemia miocárdica 2.Marcadores biológicos 3.Troponina I
4.Nitração

USP/FM/DBD-128/12

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Margarida e Walter, pelas
constantes palavras e atitudes de
apoio, carinho e confiança que me
fizeram acreditar que o horizonte é o
meu limite.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer o *Prof. Dr. José Eduardo Krieger* por me abrir as portas do laboratório, por permitir o contato com grandes pesquisadores e por me proporcionar o aprendizado continuado através de todas as reuniões e discussões realizadas durante esses três anos.

Aos funcionários da Divisão de Experimentação do Incor, *Edna, Liliane, Nelson, Richard, Elenice, Pedro, Mônica*, dentre tantos outros que me auxiliaram no desenvolvimento dos modelos animais

Ao *Prof. Dr. Francisco Rafael Laurindo* e os amigos do Laboratório de Biologia Vascular, *Denise, João, Leonardo, Vítor, Tayna, Renata e Leonora* pela ajuda em todas as discussões e experimentos relacionados a stress oxidativo.

Ao *Prof. Dr. Pedro Lemos* pelas discussões e disponibilidade na coleta de soro de pacientes do setor de Hemodinâmica.

Ao *Celso Takimura* pela ajuda imprescindível no desenvolvimento do modelo animal de isquemia.

Aos amigos do Laboratório de Pneumologia *Carlos, Milena e Vanessa* pelo apoio no desenvolvimento dos ELISAS e risadas durante os intermináveis tempos de incubação.

À *Dra. Deborah Schechtman* pelo auxílio nos primeiros passos do projeto.

Aos amigos do laboratório de bioquímica da USP, *Matheus e Marie* por me salvarem nos momentos em que os protocolos não eram claros e por me fazerem sentir em casa quando ia para USP.

Às minhas primeiras amigas paulistanas *Talita, Nicole e Aninha*, por me receberem tão bem no meu primeiro estágio no Incor, o que me incentivou a seguir esse caminho e por serem tão cúmplices e companheiras durante esses anos.

À *Dra. Jeane Tsutsui* pela colaboração na elaboração e desenvolvimento de todo o projeto, pela acesso ao Fleury e por colaboração na coleta de amostras.

Aos amigos da Crom e do IPD *Dr. Edgar, Sibeles, Rodrigo, Karina Mandelbaum, Alessandra, Cristiane, Melina, Leila, Kozue e Miguel* por me acolherem tão receptivamente em seu espaço de trabalho, me auxiliando da melhor maneira possível, e pelas conversas e risadas durante os almoços e cafés.

À *Karla Pelegrino* pelo apoio técnico e amizade durante o desenvolvimento do projeto.

Às amigas que fiz nos caminhos desse projeto *Thaís Regiani, Jéssica Salgueiro e Jéssica Camargo* que tornaram os momentos no Fleury mais leves e agradáveis.

Ao *Valdemir e Karina* sem os quais o projeto não seria o mesmo, pelo apoio incondicional em todo o desenvolvimento, por todos os ensinamentos,

discussões, almoços, caronas e pela verdadeira amizade construída. Mesmo que esse trabalho não tivesse dado nada certo, só por ter convivido com vocês, esse mestrado já teria valido a pena!

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, que de alguma maneira, direta ou indireta, foram importantes para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos da genética pelo companheirismo nas reuniões de quarta e nas confraternizações festivas, fazendo do laboratório um ambiente mais caloroso.

À *Silvana, Maúde, Luciana, Sirleide e D. Antônia* por todo apoio no desenrolar das burocracias e pelos momentos de descontração.

À *Samantha e Márcio* pelo apoio em todo desenvolvimento técnico.

Aos amigos *Vinícius, Thaís Girão, Diogo, Miriam e Talita* pela amizade no laboratório e pelas brincadeiras.

Aos grandes e eternos amigos *Luis Felipe, Leo Jensen, Juliana e Ana Paula* por estarem por perto quando todos os resultados pareciam tão longe de serem alcançados.

Às meninas do grupo *Paty e Pamella* por ajudarem na aquisição dos dados, por estarem comigo na montagem do grupo e pela amizade sincera. Às novas, mas não menos queridas, amigas do grupo *Bia, Kally e Thamiris* que trouxeram mais força e energia (e coloca energia nisso) ao grupo.

Ao *Dr. Alexandre Pereira*, que foi essencial para o meu desenvolvimento científico, pela confiança no trabalho, por me ajudar a me tornar mestre e principalmente pelo companheirismo em todos os momentos. Espero que esse seja apenas o primeiro de muitos trabalhos desenvolvidos em conjunto. É muito bom trabalhar com você!

Aos amigos de outrora *Mariana, Danielle, Paulo Henrique, Leandro, Welton, Carlos, Sérgio, Patrícia, Carol e Ludmila*, por todos os ótimos momentos ontem, hoje e sempre.

Ao *Jonathas* por ser meu companheiro em momentos de desespero nessa selva de pedra, e por me lembrar que existe vida fora do laboratório.

Ao *Rafael Dariolli* pelo apoio logístico, técnico e científico, sem os quais seria impossível chegar ao fim dessa dissertação. Obrigado por ser minha família em São Paulo, pelo apoio em todos os momentos de altos e baixos durante todo esse difícil projeto. Pelas trocas de opiniões, pelas discussões, amizade, companheirismo, paciência, dedicação, coleguismo e por ser a vontade quando a vontade de fazer qualquer coisa me faltava.

À minha família pela certeza e segurança de que se tudo algum dia não der certo, tudo bem, eu ainda vou ser feliz porque tenho os melhores orientadores e pesquisadores me esperando de braços abertos. Por mais empolgante e excitante que fosse o trabalho durante todos esses anos, nada era mais animador que voltar pra casa.

Esse trabalho foi elaborado com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Esta dissertação 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*.

*“ É bom olhar pra trás
e admirar a vida que soubemos fazer...*

*É bom olhar pra frente,
é bom, nunca é igual...”*

Nando Reis

Sumário

<i>Lista de Abreviações</i>	i
<i>Lista de Símbolos</i>	v
<i>Lista de Tabelas</i>	vi
<i>Lista de Figuras</i>	vii
Resumo	ix
Summary	xi
1. <i>Introdução</i>	1
1.1. Síndrome coronariana aguda.....	2
1.2. Biomarcadores diagnósticos	4
1.3. Estresse oxidativo e doenças cardiovasculares	9
2. <i>Objetivos</i>	12
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. <i>Materiais e métodos</i>	14
3.1. Modelos animais de isquemia miocárdica.....	15
3.1.1. Modelo de isquemia miocárdica em murinos	15
3.1.2. Modelo de isquemia miocárdica em porcos.....	16
3.2. Amostras biológicas humanas	18
3.2.1. Pacientes com isquemia induzida por angioplastia com implante de stent..	18
3.3. Quantificação de troponina T, troponina I, troponina T ultrasensível e CKMB ...	19
3.4. Quantificação de proteínas nitradas por ELISA (Imunoensaio Enzimático).....	20
3.5. Modelo de isquemia celular in vitro	21
3.6. Análises histológicas	22
3.6.1. Imunohistoquímica	22
3.6.2. Imunofluorescência.....	23
3.7. Imunoprecipitação	25
3.7.1. Ligação covalente de beads magnéticos e anticorpo anti-nitrotirosina.....	25
3.7.2. Enriquecimentos das proteínas nitradas do soro	26
3.7.3. Quantificação das proteínas imunoprecipitadas	27
3.8. Western-blot.....	27
3.9. Análise molecular da troponina I nitrada in vitro	28

3.9.1.	Nitração da troponina I cardíaca.....	28
3.9.2.	Dot-Blot.....	29
3.9.3.	Digestão enzimática	30
3.9.4.	Análise por espectrometria de massas	31
3.9.5.	Processamento de dados gerados por MS.....	33
3.10.	Peptídeo para desenvolvimento de anticorpo monoclonal anti-nitrotroponina I 33	
3.10.1.	Desenho do peptídeo.....	34
3.10.2.	Nitração, purificação e caracterização do peptídeo	34
3.11.	Análise estatística	35
4.	<i>Resultados</i>	36
4.1.	Análise de nitração total no tecido cardíaco e no soro de pacientes e modelo animais de SCA.....	37
4.2.	Análise da nitração total no soro de pacientes com SCA e indivíduos controles ..	48
4.3.	Análise da troponina I cardíaca nitrada como marcador de isquemia modelo celular, soro e tecido de pacientes e animais com SCA.....	50
4.4.	Análise da troponina I cardíaca nitrada em soro de modelos animais e de pacientes com isquemia do miocárdio	54
4.5.	Análise molecular da troponina I nitrada in vitro.	59
4.6.	Peptídeo para desenvolvimento de anticorpo monoclonal anti-nitrotroponina I	68
5.	<i>Discussão</i>	71
6.	<i>Conclusão</i>	83
6.1.	Conclusões Sumarizadas	84
6.2.	Perspectivas	85
6.3.	Conclusão	85
7.	<i>Anexos</i>	86
8.	<i>Referências bibliográficas</i>	92

Lista de Abreviações

ACX	Artéria coronária circunflexa esquerda
ALN	Acima do limite normal
APO-B	Apolipoproteína B
APO-I	Apolipoproteína I
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CK	Creatinina quinase
CKMB	Creatinina quinase MB
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de variação
DAB	Diaminobenzidina
DAC	Doença arterial coronariana
DAPI	Diaminofenilidol
DMEM	do inglês; Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-HIGH glucose	do inglês; Dulbecco's Modified Eagle Medium - high glucose
DMEM-LOW glucose	do inglês; Dulbecco's Modified Eagle Medium - low glucose
DMP	Dimetilftalato
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotriol
ECG	Eletrocardiograma

ECL	do inglês; enhanced chemilluminescence
ELISA	do inglês; Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Eletrospray
ESI-Q-TOF	Eletrospray acoplado a quadrupolo e tempo de voo
EUA	Estados Unidos
GPBB	Enzima glicogeniofosforilase BB
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HDL	do inglês, high density lipoprotein
HPLC	do inglês; High-performance liquid chromatography
HRP	do inglês; Horseradish peroxidase
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IgG	Imunoglobulina G
IM	Infarto do miocárdio
InCor	Instituto do coração
IS	Isquemia sem necrose
KCl,	Cloreto de potásio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potásio monobásico
LC-MS massas	Cromatografia líquida associada a espectrometria de
LDL	do inglês, low density lipoprotein
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
Min	Minutos
Mn-SOD	Superóxidodesmutase com manganês
MS	Espectrometria de massas

Na_2HPO_4	Fosfato de sódio
NaCl ,	Cloreto de sódio
NaH_2PO_4	Fosfato monossódico
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center For Biotechnology Information
NCS	do inglês; Newborn calf serum
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
NO_2	Dióxido de nitrogênio – grupo nitro
NSTEACS segmento ST	Síndrome coronariana aguda sem elevação do
NSTEMI	Infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST
O_2	Óxigênio
ONOO	Peróxinitrito
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio com Tween 20
PCR	Proteína C Reativa
PFA	Paraformaldeído
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SCA	Síndrome coronariana aguda
SDS-PAGE de sódio	Eletroforese de gel de poliacrilamida com dodecilsulfato
STEMI	Infarto do miocárdio com elevação do segmento ST
TFA	Ácido trifluoroacético
TMB	Tetrametilbenzidina
Tris	Hidróximetilaminometano

Tween 20	Polioxietileno-20-sorbitan monolaureato
USP	Universidade de São Paulo
VE	Ventrículo esquerdo

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
°C	Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
Å	Angstrom
eV	Eletrovolt
fmol	Fentomol
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nL	Nanolitro
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
pmol	Picomol
RPM	Rotação por minuto
s	Segundos
UI	Unidades

Lista de Tabelas

Tabela 1: Digestão <i>in silico</i> da troponina I cardíaca. Peptídeos preditos após digestão.	60
--	----

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema de situações clínicas que manifestam dor torácica de início agudo.....	4
Figura 2: Tempo de liberação de biomarcadores na circulação após IAM.. ..	6
Figura 3: Estrutura molecular da tirosina	10
Figura 4: Média de CKMB e troponina circulantes nos diferentes grupos do modelo de murinos submetidos à isquemia.....	38
Figura 5: Detecção de proteínas nitradas em músculo cardíaco de ratos: ..	39
Figura 6: Quantificação de proteínas totais nitradas circulantes em soro de modelos murinos de isquemia do miocárdio.....	40
Figura 7: Angiografia representativa da oclusão de ACX.. ..	41
Figura 8: Dosagem dos marcadores de necrose cardíaca.. ..	42
Figura 9: Nitração total de proteínas séricas.. ..	43
Figura 10: Detecção de proteínas nitradas em músculo cardíaco de porcos.	44
Figura 11: Dosagem dos marcadores de necrose cardíaca.. ..	46
Figura 12: Nitração total de animais após infarto agudo do miocárdio (IAM)..	48
Figura 13: Média de absorbância a 450nm em teste ELISA anti-nitrotirosina em soro de pacientes controles e após isquemia.	49
Figura 14: Histograma com distribuição da medida de absorbância em 450nm no ensaio ELISA anti-nitrotirosina em pacientes controles e com SCA.. ..	50

Figura 15: Colocalização da troponina I cardíaca e nitrotirosina por imunofluorescência.....	52
Figura 16: : Marcação de troponina I nitrada por imunofluorescência em tecido cardíaco de ratos controles, com 5 minutos de isquemia e infarto agudo.....	53
Figura 17: Enriquecimento de proteínas nitradas seguida de identificação de troponina I cardíaca..	55
Figura 18: Identificação de Troponina I cardíaca nitrada por western-blot..	57
Figura 19: Dosagem dos marcadores circulantes de necrose cardíaca nos paciente após indução de isquemia por implante de <i>stent</i>	58
Figura 20: Dot-blot da troponina I cardíaca nitrada.....	59
Figura 21: Digestão da troponina I cardíaca nitrada por tripsina.....	62
Figura 22: Digestão da troponina I cardíaca nitrada por quimiotripsina.....	64
Figura 23: Digestão da troponina I cardíaca nitrada por tripsina.....	66
Figura 24: Troponina I cardíaca.....	67
Figura 26: Espectro dos peptídeos nitrados para desenvolvimento do anticorpo. Confirmação da nitração dos peptídeos purificados.....	70

Resumo

Silva GV. *Identificação de alvos protéicos com potencial diagnóstico e prognóstico em doença arterial coronária* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Em todo o mundo, milhões de pacientes são atendidos em emergências por apresentarem dor torácica de início aguda, mas apenas uma parcela deve-se a síndrome coronariana aguda (SCA). Em situações como essa é de extrema importância distinguir quando a dor torácica é devido à isquemia do miocárdio, pois esta é de alto risco e o início do tratamento deve ser imediato. Novos biomarcadores são necessários para auxiliar no diagnóstico e conduta clínica a ser tomada diante de situações de emergência como esta. Recentemente a quantificação de troponinas através de ensaios ultrassensíveis tem sido amplamente utilizado para diagnósticos e prognóstico de isquemia cardíaca, porém esses ensaios não tiveram seus valores de referências estabelecidos e validados para diversas situações clínicas. O presente estudo identificou a troponina I cardíaca nitrada como um novo biomarcador para isquemia cardíaca. Através de experimentos de imunofluorescência, foi possível colocalizar a marcação de troponina I cardíaca e nitrotirosina em modelos celulares e murinos de isquemia cardíaca, sugerindo assim que a troponina I cardíaca é nitrada. A partir do soro de modelos porcinos de isquemia, foi realizado o enriquecimento de proteínas nitradas por imunoprecipitação seguido da identificação da troponina I cardíaca por western blot. Dessa maneira foi possível identificar a troponina I cardíaca nitrada no soro poucos minutos após o evento

isquêmico, a qual permaneceu circulante por até 24 horas. Nessas mesmas amostras outros biomarcadores de isquemia como CKMB, Troponina I e Troponina T ultrasensível foram dosados e nenhum marcador de elevou após a isquemia cardíaca seguida de reperfusão. A troponina I cardíaca nitrada foi caracterizada por espectrometria de massas. Essa proteína é um potencial marcador circulante sensível para o diagnóstico e prognóstico precoce de isquemia cardíaca com ou sem necrose do miocárdio.

Descritores: Isquemia miocárdica; Marcadores biológicos; Troponina I, Nitração.

Summary

Silva GV. *Identification of protein targets with potential diagnostic and prognostic in coronary artery disease* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Worldwide, millions of patients are treated in emergencies because they had acute-onset chest pain, but only a portion is due to coronary syndrome. In situations like this is extremely important to distinguish when the chest pain is due to myocardial ischemia, as this is high risk and initiation of treatment should be immediate. New biomarkers are needed to assist clinical decision-making in ACS. Recently, the quantification of ultra-sensitive tests for troponins has been widely used for diagnosis and prognosis of myocardial ischemia, however the reference values was not well validated and established for different subjects groups. The present study identified the nitrated cardiac troponin I as a novel biomarker of cardiac ischemia. We performed immunofluorescence colocalization marking of cardiac troponin I and nitrotyrosine in cell and rat model of cardiac ischemia, suggesting that cardiac troponin I is a nitrated protein. From serum of porcine models cardiac ischemia was made enrichment of nitrated proteins by immunoprecipitation with anti-nitrotyrosine followed by detection of cardiac troponin I by western blot. It was possible to identify the cardiac troponin I in serum nitrated few minutes after the ischemic event, which remains current for up to 24 hours. In these samples, other markers of cardiac ischemia such as CK-MB, troponin I and ultra-sensitive troponin T did not increase after ischemia followed by reperfusion. Nitrated cardiac troponin I was characterized by MS/MS. The

nitroated cardiac troponin I is a potential circulating marker sensitive for the diagnosis and prognosis for early cardiac ischemia with or without myocardial necrosis.

Descriptors: Cardiac ischemia, Biological markers, Troponin I, Nitration.

1. Introdução

1.1. Síndrome coronariana aguda

Nos últimos 10 anos, a síndrome coronariana aguda (SCA) foi considerada responsável por aproximadamente 30% dos óbitos em países industrializados (1) tornando-se a principal causa de morte em países em desenvolvimento (2). No Brasil, as doenças cardiovasculares foram as principais causas de óbitos no ano de 2009, sendo responsáveis por 29% do total (3). Destes, 24% devem-se a SCA. Além de estar entre as maiores causas de mortalidade, a SCA representou a terceira maior causa de hospitalização no Sistema Único de Saúde em 2009. Estima-se que em adultos acima de 40 anos a prevalência da doença é de 5% a 8% (4), e que nos próximos 15 anos o número de óbitos devido a SCA deverá dobrar (4).

A SCA refere-se a uma série de manifestações clínicas causadas por isquemia aguda do miocárdio (5-7); a qual ocorre devido à interrupção do fluxo sanguíneo coronariano; e alguns fatores como o tempo e extensão da isquemia irão definir se os danos causados pela falta de perfusão do músculo resultará em prejuízo a função cardíaca (8, 9).

Pacientes com SCA são divididos em duas principais categorias de acordo com o eletrocardiograma (ECG): 1) aqueles com elevação do segmento ST, que ocorre em situações de isquemia do músculo cardíaco; e são diagnosticados com infarto agudo do miocárdio com elevação ST (STEMI); 2) e aqueles sem anormalidades no eletrocardiograma que são diagnosticados com SCA sem elevação ST (NSTEMI/UA). Os pacientes com

NSTEACS podem ainda ser divididos em pacientes com infarto do miocárdio sem elevação ST (NSTEMI) ou pacientes com isquemia sem necrose do miocárdio (IS) (2, 7, 10) (Figura 1).

Pacientes com NSTEMI e IS apresentam condições muito próximas quanto à patogênese e representações clínicas, porém com diferentes severidades e condutas médicas a serem tomadas (2, 7). NSTEMI se difere de IS por ser uma isquemia suficientemente severa em intensidade e duração, capaz de causar danos irreversíveis ao miocárdio (necrose de miócitos) enquanto IS não leva a necrose do músculo.

A SCA é uma síndrome complexa com etiologia heterogênea. Entretanto a causa mais comum é a doença arterial coronariana aterosclerótica com erosão ou ruptura da placa aterosclerótica culminando na formação de trombos intracoronarianos (11-13). Na maioria dos pacientes que apresentam SCA, o trombo é parcialmente obstrutivo ou apresenta oclusão transiente resultando em IS. Apenas 30% dos pacientes com SCA apresentam coronárias completamente ocluídas, resultando em STEMI.

A cada ano nos Estados Unidos (EUA) são necessárias cerca de 1,36 milhões de internações hospitalares em decorrência de SCA, das quais 0,81 milhões são devido ao infarto do miocárdio (IM) e as restantes são devido à IS. Ainda assim cerca de dois terços dos pacientes com IM não apresentam elevação ST (14).

Figura 1: Esquema de situações clínicas que manifestam dor torácica de início agudo enfatizando a necessidade de biomarcadores para isquemia cardíaca sem necrose. STEMI: Infarto do miocárdio com elevação do segmento ST; NSTEMI/UA: SCA sem elevação do segmento ST; IAM: Infarto do miocárdio. + Biom.: Detecção de biomarcadores de necrose. – Biom.: Ausência de biomarcadores de necrose.

1.2. Biomarcadores diagnósticos

Nos EUA 6 milhões de pacientes são atendidos por ano com dor torácica de início agudo; destes, apenas 17% têm SCA como diagnóstico de alta hospitalar (15, 16).

No atendimento emergencial duas situações de dor torácica devem ser distinguidas: 1. dor torácica causada por SCA, situação de alta mortalidade e alto risco de complicações cardíacas na qual o início do tratamento deve ser

imediatos; 2. dor torácica de origem não isquêmica, diagnóstico que engloba diversas causas: osteomusculares, gastro-intestinais e pulmonares, em geral, situações de menores riscos imediatos de morte (2, 7) (Figura 1). Além disso, para diagnósticos positivos de dor torácica causada por SCA, ainda é necessário que se avalie se esta foi originada por IM ou IS.

Para pacientes que apresentam IM, uma diversidade de biomarcadores já foram descritos. Nestas situações, há necrose do músculo cardíaco e com isso são liberadas proteínas estruturais e outras macromoléculas intracelulares devido ao comprometimento da membrana celular. Essas proteínas liberadas podem ser utilizadas como biomarcadores de isquemia com necrose. Esses marcadores incluem principalmente as troponinas T e I; isoformas de CK e CKMB, e mioglobina (7) (Figura 2).

A mioglobina é a primeira proteína a se elevar na circulação após 2 a 4 horas do IM, tem seu pico com 6 a 12 horas e retorna aos índices normais após 24 horas. Porém, por ser uma proteína pouco específica do tecido cardíaco, é também detectada em outras situações clínicas como insuficiência renal, doenças neuromusculares, injeções intramusculares e exercícios extenuantes (2, 7, 10, 17).

Figura 2: Tempo de liberação de biomarcadores na circulação após IAM. Os biomarcadores foram plotados mostrando os múltiplos *cutoff* para IAM no decorrer do tempo. A linha pontilhada na horizontal determina os valores acima do limite normal (ALN). ALN é definido como o percentil 99 da população normal de referência sem necrose do miocárdio; o coeficiente de variação (CV) do ensaio pode ser de 10% ou menor. Modificado de Mayo Clinic Cardiology: Concise Textbook, 3rd ed.

Outro marcador amplamente utilizado é a medida de CK – CKMB e isoformas, este marcador é sensível ao dano ao miocárdio e se eleva precocemente dado o início da isquemia. Por ficar circulante por até 30 horas, é um marcador sensível também para o diagnóstico de reinfarto. Porém apesar da sensibilidade para o diagnóstico, as isoformas de CK são pouco específicas do músculo cardíaco, podendo se elevar na circulação diante de outras condições clínicas (2, 7, 10, 17).

Os ensaios de troponinas para diagnósticos de SCA são preferencialmente utilizados por se tratarem de isoformas específicas do tecido cardíaco e por isso apresentarem baixos índices de falsos positivos. As troponinas permanecem circulantes de 4 a 14 dias após o evento isquêmico. Porém não são bons marcadores para diagnósticos precoces, uma vez que só tornam-se circulantes em média 6 horas após o início da necrose (17-21).

Recentemente foi sugerido internacionalmente o uso de medidas ultrassensíveis de troponinas cardíacas citoplasmáticas no soro como marcadores de lesão miocárdica. Essas medidas ultrassensíveis se mostraram mais sensíveis e precoces para isquemia do miocárdio com necrose que os testes de CK-MB. Porém, devido à alta sensibilidade do ensaio, as troponinas são também detectáveis em soros de indivíduos saudáveis, em outras doenças cardíacas além de SCA e outras patologias não associadas à cardiologia (18-21).

Para os casos de emergência de dor torácica de início agudo devido à IS alguns marcadores tem sido analisados, porém com pouco sucesso clínico. Entre esses marcadores podem-se destacar a albumina modificada por isquemia, o glicogênio fosforilase BB (GPBB), ácidos graxos livres, ácidos graxos ligados à proteína, lipoproteína associada à fosfolipase A e enzimas fosfolipases.

A albumina perde a habilidade de ligação por metais como cobre, cobalto e níquel após isquemia e essa perda pode ser mensurada por ensaio

colorimétrico. Essa medida é detectada poucos minutos após a isquemia, porém é uma medida não específica para isquemia cardíaca (7, 17).

Em situações de hipóxia o GPBB torna-se particulado e é liberado pelo cardiomiócito. O GPBB é detectado de 1 a 4 horas após a isquemia e permanece circulante por até 1 dia. No entanto, assim como a albumina modificada, o GPBB não é um marcador cardíaco específico (7, 17).

Os ácidos graxos livres e proteínas ligantes, assim como as fosfolipases e lipoproteínas associadas à fosfolipases, são marcadores associados à desestabilização da placa aterosclerótica e são detectados em resposta a isquemia, porém estão associadas ao metabolismo de diversos órgãos e são de difícil dosagem, além de retornarem rapidamente ao níveis normais (17).

Pela falta de marcadores de isquemia, o diagnóstico e início do tratamento podem ocorrer tardiamente nos pacientes com angina instável, enquanto nos pacientes com dor torácica não isquêmica a incerteza quanto aos diagnósticos podem tornar necessárias internações para investigação com custos excessivos (22).

Além da utilidade como exame na emergência, um marcador de IS poderia ser útil também no manejo ambulatorial de pacientes através de seu auxílio aos diagnósticos de angina estável e instável, principalmente em associação com testes ergométricos ou cintilografia miocárdica com estresse.

Por estes motivos, a avaliação de IS é um foco muito importante da pesquisa em cardiologia na atualidade.

1.3. Estresse oxidativo e doenças cardiovasculares

As doenças do sistema cardiovascular, principalmente as SCA, estão fortemente associadas a um desequilíbrio oxidativo, levando ao aumento de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Com isso há aumento na produção de óxido nítrico, de superóxido e alteração nas vias de antioxidantes, levando a um estresse oxidativo e nitroxidativo (23, 24).

Como consequência desse aumento de espécies reativas tem-se a formação de algumas espécies intermediárias de oxigênio e nitrogênio; e agentes nitrantes que levam, dentre outras coisas, à nitração de proteínas.

A nitração protéica é uma modificação pós traducional que, sob ação de agentes nitrantes, resulta na adição de um grupo nitro (NO₂) ao grupo fenólico da tirosina ou triptofano (Figura 3) (24-26).

In vivo, a nitração pode ocorrer tanto envolvendo peroxinitrito quanto hemoperoxidases. A nitração de tirosina ocorre basicamente em dois passos, com uma reação inicial de oxidação do anel aromático da tirosina transformando-se em radical tirosil seguida da adição do grupo NO₂ (27).

Figura 3: Estrutura molecular da tirosina (A) e nitrotirosina (B). Modificado de Abello e colaboradores (25).

A nitração pode alterar a proteína de diversas maneiras: tornando-a resistente à degradação, levando a respostas imunes contra a proteína nitrada, inativando esta proteína ou levando-a a ter uma nova função. Há indícios que essas modificações nas atividades protéicas podem ter impacto na fisiopatologia do sistema cardiovascular (25, 28, 29).

Várias proteínas já foram identificadas como nitradas nos diferentes compartimentos do sistema cardiovascular e foram associadas à doenças cardiovasculares, como fibrinogênio, plasmina e Apo-1 no plasma; Apo-B, cicloxigenase, protaglandina sintetase, Mn-SOD na parede de vasos; creatina quinase miofibrilar e α -actinina no miocárdio (23, 24, 28, 30-35).

Dessa maneira, o estudo da nitração protéica vem sendo utilizado na busca de novos marcadores em doenças cardiovasculares. Porém a nitração ocorre também em outras situações fisiopatológicas que envolvem aumento

de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como em diabetes, acidentes vasculares cerebrais, doenças neurodegenerativas, doenças renais e quaisquer outras doenças associadas à isquemia/reperfusão e processos inflamatórios.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou utilizar o estudo da nitração protéica na busca de um novo biomarcador para IS.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Identificar marcadores séricos sensíveis e específicos para isquemia miocárdica com potencial diagnóstico e/ou prognóstico.

2.2. Objetivos específicos

I- Avaliar a nitração total no soro e no tecido cardíaco de pacientes e modelo animais de SCA;

II- Analisar a troponina I cardíaca nitrada como marcador de isquemia no soro e no tecido cardíaco de pacientes e animais com SCA;

III- Realizar a caracterização molecular da troponina I cardíaca nitrada.

3. Materiais e métodos

3.1. Modelos animais de isquemia miocárdica

3.1.1. Modelo de isquemia miocárdica em murinos

Foram utilizados 15 ratos wistar (*rattus norvegicus*) como modelo animal, sendo cinco animais incluídos no grupo controle, cinco incluídos no grupo isquemia miocárdica sem necrose e cinco incluídos no grupo infarto (isquemia miocárdica com necrose).

Para modelo de isquemia miocárdica sem necrose, foi obstruído o fluxo arterial da coronária amarrando-a com um fio de algodão por 5 minutos. Após esse intervalo de tempo, o fio foi retirado e houve reperfusão por 60 minutos.

Para modelo de isquemia miocárdica com necrose, foi obstruído o fluxo arterial da coronária amarrando-a com um fio de algodão por 60 minutos.

Logo após, foi retirado 5ml de sangue em tubo seco Vacutainer®. O sangue foi centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. O soro foi coletado, adicionado coquetel de inibidores de protease (Sigma #P8340) e fosfatase (Sigma #P2859 e #P5726) segundo recomendações do fabricante e armazenado a -80°C.

O animal foi eutanasiado com alta dose de pentobarbital e em seguida o coração foi retirado e o ventrículo esquerdo (VE) foi separado para as posteriores análises. Parte do VE foi fixado em solução de formol 30%, e

parte foi congelada lentamente com isopentano em nitrogênio líquido para análises histológicas.

3.1.2. Modelo de isquemia miocárdica em porcos

Foram utilizadas oito porcas fêmeas (*Sus scrofa domesticus* - linhagem MS60 EMBRAPA) de aproximadamente 20 Kg sendo três animais utilizados no modelo de isquemia miocárdica sem necrose e cinco incluídos no grupo modelo de isquemia com necrose. Os animais foram pré-anestesiados com bromazepan. A indução anestésica foi realizada com tiopental. Após a intubação orotraqueal, a anestesia inalatória foi mantida com isoflurano durante o procedimento. Foi realizada assepsia/antisepsia da região inguinal direita, posteriormente coberta com campos cirúrgicos estéreis.

A artéria femoral comum foi exposta por dissecação cirúrgica, foi introduzida por visão direta uma bainha vascular 6F, seguida por administração de 10.000 UI de heparina por via intravenosa. A artéria coronária circunflexa esquerda foi canulada seletivamente utilizando-se catéter guia 6F. Após a cateterização da coronária foi realizada aquisição de angiografia basal da artéria de interesse (artéria coronária circunflexa esquerda - ACX).

Após a aquisição da angiografia basal, os animais foram mantidos sob infusão venosa de cloridrato de lidocaína durante todo o procedimento para

diminuir a incidência de taquicardia/fibrilação ventricular, comuns neste modelo. Em seguida, foi manipulada uma corda-guia 0.014 com medida de pressão (Pressure wire, 0.014'' RADI Medical Systems, Inc., Reading, Massachusetts) até a porção distal de ACX.

No modelo de isquemia miocárdica com necrose uma prótese de poliuretano (esponja) foi posicionada na região proximal de ACX. Foram coletados 5mL de sangue com tubo seco Vacutainer® antes do posicionamento da prótese; e 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos após a oclusão de ACX; e em intervalos de 60 minutos até completar o período de 24 horas de oclusão.

O animal foi então monitorado até o restabelecimento das funções vitais normais.

No modelo de isquemia miocárdica sem necrose foi realizada a oclusão da coronária através da abertura do cateter balão que permaneceu inflado por 10 minutos causando uma oclusão. Após o período de isquemia, o balão foi desinflado e houve reperfusão por 3 horas. Foram coletados 5mL de sangue com tubo seco Vacutainer® antes de insuflar o cateter balão, imediatamente após desinsuflar e iniciar a reperfusão; 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos após início da reperfusão.

O sangue coletado foi centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. O soro foi coletado, adicionado coquetel de inibidores de protease (Sigma #P8340)

e fosfatase (Sigma #P2859 e #P5726) segundo recomendações do fabricante e armazenado a -80°C.

O animal foi eutanasiado com cloreto de potássio e em seguida retirado o coração. Foi retirado um fragmento da área não afetada pela isquemia e outro da área afetada. Os fragmentos do órgão foram fixados em formol 30% para análises histológicas.

3.2. Amostras biológicas humanas

Foram coletados amostras de 100 pacientes com diagnóstico de SCA e 100 pacientes que não apresentavam SCA para serem utilizadas como controle que deram entrada na Unidade Coronariana do Instituto do Coração – InCor, Faculdade de Medicina-USP.

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento (ANEXO C) aprovado pelo Comitê de Ética (ANEXO A e B).

3.2.1. Pacientes com isquemia induzida por angioplastia com implante de stent

Pacientes com angina estável, submetidos à angioplastia com implante de *stent* convencional no serviço de hemodinâmica do InCor foram inscritos nesse estudo prospectivo de marcadores de isquemia. O protocolo foi

submetido à aprovação pela Comissão de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas – Universidade de São Paulo (ANEXO A e B). Foram elegíveis para participação no estudo cinco pacientes com angina estável e indicação de angioplastia com implante de *stent*. Os pacientes incluídos tiveram isquemia documentada em monitoramento eletrocardiográfico contínuo durante o procedimento angiográfico: elevação fugaz e transitória do segmento ST. Foram colhidas amostras de soro antes do procedimento, imediatamente após e a cada meia hora até completar 3 horas de isquemia induzida.

O sangue coletado foi centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. O soro foi coletado, adicionado coquetel de inibidores de protease (Sigma #P8340) e fosfatase (Sigma #P2859 e #P5726) segundo recomendações do fabricante e armazenado a -80°C.

3.3. Quantificação de troponina T, troponina I, troponina T ultrasensível e CKMB

As medidas de concentrações de troponina T total, troponina I, troponina T ultrasensível circulante e CKMB foram realizadas pelo laboratório de análises clínicas de Medicina Diagnóstica do grupo Fleury. As medidas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante dos Kits comerciais (Roche).

3.4. Quantificação de proteínas nitradas por ELISA (Imunoensaio Enzimático)

Foi realizado o teste de imunoensaio para dosagens das proteínas nitradas totais dos soros coletados dos modelos animais com isquemia miocárdica (rato e porco) e humana (controles e pacientes com SCA).

Os soros foram diluídos 320 vezes em tampão bicarbonato de sódio (NaHCO_3) pH8.6 e adicionado 100uL da amostra por poço em duplicata na placa de 96 poços de altíssima afinidade (Nunc - MAXISORP #44-2404-21), as amostras sensibilizaram a placa por 16 horas a 4°C. No dia seguinte a placa foi lavada com tampão fosfato de sódio com 0,1% de tween (PBST 0,1%), bloqueada com 10% de leite desnatado em pó diluído em PBST 0,1% por 1 hora a 37°C. Em seguida a placa foi lavada com PBST 0,1% e então, foi adicionado o anticorpo de detecção anti-nitrotirosina feito em coelho (Millipore #06-284) na concentração de 1,25µg/mL diluído em 5% de leite desnatado em PBST 0,1%. Após 2 horas a 37°C, a placa foi lavada e incubada por 1 hora a 37°C com anticorpo secundário anti IgG de coelho feito em camundongo conjugado com *horseradish* peroxidase (HRP). Após lavagem, foi revelada com Tetrametilbenzidina (TMB) (Invitrogen #002023) e a reação foi interrompida por uma solução de ácido sulfúrico 30% (H_2SO_4). Após a reação enzimática a absorbância foi medida em uma leitora de placas de ELISA (VICTOR-WALLAC) em comprimento de onda de 450nm.

A curva padrão foi realizada com diluições seriadas de albumina de soro bovino (BSA) nitrado (Bio-Rad, Califórnia, USA) nas concentrações de 50ng/mL a 0,5ng/mL.

3.5. Modelo de isquemia celular *in vitro*

O modelo de isquemia celular *in vitro* foi realizado utilizando culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos. Os animais foram esterilizados com álcool 70%, decaptados e então tiveram os corações coletados. Os corações foram transferido para uma placa contendo ADS cloreto de sódio (NaCl), HEPES, fosfato monossódico (NaH_2PO_4), d-glucose, cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio (MgSO_4), onde foram separados os átrios e ventrículos. Os ventrículos foram então cortados em pequenas partes e incubados com tampão de digestão contendo collagenase e ADS sob agitação a 37°C por 10 minutos. A solução então foi centrifugada a 1500 rpm, a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e uma nova solução de digestão foi adicionada ao tecido o qual foi submetido a novo ciclo de agitação por 20 minutos a 37°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo ; *Newborn calf serum* (NCS). Este procedimento foi repetido por 7 vezes. A cada ciclo os tubos contendo o sobrenadante e NCS foram centrifugados a 1000rpm por 5 minutos a 20°C, então o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 2mL de NCS. As células foram transferidas para uma garrafa de cultura, e incubadas

a 37°C em estufa com 5% de dióxido de carbono (CO₂) O sobrenadante foi transferido para um tubo e centrifugado a 1000rpm por 5 minutos a 20°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado em ADS.e submetido a gradiente de Percoll. A faixa do gradiente referente aos cardiomiócitos foi transferida para um tubo contendo ADS. As células foram centrifugadas, contadas e plaqueadas. Os experimentos foram realizados 48 horas após a manutenção da cultura.

As células foram colocadas em *starving* por 1 hora em meio isquêmico (DMEM-LOW e pH 6,8) e 3% O₂ em estufa de hipóxia ou em meio de normóxia (DMEM-HIGH) e estufa com 21% O₂.

As células controles em normóxia permaneceram nessa condição por 3 horas. Nas células submetidas à isquemia, foram retiradas as tampas das placas de cultura e estas permaneceram nesta condição por 15, 30 ou 60 minutos, para haver troca gasosa. Em seguida, as células foram submetidas a tensão de O₂ de 21%, mimetizando uma reperfusão por 1 hora.

3.6. Análises histológicas

3.6.1. Imunohistoquímica

Para quantificação das proteínas totais nitradas nos tecidos cardíacos isquêmicos e não isquêmicos, foi realizado ensaios de imunohistoquímica.

Os tecidos fixados e processados foram emblocados em *paraplast*, em seguida cortados para montagem de lâminas.

Os cortes foram desparafinados, logo após foi feita recuperação antigênica para exposição dos epítomos através de reação de citrato de sódio em alta temperatura. Foi feito bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) 3% por 10 minutos. Os cortes foram então bloqueados com BSA 2% por uma hora a temperatura ambiente. Após lavagem, foram deixados incubando por 16 horas a 4°C com anticorpo anti-nitrotirosina feito em coelho (Millipore #06-284) na concentração de 5µg/mL. No dia seguinte o material foi lavado e incubado por 1 hora a temperatura ambiente no anticorpo secundário anti IgG de coelho feito em camundongo conjugado com biotina. Após o período de incubação, os cortes foram incubados por 30 minutos com estreptavidina. Seguidos de coloração por 5 minutos com diaminobenzidina (DAB - Zymed). O material foi então contracorado com hematoxilina e montado com lamínula.

A análise da porcentagem de área corada foi feita pelo software QUANTIMET – LEICA QWIN PLUS.

3.6.2. Imunofluorescência

Para colocalizar a marcação de troponina I cardíaca, tropomiosina, CRP3 com a marcação de nitrotirosina foi realizado o ensaio de

imunofluorescência. Os ensaios foram realizados com os modelos celulares e em tecidos do modelo murino.

Para ensaio de imunofluorescência, as células controle e isquêmicas foram fixadas em PFA 4% por 10 minutos a 37°C. Em seguida foram lavadas 3 vezes em PBS. As células foram então permeabilizadas com 0,1% de Nonidet P-40 por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois de seguidas lavagens, as células foram bloqueadas com caseína 2% diluída em PBS por uma hora em temperatura ambiente. As células foram então incubadas por 16 horas a 4°C com os anticorpos de interesse: anti-tropomiosina feito em cabra anti-CRP3 feito em camundongo e anti-troponina I cardíaca feito em cabra (Hytest #4T21). Todos os poços foram incubados com um dos anticorpos juntamente com anti-nitrotirosina feitos em coelho (Millipore #06-284). Após sucessivas lavagens, as células foram incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente com anticorpos secundários alexa 488 para anticorpos cardíacos e alexa 555 para marcação do anticorpo anti-nitrotirosina. Após lavagens incubou-se por 15 minutos com DAPI. As lamínulas foram lavadas e montadas com glicergel (Invitrogen). As imagens foram analisadas por microscopia confocal. Foram analisados 8 poços de cultura de células diferentes, em dois experimentos de isquemia *in vitro* independentes.

Para os ensaios de colocalização com tecido cardíaco isquêmico e controle, os ventrículos esquerdos de ratos congelados foram cortados em criostato, fixados na lâmina com acetona 100% por 5 minutos. Os cortes

foram bloqueados com caseína 2% diluída em PBS por uma hora em temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados por 16 horas a 4°C com os anticorpos troponina I cardíaca feitos em cabra (Hytest #4T21) e anti-nitrotirosina (Millipore #06-284). Após sucessivas lavagens, as células foram incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente com anticorpos secundários alexa 555 para o anticorpo cardíaco e alexa 488 para marcação do anticorpo anti-nitrotirosina. Após lavagens as células foram incubadas com DAPI por 15 minutos. As lamínulas foram lavadas e montadas com glicergel (Invitrogen). As imagens foram analisadas por microscopia confocal.

3.7. Imunoprecipitação

Para identificar a troponina I cardíaca nitrada no soro de paciente após implante de *stent* e nos modelos animais com isquemia do miocárdio, foi realizada uma reação de imunoprecipitação para enriquecimento da porção nitrada do soro.

3.7.1. Ligação covalente de beads magnéticos e anticorpo anti-nitrotirosina

Os *beads* magnéticos proteína A (Invitrogen Dynalbeads #100-02D) foram lavados três vezes com PBS e em seguida incubados com anticorpo

anti-nitrotirosina (Millipore #06-284) na proporção de 1µg de anticorpo para cada 5µL de *bead* magnético proteína A. O anticorpo foi diluído em PBS no mesmo volume final de *beads* magnéticos proteína A utilizados. Os *beads* e os anticorpos ficaram sob agitação a 4°C por 16 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e o complexo *bead*-anticorpos foi lavado com PBST 0,1% três vezes com agitação por cinco minutos. Para realizar a ligação covalente entre o anticorpo e a proteína A acoplada ao *bead*, o complexo foi incubado com DMP 6,5mg/mL diluído em 200mM de trietanolamina por 30 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Esse processo foi repetido por três vezes, com uma lavagem com solução de 200mM de trietanolamina por cinco minutos sob agitação entre as incubações com DMP. Após a ligação foi realizado o *quenching* com duas incubações de cinco minutos com 50mM de etanolamina. Para retirada dos anticorpos que não se ligaram covalentemente, o complexo *bead*-anticorpos foi incubado duas vezes por 10 minutos em glicina 1M com pH 2,5.

O complexo *bead*-anticorpo foi armazenado a 4°C em PBS com 2mM de azida sódica.

3.7.2. Enriquecimentos das proteínas nitradas do soro

Foi realizada a dosagem de proteínas totais dos soros através do método de Bradford (BioRad #500-0001). Foram separados 10mg de proteínas de cada soro e pré incubadas com 50µL de *beads* magnéticos

acoplados a proteína A (Invitrogen Dynalbeads #100-02D) sob agitação a 4°C por 16 horas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e incubado com 50µL de *beads* magnéticos proteína A ligados covalentemente aos anticorpos sob agitação a 4°C por 16 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e os *beads* foram lavados por três vezes com PBST 0,1%. As proteínas nitradas foram eluídas dos anticorpos com duas lavagens consecutivas de 100µL de glicina 0,1M pH 2,5. O pH da solução contendo as proteínas nitradas foi equilibrado com 25uL de Tris-HCl 1M pH 9,0.

3.7.3. Quantificação das proteínas imunoprecipitadas

A proteína imunoprecipitada resultante foi quantificada utilizando o espectrofotômetro nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 280nm. Foi utilizada uma curva padrão de BSA nitrado para os cálculos de concentração.

3.8. Western-blot

Foi feito um gel de eletroforese SDS-PAGE 12%, onde foram analisadas 5µg de proteínas nitradas imunoprecipitadas. Em paralelo às proteínas foi inserido no gel um padrão de peso molecular (BioRad

Kaleidoscope #161-0324). Após a migração das proteínas no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE HybondP #25006567) no sistema semi-dry por 50 minutos. Após a transferência, a membrana permaneceu por 16 horas a 37°C para perfeita secagem. Após esse período a membrana foi bloqueada por 1 hora com 5% de leite desnatado em pó diluído em tampão PBST 0,1%. Após 3 lavagens com PBST 0,1%, a membrana foi incubada por 16 horas a 4°C sob agitação com anticorpo policlonal de cabra anti-troponina I cardíaca (Hytest #4T21) na diluição recomendada pelo fabricante, diluído em 5% leite desnatado em pó diluído em PBST 0,1%. Após seguidas lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo anti-IgG de cabra feito em camundongo conjugado com HRP, lavada novamente e revelada pelo método de quimioluminescência (ECL).

3.9. Análise molecular da troponina I nitrada *in vitro*

Para análise dos prováveis sítios de nitração da troponina I cardíaca, foi realizada a nitração *in vitro* com peroxinitrito seguida de digestão por várias enzimas e análise por espectrometria de massas (MS).

3.9.1. Nitração da troponina I cardíaca

Para reação de nitração de troponina I cardíaca foram utilizados 60µg de troponina I cardíaca purificada (Sigma #T9924), 20mM de NaH₂CO₃, 0,2mM de NaOH, 1mM de ONOO. Os reagentes foram misturados rapidamente sob agitação e mantidos agitando por 10 minutos em temperatura ambiente. A reação de nitração foi confirmada por Dot-Blot.

3.9.2. Dot-Blot

Para confirmar a nitração do BSA foi realizado um ensaio de Dot-Blot. Foram adsorvidos na membrana de nitrocelulose (GE Hybond #RPN303D). 2µL de 1mM de troponina I cardíaca nitrada e não nitrada. Após 10 minutos de secagem, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado dissolvido em PBST 0,1% por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo anti-nitrotirosina (Millipore #06-284) na concentração de 1µg/mL diluído em 5% de leite desnatado dissolvido em PBST 0,1% por duas horas a temperatura ambiente sob agitação. Foram feitas 3 lavagens de 15 minutos com PBST0,1%. Em seguida foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com HRP por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Após sucessivas lavagens, a marcação foi revelada DAB (Zimed).

3.9.3. Digestão enzimática

Foi realizada digestão *in silico* da troponina I cardíaca por várias enzimas através do programa Skyline®. Após as análises foram escolhidas as enzimas tripsina (KR/P), quimiotripsina (FWYM/P) e endopeptidase Glu-C (P) para os testes *in vitro*.

Foi aliquotado 50µL da troponina I cardíaca nitrada e adicionado 10µL de solução NH_4HCO_3 . Em seguida, foi adicionado 25µL de uma solução de 0,2% de RapiGest SF (Waters #186001861), vortexado e incubado por 15 minutos a 80°C. Após a incubação, foi esperado a solução esfriar a temperatura ambiente e adicionado 2,5µL de DTT 100mM. A solução foi incubada por 30 minutos a 60°C. Em seguida, foi esperado novamente a solução retornar a temperatura ambiente e adicionado 2,5µL de Iodoacetoamida 300mM. A reação foi incubada por 30 minutos, no escuro e a temperatura ambiente. Após a alquilação, foi adicionado 10µL de 0,05µg/µL de tripsina (Promega #V511A) 50mM diluída em NH_4HCO_3 , 10µL de 0,05 µg/µL quimiotripsina (Sigma #C6424) diluída em 1mM de HCl e 2mM CaCl_2 ; e 10µL de 0,05µg/µL de endopeptidase Glu-C (Sigma #P6181) diluído em 500mM de Tris-HCl pH7,8. A solução foi vortexada e incubada por 16 horas a 37°C.

Após a digestão, para hidrolizar o RapiGest, foi adicionado 10µL de TFA (Pierce # 53102) 5%. Foi incubado por 90 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 30 minutos a 6°C. O

sobrenadante foi transferido para um vial de vidro (Waters Total Recovery Vial #186000385c) e adicionado 5µL de Enolase digerida (Waters #1860002325) 1pmol/µL para controle interno. No final da reação, foi adicionado 85µL de uma solução de acetonitrila 3%, TFA 0,1%.

Como controle da digestão foi utilizado 50µg de BSA nitrado.

3.9.4. Análise por espectrometria de massas

A amostra foi analisada em um espectrômetro de massas LC-ESI-Q-TOF, Synapt G1 (Waters) com cromatografia líquida de fase reversa c18 acoplada.

Os fragmentos peptídicos foram separados por uma cromatografia líquida em nanoescala com o sistema nanoACQUITY (Waters) equipado com uma pré coluna Symmetry C18 (5µm, 5mm x 6300mm) e uma coluna analítica de fase reversa C18 Atlantis (3µm, 5mm x 675mm) (Waters). Um volume de 1µl de amostra foi injetado e inicialmente transferido com uma solução de 0,1% de ácido fórmico para a pré coluna em um fluxo de 4µL/min por 3 minutos. A fase móvel A utilizada foi água com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B foi 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Depois da dessalinização e pré-concentração, os peptídeos foram eluídos da pré-coluna para a coluna analítica e separados com um gradiente de 3-40% de fase móvel B por 90 minutos com fluxo de 300nL/min, seguidos de 10

minutos de limpeza com 90% de fase móvel B. A coluna foi reequilibrada nas condições iniciais por 20 minutos. A temperatura da coluna foi mantida 35°C. O componente *lock mass* Glu₁-fibrinopeptídeo B foi liberado pela bomba auxiliar do sistema de LC a 250nL/min na concentração de 100fmol/μL para o *spray* de referência da fonte NanoLockSpray do espectrômetro de massas. Todas as amostras foram analisadas em triplicata usando Synapt G1 QToF (Waters, Manchester, UK). Os dados de LC-MS foram coletados alternando o modo de aquisição em alta e baixa energia (LC-MS_E). O tempo de aquisição de cada espectro em ambos modos foi de 1,5s com 0,1s de intervalo entre escaneamentos. Em modo de MS de baixa energia, os dados foram coletados com energia de colisão constante de 4eV. Em modo de MS de alta energia, a energia de colisão era crescente de 15 a 40 eV durante cada 1,5s de integração. Os dados de um ciclo de baixa e alta energia eram adquiridos a cada 3,2s. O RF aplicado ao analisador de massas quadrupolo para que cada íon de massa carga a partir de 300 a 2000 fosse eficientemente transmitido. Para todas as medidas, o espectrômetro de massas operou em modo V com resolução típica de no mínimo 10000 FWHM. Todas as análises foram realizadas em modo ESI positivo. Foi corrigido o erro de massas após aquisição utilizando o íon monoisotópico duplamente protonado do Glu₁-fibrinopeptídeo B. O *spray* de referência foi amostrado a cada 30s.

Os dados foram processados utilizando os parâmetros do programa ProteinLynx Global Server Versão 2.3, modificados para proteínas nitradas.

3.9.5. Processamento de dados gerados por MS

Os dados de LC-MSE foram analisados utilizando o software PLGS2.3 que utiliza o algoritmo de contabilização de íons (Waters). Todas as buscas foram conduzidas utilizando o banco de dados Uniprot. Os parâmetros de busca padrão utilizados especificam o máximo de taxa de falso positivo de 5% contra um banco de dados reversos randomizado e inclui um ajustamento automático para medida de acurácia de massa de no mínimo um peptídeo encaixado por proteína e no mínimo três íons produtos por cada peptídeo, e um total de sete íons produtos por proteínas. A identificação é restrita a fragmentos trípticos com carbaminometilação de cisteínas. Em adição foi utilizado as seguintes modificações variáveis nos parâmetros de busca: deamidação de asparagina e glutamina, oxidação de metionina, desidratação de serina e treonina na fonte e nitratação de tirosinas..

3.10. Peptídeo para desenvolvimento de anticorpo monoclonal anti-nitrotroponina I

O peptídeo foi desenhado pelo grupo, sintetizado pela empresa Proteimax e em seguida nitrado e purificado pelo grupo. Em seguida foi enviado para a empresa GenScript para desenvolvimento do anticorpo monoclonal.

3.10.1. Desenho do peptídeo

O peptídeo foi desenhado baseado no banco de dados de estrutura do NCBI. Foram escolhidas regiões que continham tirosinas expostas, ou seja, passíveis de nitração *in vivo* e várias prolinas, por serem imunogênicas.

3.10.2. Nitração, purificação e caracterização do peptídeo

Para reação de nitração do peptídeo foram utilizados 500µM de peptídeo, 20mM de NaHCO₃, 0,2mM de NaOH e 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 2mM e 4mM de ONOO em volume final de 1mL. Os reagentes foram misturados rapidamente sob agitação e mantidos agitando por 10 minutos em temperatura ambiente.

Para a purificação do peptídeo mononitrado e binitrado foi utilizado um sistema de HPLC da marca Shimadzu modelo SCL-10 A, acoplado a um detector de UV SPD-10 AV com monitoramento em 215nm e 354nm (Shimadzu, MD, EUA), usando o software Class VP também da Shimadzu. Foi utilizada uma coluna C18 Gemini (Phenomenex #568910-4) de 250 x 4.60mm, diâmetro das partículas de 5µ e diâmetro dos poros de 110Å. Para separação utilizou como fase móvel de 30% acetonitrila e 0,05% de ácido trifluoroacético; e acetonitrila 0,05% ácido trifluoroacético. O fluxo utilizado

foi de 1mL/minuto. A temperatura da coluna foi mantida 40°C e o volume máximo de amostra de 200µL.

As frações purificadas de peptídeos nitrados e não nitrados foram concentradas por *speed vac*, ressuspendidas em 30% acetonitrila 0,05% TFA. Os peptídeos foram injetados no espectrômetro por infusão direta.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão (DP). Análises de variância de uma ou duas vias (ANOVA) com testes *post-hoc* do tipo Bonferroni, ou testes t de *Student* não pareados foram utilizados para comparar grupos e tratamentos quando apropriado. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Softwares Inc. CA, USA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados.

4. Resultados

4.1. Análise de nitração total no tecido cardíaco e no soro de pacientes e modelo animais de SCA

Para analisar a nitração total de proteínas no soro e no tecido após isquemia do miocárdio com e sem necrose, foram primeiramente utilizados ratos como modelo experimental.

Os 15 animais foram divididos em três grupos experimentais: controle, isquemia miocárdica seguida de reperfusão e isquemia miocárdica sem reperfusão (infarto).

Foram realizadas dosagens de CKMB e troponina I nos soros. Quanto aos resultados de CKMB circulantes, os diferentes grupos animais não apresentaram diferenças estatísticas. Em relação à dosagem de troponina I no soro, o grupo animal que sofreu isquemia sem reperfusão apresentou maiores concentrações desta proteína circulante; seguido dos animais com isquemia do miocárdio com reperfusão e, por último os animais do grupo controle. A diferença na concentração desta proteína circulante foi significativamente diferente entre os grupos (Figura 4).

Figura 4: Média de CKMB e troponina I circulantes nos diferentes grupos do modelo de murinos submetidos à isquemia miocárdica. Valores de referência: 4,94ng/mL para CKMB e 0,3ng/mL para Troponina I cardíaca.

Foram analisadas as formações de proteínas nitradas no músculo cardíaco após a indução de isquemia do miocárdio. Para isso, foi realizada uma reação de imunohistoquímica para detecção de proteínas nitradas.

Através da medida da porcentagem de área marcada pela imunohistoquímica foi possível observar diferenças estatísticas nas áreas marcadas nos diferentes grupos, sendo maior a área marcada no grupo infarto, seguido do grupo isquêmico com reperfusão e grupo controle (Figura 5).

Figura 5: Detecção de proteínas nitradas em músculo cardíaco de ratos: A) Controle negativo da reação de imunohistoquímica. B) Marcação anti-nitrotirosina de músculo cardíaco controle. C) Marcação no modelo isquemia/reperfusão. D) Marcação no modelo de infarto. Marcação positiva dada pela coloração castanha e marcada por setas. Magnificação 400x, contracoloração por hematoxilina. E) Quantificação da área de nitração nos corte histológicos.

Baseado nos resultados de imunohistoquímica, em que o tecido apresentou aumento de nitração em situação isquêmica, foi analisado se no soro também haveria esse aumento de nitração, uma vez que o objetivo do trabalho é buscar um marcador circulante para isquemia cardíaca.

As proteínas nitradas no soro foram quantificadas por um ensaio ELISA utilizando como padrão o BSA nitrado.

Assim como observado no tecido, o soro também apresentou um aumento estatisticamente significativo na quantidade de proteínas nitradas após o período de isquemia seguido ou não de reperfusão (Figura 6).

Figura 6: Quantificação de proteínas totais nitradas circulantes em soro de modelos murinos de isquemia do miocárdio.

Após os resultados apresentados em experimentos de roedores, foi analisado se o mesmo perfil de nitração após isquemia era identificado em modelos animal de maior porte e com o perfil cardíaco próximo ao humano. Para tal, foi utilizado o suíno como modelo experimental.

Três porcos foram submetidos a uma oclusão com cateter balão, o qual foi mantido inflado por 10 minutos na porção proximal da ACX, seguida de 3 horas de reperfusão (Figura 7). Foi coletado soro antes da intervenção, imediatamente após início da reperfusão; 10, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a reperfusão para análises de CKMB, troponina T e troponina T ultrassensível (Figura 8) e nitração total (Figura 9).

Figura 7: Angiografia representativa da oclusão de ACX. A) basal pré oclusão e B) pós oclusão permanente da porção proximal de ACX.

Como esperado não houve aumento de CKMB, troponina I e troponina T no soro desses animais após a indução de isquemia.

Figura 8: Dosagem dos marcadores de necrose cardíaca. A) Média da dosagem de troponina T circulante dos animais isquêmicos. B) Média da dosagem de CKMB circulante. C) Média de dosagem de troponina T ultrasensível dos animais isquêmicos. As linhas pontilhadas indicam o valor de referência (Troponina T: 0,1ng/mL, CKMB: 5ng/mL, Troponina T ultrasensível: 0,014ng/mL).

Foi observado aumento da média de troponina T no teste ultrasensível somente no último intervalo de tempo coletado, e esse aumento foi observado pontualmente em um animal e foi responsável pelo aumento da média. Os outros dois animais estavam com dosagens abaixo do valor de referência.

Foi observado aumento das proteínas nitradas circulantes nos intervalos de tempo após início de reperfusão. Os animais apresentaram diferença entre si quanto à inclinação da reta, porém todos apresentaram aumento de nitração quando comparado à quantidade de proteína nitrada antes da indução de isquemia (Figura 9).

Figura 9: Nitração total de proteínas séricas. Medida de absorbância por ELISA anti-nitrotirosina das proteínas circulantes nos intervalos de tempo pós-isquemia.

Após 180 minutos de isquemia, os animais foram eutanasiados e em seguida foram coletados tecidos cardíacos da região isquêmica e não isquêmica para análises de proteínas nitradas através de imunohistoquímica (Figura 10).

Figura 10: Detecção de proteínas nitradas em músculo cardíaco de porcos: A) Controle negativo da reação de imunohistoquímica. B) Marcação anti-nitrotirosina de músculo cardíaco de porco da porção não isquêmica. C e D) Marcação no modelo isquemia/reperfusão porção isquêmica. Marcação positiva dada pela coloração castanha e marcada por setas. Magnificação 400x, contracoloração por hematoxilina. E) Quantificação da área de nitração nos corte histológicos.

A porcentagem de área de tecido nitrado foi estatisticamente maior no tecido isquêmico comparado à região não isquêmica (figura 10), como observado em miocárdio de roedores.

Foram verificadas também a nitração das proteínas do soro de porcos como modelo de isquemia sem reperfusão através do tempo, a partir do evento isquêmico. Em um dos animais, houve desacoplamento acidental do acesso venoso após 16 horas, o que justifica a coleta de soro até esse ponto.

Foram realizadas dosagens de troponina T circulante, troponina T ultrassensível e CKMB (Figura 11) em todos os intervalos de coleta. Como esperado esse marcador elevou-se após, em média, 6 horas da obstrução coronária.

A

B

C

Figura 11: Dosagem dos marcadores de necrose cardíaca. A) Média da dosagem de troponina T circulante dos animais infartados. B) Média de dosagem de CKMB circulante dos animais infartados. C) Média de dosagem de troponina T ultrasensível dos animais infartados. As linhas indicam os valores de referência (Troponina T: 0,1ng/mL, CKMB: 5ng/mL, Troponina T ultrasensível: 0,014ng/mL).

Foi realizado um teste ELISA anti-nitrotirosina para verificar a quantidade de proteínas nitradas no soro total nos intervalos de tempo. Foi verificado um aumento de proteínas nitradas à medida que aumentavam os intervalos de tempo após o início da isquemia. Porém, ao contrário do esperado, não foi observada queda da nitração ou platô da curva, a qual se manteve ascendente (Figura 12).

A

Figura 12: Nitração total de animais após infarto agudo do miocárdio (IAM). A e B absorbância do teste ELISA anti-nitrotirosina da curva de tempo após IAM de dois animais como exemplo de nitração crescente.

4.2. Análise da nitração total no soro de pacientes com SCA e indivíduos controles

Os resultados obtidos em modelos de isquemia suínos indicaram a medida da nitração proteica como um bom marcador de isquemia cardíaca, estando presente mesmo em condições de reperfusão e ausência de necrose.

Com objetivo de verificar se as mesmas características são observadas em humanos após evento isquêmico, foram coletados soros de 100 pacientes com SCA (exames que mostraram elevação do segmento ST no eletrocardiograma, troponina circulante acima de 0,03ng/mL e CKMB acima

de 4,94ng/mL) e 100 indivíduos controles e realizada a quantificação de proteínas nitradas.

A média da absorbância de pacientes infartados foi estatisticamente maior comparada a dos indivíduos controles (Figura 13).

Figura 13: Média de absorbância a 450nm em teste ELISA anti-nitrotirosina em soro de pacientes controles e após isquemia.

Porém, quando os valores de absorbância foram distribuídos em um histograma (figura 14), foi observado que tanto indivíduos com SCA quanto controles estavam distribuídos no intervalo de absorbância entre 0,1 e 0,2. Não sendo, portanto a quantidade de proteínas nitradas circulantes um dado suficiente para diagnóstico de SCA.

Figura 14: Histograma com distribuição da medida de absorbância em 450nm no ensaio ELISA anti-nitrotirosina em pacientes controles e com SCA. O eixo X representa a frequência de indivíduos. O eixo Y representa a medida de absorbância em 450nm.

4.3. Análise da troponina I cardíaca nitrada como marcador de isquemia modelo celular, soro e tecido de pacientes e animais com SCA

Foi feita uma reação de imunofluorescência em cardiomiócitos após isquemia *in vitro* com objetivo de identificar proteínas cardíacas onde a marcação se localiza com a marcação de anti-nitrotirosina.

A isquemia *in vitro* consistiu em colocar a cultura de cardiomiócitos sob baixa tensão de oxigênio (3% O₂) e meio isquêmico. Foi feita uma curva de tempo, com intervalos de 15, 30 e 60 minutos de isquemia, seguidos de 60 minutos de reperfusão com tensões normais de oxigênio para determinar qual o melhor ponto para isquemia. O controle foi mantido em tensões normais de oxigênio (21% O₂) por 3 horas. A intensidade de marcação do

anticorpo anti-nitrotirosina foi crescente de acordo com o tempo de isquemia (Figura 15).

Foram testados alguns anticorpos de proteínas específicas cardíacas para imunofluorescência que seriam candidatas a se colocarem com anti-nitrotirosina. Somente a marcação do anticorpo anti-troponina I cardíaca colocou com a marcação de anti-nitrotirosina. As células que não foram submetidas à isquemia mostraram uma fraca marcação de nitrotirosina comparado às células isquêmicas (Figura 15). Nas culturas que foram submetidas à isquemia *in vitro* foi observada uma forte colocação, sugerindo assim que a troponina I cardíaca é nitrada em resposta ao evento isquêmico.

A cultura de cardiomiócitos não estava totalmente pura, havendo a presença de fibroblastos. Através dessa característica pode-se observar que os cardiomiócitos são mais sensíveis a isquemia comparado ao fibroblasto, uma vez que os últimos apresentavam menor marcação de anti-nitrotirosina.

Figura 15: Colocalização da troponina I cardíaca e nitrotirosina por imunofluorescência. Em azul (DAPI) marcação de núcleo, em verde marcação de troponina I cardíaca, em vermelho marcação de nitrotirosinas e em *merge* sobreposição das marcações. Indicação do tempo de isquemia em minutos à esquerda. Fotos tiradas em confocal. Magnificação de 63x.

Foi identificado troponina I cardíaca nitrada em tecido cardíaco de roedores após isquemia miocárdica (Figura 16).

Figura 16: : Marcação de troponina I nitrada por imunofluorescência em tecido cardíaco de ratos controles, com 5 minutos de isquemia e infarto agudo. Magnificação 63x.

Assim como no modelo de isquemia celular, o tecido cardíaco após isquemia apresentou colocalização da marcação de troponina I cardíaca e de proteínas nitradas. O tecido do animal controle apresentou marcação para troponina I cardíaca, porém apresentou baixa marcação para proteínas

nitradas, assim como nos experimentos de imunohistoquímica e no experimento de isquemia em cultura de células.

4.4. Análise da troponina I cardíaca nitrada em soro de modelos animais e de pacientes com isquemia do miocárdio

Após a confirmação da presença de troponina I cardíaca nitrada no tecido cardíaco de roedores na presença e ausência de reperfusão, foi realizado uma busca de troponina I cardíaca nitrada no soro.

Foi realizado um enriquecimento das proteínas nitradas do soro por imunoprecipitação. Após, foi identificada a troponina I cardíaca através de western-blot.

Primeiramente foi realizado esse enriquecimento em soro de um animal antes do IAM e após IAM (Figura 17A). E, através de western-blot anti-troponina I cardíaca foi possível observar que a troponina I cardíaca é encontrada no soro na forma nitrada após a isquemia cardíaca (Figura 17B).

Figura 17: Enriquecimento de proteínas nitradas seguida de identificação de troponina I cardíaca. A) Eletroforese SDS-PAGE 12% corada com prata mostrando proteínas nitradas enriquecidas por imunoprecipitação. B) Western-blot com anticorpo anti-troponina I cardíaca. MW – Marcador de peso molecular. kDa – Quilodaltons. – 1 animal controle. 2 – animal IAM.

Em seguida, este teste foi realizado no soro de 3 porcos com IS, 5 porcos com IAM e 3 pacientes após isquemia induzida por angioplastia com implante de *stent*.

Nos modelos de suínos, não houve identificação de troponina I cardíaca nitrada antes da indução de isquemia (Figura 18A e 18B), enquanto que em alguns pacientes houve uma quantidade relativamente menor de troponina I cardíaca nitrada antes da angioplastia (Figura 18C). A troponina I cardíaca permaneceu nitrada até o final do período coletado.

Nos pacientes submetidos à angioplastia não foi possível observar alteração nos níveis de troponina I e troponina T em teste ultrasensível (Figura 19) após a indução de isquemia; porém foi possível identificar aumento de troponina I cardíaca nitrada como indicador de isquemia.

Nos modelos suínos de isquemia do miocárdio com necrose (IAM) a troponina I cardíaca nitrada passa a ser detectada somente após um período de 60 minutos de isquemia (Figura 18B).

TEMPO PÓS-INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

TEMPO PÓS-ISQUEMIA INDUZIDA

Figura 18: Identificação de Troponina I cardíaca nitrada por western-blot. A) Amostra de soro de um porco após IS. B) Amostra de soro de um porco após IAM. C) Amostra de soro de um paciente após isquemia induzida. A área em destaque indica as amostras com resultado positivo. IS: Isquemia, T: Troponina I cardíaca purificada.

A

B

Figura 19: Dosagem dos marcadores circulantes de necrose cardíaca nos paciente após indução de isquemia por implante de *stent*. A) Média da dosagem de troponina I. B) Média de dosagem de troponina T ultrasensível. As linhas pontilhadas indicam o valor de referência (Troponina I: 0,160ng/mL, Troponina T ultrasensível: 0,014ng/mL).

4.5. Análise molecular da troponina I nitrada *in vitro*.

Até o momento, nossos dados sugeriram a troponina I cardíaca como uma proteína nitrada. Como não há relatos na literatura da modificação por nitração desta proteína, fomos verificar se a troponina poderia ser nitrada e quais os sítios de nitração.

Para o ensaio de nitração *in vitro*, foi utilizada a troponina I cardíaca humana (Sigma #T9924). Foi sintetizado peroxinitrito e, em seguida, 40µg de troponina I cardíaca foi nitrada com 1mM de peroxinitrito. A reação de nitração foi confirmada por ensaio de dot-blot (Figura 20).

Figura 20: Dot-blot da troponina I cardíaca nitrada. A) Troponina I cardíaca não nitrada, controle negativo da reação. B) Troponina I cardíaca nitrada com 1mM de peroxinitrito. C) BSA nitrado controle positivo da reação de dot-blot.

A nitrotroponina foi digerida por tripsina, quimiotripsina e endopeptidase Glu-C em busca da melhor enzima para caracterização. Os peptídeos foram analisados por LC-ESI-Q-TOF.

Dos peptídeos esperados pela digestão *in silico* (Tabela 1) apenas alguns foram encontrados.

Na amostra que foi digerida por tripsina foi identificado por MS o maior número de peptídeos, teve uma cobertura de 66,7% de identificação da troponina e identificou três sítios de nitratação (Figura 21A e B). O BSA nitrado utilizado como controle também foi identificado e teve uma cobertura de 80,2% (Figura 21C e D).

Tabela 1: Digestão *in silico* da troponina I cardíaca. Peptídeos preditos após digestão.

Tripsina	Quimiotripsina	Endopeptidase Glu-C
MADGSSDAAR	ADGSSDAAREPRPAPA PIRRR	MADGSSDAAREP
EPRPAPAPIR	AELQDLCRQLHARVDK VDEERY	IRRRSSNYRAYAT EP
SSNYR	DIEAKVTKNITEIADLTQ KIF	
AYATEPHAK	DLRGKF	
ISASR	KRPTLRRVRISADAM	
NITEIADLTQK	RKNIDALSGM	
MADGSSDAAREPRPAPAPIR	EGRKKKF	
TLLLQIAK		
QELER		
EAEER		
ALSTR		
CQPLELAGLGFAELQDL		
QLHAR		
VDEER		
YDIEAK		
IFDLR		
RPTLR		
ISADAMMQALLGAR		
ESDLR		
EDTEK		
EVGDWR		
NIDALSGMEER		

Start	End	Sequence	Modifications	Retention Time (min)	Intensity
121	131	(K) NITEIADLTQK (I)		66.84	3759737
149	162	(R) ISADAMMQALLGAR (A)		108.68	1646706
194	204	(K) NIDALSGMEGR (K)		58.05	1073547
80	98	(R) CQPLELAGLGFAELQDLQR (Q)	Carbamidomethyl C (1), Carbamidomethyl C (18)	118.84	941637
149	162	(R) ISADAMMQALLGAR (A)	Oxidation M (7)	82.85	904288
194	204	(K) NIDALSGMEGR (K)	Oxidation M (8)	41.99	777936
163	170	(R) AKESLDLR (A)		31.82	637861
132	136	(K) IFDLR (G)		56.88	490993
11	20	(R) EPRPAPAPIR (R)		30.40	278459
165	170	(K) ESLDLR (A)		38.17	265585
121	131	(K) NITEIADLTQK (I)	Deamidation Q (10)	69.38	202922
149	162	(R) ISADAMMQALLGAR (A)	Oxidation M (6), Oxidation M (7)	57.53	149274
59	68	(K) QELEREAEER (R)		28.14	86630
149	162	(R) ISADAMMQALLGAR (A)	Deamidation Q (8)	111.60	66213
80	98	(R) CQPLELAGLGFAELQDLQR (Q)	Carbamidomethyl C (1), Deamidation Q (2), Carbamidomethyl C (18)	124.81	62903
193	204	(R) KNIDALSGMEGR (K)	Oxidation M (9)	33.58	53528
121	131	(K) NITEIADLTQK (I)		66.84	49172
51	63	(K) TLLLQIAKQELER (E)	Deamidation Q (9)	111.39	48387
118	131	(K) VTKNITEIADLTQK (I)	Deamidation N (4)	78.38	47418
11	21	(R) EPRPAPAPIRR (R)		26.87	35891
147	162	(R) VRISADAMMQALLGAR (A)	Oxidation M (9)	83.12	35232
107	117	(K) VDEERYDIEAK (V)	Nitrotyrosine (6)	51.72	35098
28	36	(R) AYATEPHAK (K)	Nitrotyrosine (2)	24.81	26550
165	170	(K) ESLDLR (A)		31.84	22849
121	136	(K) NITEIADLTQKIFDLR (G)	Deamidation Q (10)	132.45	15894
193	204	(R) KNIDALSGMEGR (K)	Deamidation N (2)	61.42	13352
196	204	(I) DALSGMEGR (K)	Oxidation M (6)	42.01	13112
12	20	(E) PRPAPAPIR (R)		30.42	12885
127	131	(A) DLTQK (I)		66.86	11794
126	131	(I) ADLTQK (I)		66.83	11745
194	205	(K) NIDALSGMEGRK (K)		50.97	10772
194	198	(K) NIDAL (S)		58.03	10107
194	204	(K) NIDALSGMEGR (K)	Oxidation M (8)	42.00	10105
199	204	(L) SGMEGR (K)	Oxidation M (3)	41.99	9620
125	131	(E) IADLTQK (I)		66.85	9490
121	128	(K) NITEIADL (T)		66.84	8251
124	131	(T) E IADLTQK (I)		66.83	8165
166	170	(E) SLDLR (A)		31.85	7714
194	199	(K) NIDALS (G)		58.04	7147
167	170	(S) LDLR (A)		31.85	6726

A

P19429 Coverage Map

1	MADGSSDAAR	EPRPAPAPIR	RRSSNYRAYA	TEPHAKKKSK	ISASRKLQLK
51	TLLLQIAKQE	LEREAEEERRG	EKGRALSTRG	QPLELAGLGF	AELQDLQRQL
101	HARVDKVDEE	RYDIEAKVTK	NITEIADLTQ	KIFDLRGKFK	RPTLRVRIS
151	ADAMMQALLG	ARAKESLDLR	AHLKQVKKED	TEKENREVG	WRKNIDALSG
201	MEGRKKKFES

B

Start	End	Sequence	Modifications
529	544	(K) LFTFHADICTLPDTEK (Q)	Carbamidomethyl C (9)
508	523	(R) RPCFSALTPDETYVPK (A)	Carbamidomethyl C (3)
421	433	(K) LGEYGFQNALIVR (Y)	
298	309	(K) LKECCDKPLEK (S)	Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (5)
581	597	(K) CCAADDKEACFAVEGPK (L)	Carbamidomethyl C (1), Carbamidomethyl C (2), Carbamidomethyl C (10)
402	412	(K) HLVDEPQNLK (Q)	
387	399	(K) DDPHACYSTVFDK (L)	Carbamidomethyl C (6)
286	297	(K) YICDNQDTISSK (L)	Carbamidomethyl C (3)
569	580	(K) TVMENFVAFVDK (C)	
375	386	(K) EYEATLEECCAK (D)	Carbamidomethyl C (9), Carbamidomethyl C (10)
66	75	(K) LVNELTEFAK (T)	
347	359	(K) DAFLGSFLYEYSR (R)	
139	151	(K) LKPDNTLDCDFK (A)	Carbamidomethyl C (9)
89	100	(K) SLHTLFGDELCK (V)	Carbamidomethyl C (11)
499	507	(K) CCTESLVNR (R)	Carbamidomethyl C (1), Carbamidomethyl C (2)
319	340	(K) DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK (N)	Carbamidomethyl C (21)
35	44	(R) FKDLGEEHFK (G)	
249	256	(K) AEFVEVTK (L)	
469	482	(R) MPCTEDYLSLILNR (L)	Oxidation M (1), Carbamidomethyl C (3)
421	433	(K) LGEYGFQNALIVR (Y)	Nitrotyrosine (4)
267	280	(K) ECCHGDLLECADDR (A)	Carbamidomethyl C (2), Carbamidomethyl C (3), Carbamidomethyl C (10)
123	138	(R) NECFLSHKDDSPDLK (L)	Carbamidomethyl C (3)
257	263	(K) LVTDLT (V)	
45	65	(K) GLVLIAFSQYLQCCPFDEHVK (L)	Carbamidomethyl C (14)
106	117	(R) ETYGDMAADCEK (Q)	Carbamidomethyl C (9), Carbamidomethyl C (10)
437	451	(R) KVPQVSTPTLVEVSR (S)	Deamidation Q (4)
508	523	(R) RPCFSALTPDETYVPK (A)	Carbamidomethyl C (3), Nitrotyrosine (13)
549	557	(K) QTALVELLK (H)	
286	297	(K) YICDNQDTISSK (L)	Nitrotyrosine (1), Carbamidomethyl C (3)
375	399	(K) EYEATLEECCAKDDPHACYSTVFDK (L)	Carbamidomethyl C (9), Carbamidomethyl C (10), Carbamidomethyl C (18)
198	204	(K) GACLLPK (I)	Carbamidomethyl C (3)
184	197	(K) YNGVFQECQAEDK (G)	Carbamidomethyl C (8), Carbamidomethyl C (9)
264	280	(K) VHKECCHGDLLECADDR (A)	Carbamidomethyl C (5), Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (13)
168	183	(R) RHPFYAPELLYYANK (Y)	Nitrotyrosine (12)
508	523	(R) RPCFSALTPDETYVPK (A)	Carbamidomethyl C (3)
300	309	(K) ECCDKPLEK (S)	Carbamidomethyl C (2), Carbamidomethyl C (3)
184	197	(K) YNGVFQECQAEDK (G)	Nitrotyrosine (1), Carbamidomethyl C (8), Carbamidomethyl C (9)
569	580	(K) TVMENFVAFVDK (C)	Oxidation M (3)
106	117	(R) ETYGDMAADCEK (Q)	Nitrotyrosine (3), Carbamidomethyl C (9), Carbamidomethyl C (10)

C

ALBU_BOVIN Coverage Map

1	MKQVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA
51	FSQYLQCCPF	DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCCKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPLK	PDPNTLDCDF
151	KADEKKFWGK	YLYEIAARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQK	CCQAEDKQAC
201	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPKAE
251	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLEK
301	CCDKPLEKES	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQFAKDAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPE	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKQNCDDQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVIKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP	KATEEQKLTIV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
601	STQTALA

D

Figura 21: Digestão da troponina I cardíaca nitrada por tripsina. A) Peptídeos da troponina I nitrada sequenciados. B) Mapa de cobertura da troponina I cardíaca nitrada. C) Peptídeos do BSA nitrado sequenciados. D) Mapa de cobertura do BSA nitrado.

A digestão por quimiotripsina não foi capaz de identificar a troponina I cardíaca nitrada, porém identificou o BSA nitrado e os sítios de nitração com uma cobertura de 29% (Figura 22).

OK	Accession	Entry	Description	mW (Da)	pI (pH)
✓	CTRB1_HUMAN	P17538	Chymotrypsinogen B OS Homo sapiens GN CTRB1 PE 2 SV 1	27852	6.9
?	CTRB2_HUMAN	Q6GPI1	Chymotrypsinogen B2 OS Homo sapiens GN CTRB2 PE 2 SV 2	27905	7.7

A

Start	End	Sequence	Modifications
109	126	(Y) GDMADCCCKQEPERNECF (L)	Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (17)
377	393	(Y) EATLECCAKDDPHACY (S)	Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (8), Carbamidomethyl C (16)
578	591	(F) VDKCCRADDEKACF (A)	Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (5), Carbamidomethyl C (13)
109	126	(Y) GDMADCCCKQEPERNECF (L)	Oxidation M (3), Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (17)
512	525	(F) SALTPDETYPVKAF (D)	Nitrotyrosine (9)
127	150	(F) LSHKDDSPDLFKLPDPNTLCDEF	Carbamidomethyl C (21)
36	43	(F) KDLGEEHF (K)	
61	73	(F) DEHVKLVLNLTET (A)	
333	342	(F) AEDKDVCKNY (Q)	Carbamidomethyl C (7)
377	393	(Y) EATLECCAKDDPHACY (S)	Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (8), Carbamidomethyl C (16), Nitrotyrosine (17)
521	525	(Y) VPKAF (D)	
592	607	(F) AVEGPKLVVSTQTALA (-)	
526	530	(F) DEKLF (I)	
55	60	(Y) LQCCPF (D)	Carbamidomethyl C (4)
25	35	(R) DTHKSEIAHRF (K)	
109	126	(Y) GDMADCCCKQEPERNECF (L)	Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7), Deamidation N (15), Carbamidomethyl C (17)
27	35	(T) HKSEIAHRF (K)	
95	108	(F) GDELCKVASLRETY (G)	Carbamidomethyl C (5), Nitrotyrosine (14)
127	150	(F) LSHKDDSPDLFKLPDPNTLCDEF	Deamidation N (18), Carbamidomethyl C (21)
40	43	(G) EEHF (K)	
151	157	(F) KADEKKF (W)	
28	35	(H) KSEIAHRF (K)	
29	35	(K) SEIAHRF (K)	
31	35	(E) IAHRF (K)	
33	35	(A) HRF (K)	
37	43	(K) DLGEEHF (K)	
38	43	(D) LGEEHF (K)	
61	69	(F) DEHVKLVLNE (L)	
61	70	(F) DEHVKLVLNEL (I)	
61	71	(F) DEHVKLVLNELT (E)	
61	72	(F) DEHVKLVLNELTE (F)	
61	73	(F) DEHVKLVLNELTEF (A)	
109	119	(Y) GDMADCCCKQE (F)	Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7)
109	124	(Y) GDMADCCCKQEPERNE (C)	Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7)
109	125	(Y) GDMADCCCKQEPERNECF (F)	Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (17)
109	125	(Y) GDMADCCCKQEPERNECF (F)	Oxidation M (3), Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (17)
109	126	(Y) GDMADCCCKQEPERNECF (L)	Oxidation M (3), Carbamidomethyl C (6), Carbamidomethyl C (7), Carbamidomethyl C (17)
112	126	(M) ADCCKQEPERNECF (L)	Carbamidomethyl C (3), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (14)
114	126	(D) CCKQEPERNECF (L)	Carbamidomethyl C (1), Carbamidomethyl C (2), Carbamidomethyl C (12)

B

ALBU_BOVIN Coverage Map

1	MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRTKDLGE	EHEKGLVLIA
51	FSQYLQCCPF	DEHVKLINEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCCKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK	YLVEIARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEKDGAC
201	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPKAE
251	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLCADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKQNCDFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP	KATEEQKQTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
601	STQTALA

C

Figura 22: Digestão da troponina I cardíaca nitrada por quimiotripsina. A) Proteína identificada pelo banco de dados na amostra de troponina I cardíaca. B) Peptídeos do BSA nitrado sequenciados. C) Mapa de cobertura do BSA nitrado.

Na amostra digerida por endopeptidase Glu-C foi possível identificar a troponina I cardíaca, foi obtida uma cobertura de 33% da proteína, porém não foi possível identificar nenhum sítio de nitração (Figura 23A e B). Na amostra controle de BSA nitrado foi possível identificar a proteína e os sítios de nitração (Figura 23C e D).

Start	End	Sequence	Modifications
85	92	(E) LAGLGFAE (L)	
72	84	(E) KGRALSTRCQPLE (L)	Carbamidomethyl C (9)
72	81	(E) KGRALSTRCQ (P)	Carbamidomethyl C (9)
72	84	(E) KGRALSTRCQPLE (L)	Carbamidomethyl C (9), Deamidation Q (10)
72	83	(E) KGRALSTRCQPL (E)	Carbamidomethyl C (9)
166	179	(E) SLDLRAHLKQVKKE (D)	Deamidation Q (10)
49	60	(Q) LKTLILLQIAKQE (L)	
72	84	(E) KGRALSTRCQPLE (L)	Carbamidomethyl C (9)
116	124	(E) AKVTKNITE (I)	Deamidation N (6)
41	60	(K) ISASRKLQKTLILLQIAKQE (L)	
72	82	(E) KGRALSTRCQP (L)	Carbamidomethyl C (9)
169	179	(D) LRAHLKQVKKE (D)	
37	60	(K) KSKISASRKLQKTLILLQIAKQE (L)	
168	179	(L) DLRAHLKQVKKE (D)	Deamidation Q (8)
35	60	(H) AKKKSKISASRKLQKTLILLQIAKQE	
72	83	(E) KGRALSTRCQPL (E)	Carbamidomethyl C (9), Deamidation Q (10)
73	84	(K) GRALSTRCQPLE (L)	Carbamidomethyl C (8)
72	81	(E) KGRALSTRCQ (P)	Carbamidomethyl C (9), Deamidation Q (10)

A

P19429 Coverage Map

1	MADGSSDAAR	EPRPAPAPIR	RRSSNYRAYA	TEPHAKKKSK	ISASRKLQLK
51	TLILLQIAKQE	LEREAEERRG	EKGRALSTRC	QPLELAGLGF	AELQDLCRQL
101	HARVDKVDDE	RYDIEAKVTK	NITEIADLTQ	KIFDLRGKFK	RPTLRVRIS
151	ADAMMQALLG	ARAKESLDLR	AHLKQVKKED	TEKENREVG	WRKNIDALSG
201	MEGRKKKFES

B

Start	End	Sequence	Modifications
595	607	(E) GPKLVVSTOTALA (-)	
449	465	(E) VSRSLGKVGTRCCTKPE (S)	Carbamidomethyl C (12), Carbamidomethyl C (13)
474	488	(E) DYLSLILNRLCVLHE (K)	Nitrotyrosine (2), Carbamidomethyl C (11)
155	164	(E) KKFVGKLYE (I)	Nitrotyrosine (7)
165	176	(E) IARRHPYFYAPE (L)	
589	594	(E) ACFAVE (G)	Carbamidomethyl C (2)
165	174	(E) IARRHPYFYA (P)	
177	190	(E) LLYYANKYNGVFOE (C)	
364	375	(E) YAVSVLLRLAKE (Y)	
99	106	(L) CKVASLRE (T)	Carbamidomethyl C (1)
345	356	(E) AKDAFLGSFLYE (Y)	Nitrotyrosine (11)
177	190	(E) LLYYANKYNGVFOE (C)	Deamidation N (6)
528	535	(E) KLFTFHAD (I)	
165	176	(E) IARRHPYFYAPE (L)	Nitrotyrosine (9)
177	190	(E) LLYYANKYNGVFOE (C)	Nitrotyrosine (8)
177	190	(E) LLYYANKYNGVFOE (C)	Nitrotyrosine (3), Nitrotyrosine (4)
165	174	(E) IARRHPYFYA (P)	Nitrotyrosine (9)
566	572	(E) QLKTIVME (N)	
155	164	(E) KKFVGKLYE (I)	
364	377	(E) YAVSVLLRLAKEYE (A)	Nitrotyrosine (1)
102	106	(V) ASLRE (T)	
450	465	(V) SRSLGKVGTRCCTKPE (S)	Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (12)
101	106	(K) VASLRE (T)	
544	554	(E) KOIKKQOTALVE (L)	
177	190	(E) LLYYANKYNGVFOE (C)	Nitrotyrosine (4), Deamidation N (6)
544	554	(E) KOIKKQOTALVE (L)	Deamidation Q (2)
165	173	(E) IARRHPYFY (A)	
348	356	(D) AFLGSFLYE (Y)	
364	375	(E) YAVSVLLRLAKE (Y)	Nitrotyrosine (1)
595	606	(E) GPKLVVSTOTAL (A)	
366	375	(A) VSVLLRLAKE (Y)	
544	553	(E) KOIKKQOTALV (E)	
155	163	(E) KKFVGKLY (E)	Nitrotyrosine (7)
165	176	(E) IARRHPYFYAPE (L)	
165	176	(E) IARRHPYFYAPE (L)	Nitrotyrosine (9)
477	488	(L) SLILNRLCVLHE (K)	Carbamidomethyl C (8)

C

ALBU_BOVIN Coverage Map

1	MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA
51	FSQYLOQCPF	DEHVKLVLNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPLK	PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK	YLYEIAARRHP	YFYAPELLVY	ANKYNGVFOE	CCQAEKDGAC
201	LLPKIETMRE	KVLASSAROR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFFPKAE
251	FVEVTKLVLD	LTKVHKECCH	GDLEECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAQDAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEAIL	EECCAKDDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKONCDQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPILVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESEKMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVIKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQI
551	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
601	STOTALA

D

Figura 23: Digestão da troponina I cardíaca nitrada por tripsina. A) Peptídeos da troponina I nitrada sequenciados. B) Mapa de cobertura da troponina I cardíaca nitrada. C) Peptídeos do BSA nitrado sequenciados. D) Mapa de cobertura do BSA nitrado.

Foi confirmada a nitração da troponina I cardíaca por MS. A proteína apresenta 3 tirosinas que poderiam ser nitradas (Figura 24) e as três foram identificadas como nitradas por espectrometria de massas.

Os resultados demonstraram que a tirosina 29 está nitrada em na maioria identificadas pelo ESI-Q-TOF, enquanto a tirosina 26 está nitrada em apenas algumas moléculas. Porém, em todas as moléculas em que foi possível identificar a nitração da tirosina 26, a tirosina 29 também estava nitrada. Desta maneira, foi possível identificar um troponina I cardíaca mononitrada e binitrada. A nitração da tirosina 111 só foi identificada uma única vez.

gi|151101270|ref|NP_000354.4| troponin I, cardiac muscle [Homo sapiens]

MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKSKISASRKLQKTLTLLQIAKQELEREAEERRG
EKGRALSTRCQPLELAGLGFAELQDLCRQLHARVDKVDEERYDIEAKVTKNITEIADLTQKIFDLRGKFK
RPTLRRVRISADAMMQALLGARAKESLDLRAHLKQVKKEDTEKENREVGDWKRNIDALSGMEGRKKKFES

B

Figura 24: Troponina I cardíaca. A) Estrutura tridimensional esquemática da troponina I cardíaca, com as 3 tirosinas em destaque. B) Sequência FASTA da troponina I cardíaca com as tirosinas em negrito.

4.6. Peptídeo para desenvolvimento de anticorpo monoclonal anti-nitrotroponina I

Baseado nos resultados de espectrometria de massas e análise da estrutura tridimensional da molécula foi desenhado um peptídeo para desenvolvimento do anticorpo.

O peptídeo foi sintetizado pela empresa Proteimax. O peptídeo contém duas tirosinas que podem ser nitradas e prolinas e argininas que são imunogênicas.

Foi realizada uma curva de concentração de peroxinitrito para o ensaio de nitração e foi escolhido 2mM para realizar os experimentos, por apresentar maior rendimento do peptídeo nitrado (Figura 25).

Figura 25: Nitração do peptídeo para desenvolvimento do anticorpo monoclonal. A) Gráfico de rendimento da nitração do peptídeo em diferentes concentrações de peroxinitrito. B) Cromatograma de purificação do peptídeo mono e binitrado.

Após a purificação dos peptídeos mono e binitrados, eles foram injetados no MS para confirmação da nitração (Figura 26).

Figura 26: Espectro dos peptídeos nitrados para desenvolvimento do anticorpo. Confirmação da nitração dos peptídeos purificados. A) Espectro do peptídeo mononitrado. B) espectro do peptídeo binitrado.

Após confirmação da nitração, os peptídeos foram enviados para empresa GenScript para desenvolvimento do anticorpo monoclonal.

5. Discussão

O presente trabalho teve por objetivo principal identificar uma proteína nitrada como marcador de isquemia do miocárdio. Antes de analisar uma proteína específica, foi analisado se havia um aumento de nitração após o evento isquêmico seguido ou não de reperfusão.

As doenças do sistema cardiovascular, principalmente as SCA, estão fortemente associadas a um desequilíbrio oxidativo, levando ao aumento de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Com isso há aumento na produção de óxido nítrico, superóxido e alteração nas vias de antioxidante, levando a um estresse oxidativo e nitroxidativo (23, 25). Dentre as principais fontes produtoras de superóxido no sistema cardiovascular estão as células musculares lisas, endoteliais e cardiomiócitos (23).

Como consequência desse aumento de espécies reativas tem-se a formação de algumas espécies intermediárias como o peroxinitrito este, dentre outras ações, levará a formação de proteínas nitradas através da adição covalente de um grupo NO_2 no anel fenólico do resíduo de tirosina e triptofano (25, 26).

Existem duas principais vias que envolvem o processo de nitração protéica envolvendo peroxinitrito ou hemoperoxidases. O processo de nitração ocorre em duas etapas: primeiramente é realizada uma reação de oxidação do anel aromático da tirosina para formar o radical tirosil, e em seguida é adicionado o radical NO_2 , para formar a 3NO_2 tirosina (27, 36). A diferença entre as duas reações (peroxinitrito ou hemoperoxidases) se dá na etapa de oxidação, onde é feita a formação do radical tirosil.

A nitração pode alterar a proteína de diversas maneiras: tornando-a resistente à degradação, ativando sistema imune, pode ser inativada ou passar a ter uma nova função. Essas modificações na atividade proteicas podem ter impacto na fisiopatologia do sistema cardiovascular (23, 25).

Dessa maneira, a nitração proteica é uma potencial área de estudos para a busca e desenvolvimento de novos marcadores em doenças cardiovasculares.

Nossos resultados demonstraram aumento de proteínas nitradas pós-isquemia, seguida ou não de reperfusão; tanto no tecido muscular como no soro. Vários trabalhos já haviam relatado aumento de proteínas nitradas em IM tanto no soro como tecido, porém não há relatos na literatura de aumento de proteínas nitradas circulantes após isquemia sem necrose de tecido.

Apesar de estatisticamente diferentes as quantidades de proteínas nitradas circulantes em pacientes com SCA e controles, quando plotados em um histograma foi percebido que, em alguns intervalos de absorbância no teste ELISA, agrupa-se tanto indivíduos com SCA quanto controles. Nesses intervalos não é possível separar um grupo do outro. Essa sobreposição pode ser devido ao fato desses pacientes com SCA serem bastante heterogêneos, de terem seus soros coletados em diferentes momentos após o evento isquêmico, por serem de diferentes idades, apresentarem outras patologias associadas e diferentes níveis de isquemia.

Segundo Radi e colaboradores (23), baixos níveis de proteínas nitradas são normalmente detectados em tecidos saudáveis, reflexo de um estado oxidativo controlado e com isso, baixa produção de agentes nitrantes. Em estados patogênicos, onde se tem um estresse nitroxidativo há um significativo aumento de agentes nitrantes e com isso aumento na detecção de proteínas nitradas.

Shishehbor e colaboradores (37) em um estudo prospectivo mostraram que os níveis de proteínas nitradas no soro de pacientes com DAC é maior que em pacientes controles e que está correlacionado com faixa etária, triglicerídeos e níveis de PCR; porém não se relacionam com os níveis de LDL e HDL desses pacientes.

Apesar de a nitração protéica estar altamente associada às doenças cardiovasculares, essa modificação ocorre em várias outras situações fisiopatológicas que envolvem aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Já foi identificado o aumento de proteínas nitradas em pacientes e modelos animais de diabetes (38-40) acidentes vasculares cerebrais (41, 42), doenças neurodegenerativas (43-49), doenças renais (50, 51) e quaisquer outras doenças associadas à isquemia/reperfusão e processos inflamatórios.

Dessa maneira tanto nossos dados quanto a literatura demonstram que a quantificação de proteínas nitradas totais não é específica para o diagnóstico de isquemia cardíaca.

Na busca de um biomarcador nitrado específico para doenças cardiovasculares é importante que a proteína alvo modificada seja expressa somente ou principalmente no tecido cardíaco.

Uma das proteínas estudadas como um provável marcador nitrado de isquemia foi a troponina I cardíaca. A troponina I cardíaca é uma proteína citoplasmática exclusiva de miócitos cardíacos e é uma das 3 subunidades que formam o complexo protéico de troponinas. Esta subunidade é responsável pela sensibilidade ao cálcio e pela regulação da contração muscular. A troponina I liga-se a actina e inibe a atividade de ATPase da actinmiosina na ausência de cálcio (52).

Em análises de bioinformática foi possível verificar que a troponina I cardíaca era passível de nitração, e através de ensaios de nitração *in vitro* foi possível comprovar que a troponina I cardíaca poderia ser nitrada.

Nossos resultados de imunofluorescência demonstraram que a troponina I cardíaca é nitrada em modelos celulares e modelos de isquemia murinos após o evento isquêmico.

Nossos resultados de imunoprecipitação seguido de western-blot demonstraram que a troponina I cardíaca nitrada é identificada no soro imediatamente após o evento isquêmico mesmo na ausência de necrose cardíaca e permanece nitrada por até 24 horas. Esses resultados foram encontrados tanto em pacientes com isquemia induzida quanto em modelos

animais. A mesma proteína não foi identificada antes do evento isquêmico nos modelos animais e em alguns pacientes.

Em alguns pacientes foi possível identificar a proteína nitrada mesmo antes da indução de isquemia. Os pacientes incluídos tinham indicação para implante de *stent* e por isso, já tinham histórico de SCA. Podem ter sofrido alguma isquemia antes do primeiro ponto de coleta.

A troponina I cardíaca nitrada foi identificada primeiramente por imunofluorescência e depois por teste de imunoprecipitação seguido de western-blot.

Várias proteínas já foram identificadas como nitradas nos diferentes compartimentos do sistema cardiovascular. No plasma, Vadseth e colaboradores (53); e Heffron e colaboradores (33) identificaram a nitração do fibrinogênio em pacientes após SCA. O fibrinogênio nitrado circulante desses indivíduos promove uma coagulação mais rápida do que os não nitrados, porém o coágulo formado apresentava-se frouxo. Também foi encontrado em plasma a plasmina nitrada, associada a indivíduos fumantes com SCA. O peroxinitrito dificulta a conversão de plasminogênio em plasmina (54, 55). Outra proteína detectada foi a Apolipoproteína I (Apo-I) nitrada em pacientes com DAC (35, 56, 57) tanto circulante como em lesões ateroscleróticas. A Apo-I nitrada foi capaz de gerar resposta humoral, sendo detectado nesses pacientes imunoglobulinas contra esta proteína. Foi identificada essa modificação também em Apo-B 100 que constitui o LDL, tanto em soro de pacientes saudáveis como com DAC, porém em maior

quantidade nos que apresentavam DAC. Apo-B nitrada faz com que o enovelamento do LDL seja prejudicado (34, 35, 37, 58).

No músculo cardíaco foi detectada a nitração de MM-CK em pacientes com insuficiência cardíaca, e essa proteína após nitração tornou-se inativa (59-62). A actina também foi detectada como nitrada em cardiomiócitos de camundongos com cardiomiopatia e diabetes (31, 63). Em pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática foi identificada a nitração de SERCA 2, que também foi associada com envelhecimento (64-67).

Essas proteínas nitradas foram associadas como biomarcadores de doenças cardiovasculares, porém nenhuma delas é específica do músculo cardíaco e também são detectadas em situações normais.

Nos modelos animais desse trabalho foram realizadas dosagens de diversos marcadores de isquemia cardíaca.

Nos ratos, como esperado, a concentração de CKMB circulante não foi aumentada em nenhuma das duas situações (isquemia com e sem necrose), uma vez que todos os soros foram coletados com até 60 minutos após o evento isquêmico e dados na literatura relatam o aumento de CKMB após 4 horas do evento isquêmico seguido de necrose (2, 22). Porém foi observado aumento das concentrações de troponina I cardíaca nos animais com isquemia seguida de reperfusão, ao contrário do esperado. Ensaio convencionais de medida de troponina I cardíaca não detectam alterações significantes na concentração dessa proteína na circulação em condições

em que a isquemia acontece por um curto espaço de tempo e seguido de reperfusão, apenas em situações de IM com necrose do tecido, após 6 horas do evento isquêmico (20). A presença do marcador circulante pode ser explicada pela maneira como a isquemia foi realizada. O modelo de indução de isquemia em ratos é realizado com a passagem do fio de algodão ao redor da coronária. Ao passar a agulha com o fio de algodão, têm-se a lesão do músculo cardíaco adjacente e, ao soltar o fio para que ocorra a reperfusão, parte dessas proteínas do músculo lesionado pela agulha passa a ser circulante e então detectável. Logo, a troponina I medida na circulação desses animais pode ser devido à lesão pela agulha, e não pela isquemia do miocárdio.

Nos modelos animais de maior porte, os resultados das medidas de biomarcadores ocorreram conforme descrito na literatura para humanos. Nos casos de isquemia seguida de reperfusão, não houve aumento de nenhum marcador cardíaco na circulação na maioria dos animais, inclusive a troponina T ultrasensível. Nos animais com necrose do miocárdio, houve o aumento esperado de CKMB, troponina e T e troponina T ultrasensível. O aumento de troponina T circulante detectado através de ensaios ultrasensíveis foi observado nas primeiras horas após o IM, demonstrando ser um teste diagnóstico com detecção precoce da lesão. Porém, nos animais com isquemia sem necrose cardíaca não foi possível observar aumento de troponina T através de medidas ultrasensíveis; apenas um

animal apresentou aumento de troponina T através de medida ultrasensível, responsável pelo aumento da média.

Testes de troponinas ultrasensíveis estão sendo ultimamente muito utilizados para diagnóstico precoce de IM, mesmo quando não há elevação de ST (20, 21). O diagnóstico de IM mais rápido pode reduzir complicações através de uma revascularização precoce, cuidados específicos e tratamento. Porém o teste também é positivo para outras doenças cardíacas que não DAC. O teste diagnóstico não é capaz de diagnosticar isquemia do miocárdio sem necrose (21).

Outro ponto ainda não bem definido nos testes de troponinas ultrasensíveis são os valores considerados positivos e os valores considerados saudáveis (68). Por ser um teste muito sensível, ele detecta níveis naturais de morte celular fisiológica. Os níveis podem variar entre os indivíduos. Para um diagnóstico de IS, por exemplo, seria necessária a medida de troponina circulante padrão do indivíduo. Ou seja, este é um teste quantitativo e não qualitativo (68).

Outros marcadores são descritos para diagnóstico de isquemia sem necrose, como a albumina modificada por isquemia. Porém, todos esses marcadores não são específicos para a isquemia sem necrose, elevando-se em diversas situações como isquemias em outros órgãos ou simples excesso de exercício (18).

Nesse sentido, nossos resultados demonstraram serem promissores para o diagnóstico de isquemia cardíaca sem necrose. Com a troponina I cardíaca nitrada foi possível detectar a isquemia cardíaca sem necrose minutos após a ocorrência e por até mais de 24 horas.

Outro resultado positivo foi que o diagnóstico de isquemia cardíaca por troponina I cardíaca nitrada é um teste qualitativo, ou seja, a presença de troponina nitrada é indicativo de isquemia cardíaca, não sendo detectada circulante em condições normais.

Em situações de necrose do miocárdio, a troponina I cardíaca nitrada foi detectada após 3 horas do evento isquêmico. Com esse resultado pode-se observar que em situações de reperfusão há a formação de maiores quantidades de proteínas nitradas e de maneira mais rápida.

Nos modelos suínos de isquemia do miocárdio sem necrose, seguida de reperfusão, imediatamente após o início da reperfusão há a detecção de troponina I cardíaca nitrada. Durante a reperfusão, há a geração de espécies reativas de oxigênio, uma rápida reintrodução de ATP na presença de elevados níveis de Ca^{2+} e indução transitória de permeabilidade mitocondrial levando a formação de superóxido e, por sua vez, peroxinitrito (69).

A isquemia na ausência de reperfusão não tem a geração instantânea de espécies reativas de oxigênio. O coração pode tolerar uma breve exposição à isquemia com mecanismos que preservam os níveis de energia para prevenir uma lesão cardíaca. Isso inclui a troca do metabolismo para

glicólise anaeróbica e utilização de ácido graxo, aumento da captação de glicose, e diminuição da contractilidade. Se a isquemia persistir, o miocárdio pode desenvolver um severo déficit de ATP que resulta em lesão irreversível, geração de espécies reativas de oxigênio e culmina na morte celular (69).

A troponina I cardíaca nitrada mostrou-se um marcador sensível e robusto para isquemia cardíaca sem necrose.

Houve grandes dificuldades para caracterização molecular da troponina I cardíaca nitrada. Primeiramente, a nitração *in vitro* apresentou baixos rendimentos. O peroxinitrito tem meia vida muito rápida em solução, além de ser fortemente oxidante (70). Os peptídeos da troponina I cardíaca nitrada gerados pela digestão com tripsina que contém tirosinas são ou muito pequenos, ou muito grandes, ou com dificuldade de ionização por apresentarem muitos aminoácidos apolares. Fizemos testes com outras enzimas em buscas de melhores peptídeos, porém não obtivemos sucesso.

Ainda não foi possível identificar os sítios de nitração *in vivo*. Em todas as técnicas utilizadas houve limitações devido principalmente à baixa quantidade de troponina I cardíaca nitrada.

Porém, através de imunodeteção foi possível identificar a presença da modificação da troponina I cardíaca e relacionar com isquemia cardíaca e SCA, sugerindo assim um possível novo biomarcador para isquemia cardíaca principalmente na ausência de necrose.

Outras formas de modificações pós traducionais de troponina I cardíaca já foram identificadas e correlacionadas como biomarcadores de eventos patológicos. Aumento da fosforilação de troponina I cardíaca foi observado em animais com insuficiência cardíaca hipertensa (71) e é utilizado como biomarcador de insuficiência cardíaca crônica.(72).

O desenvolvimento e caracterização do biomarcador de isquemia cardíaca foi realizado em modelos de isquemia aguda. Porém sabe-se que as situações mais recorrentes de SCA são pacientes em estado crônico. Para uma melhor definição e aplicabilidade do marcador, é necessário o desenvolvimento de métodos quantitativos. Dessa maneira será possível definir os valores de referência para cada situação clínica.

6. Conclusão

6.1. Conclusões Sumarizadas

I- Foi identificado e quantificado o aumento da nitração total no tecido cardíaco e no soro de modelo murino e porcino após isquemia miocárdica com e sem necrose; a nitração das proteínas do soro mostrou-se crescente com o aumento de intervalo de tempo após a isquemia;

II- Paciente com SCA apresentaram nitração nas proteínas totais circulantes significativamente maiores que indivíduos controles;

III- Foi identificado troponina I cardíaca nitrada em modelo de isquemia celular *in vitro* e tecido cardíaco murino de isquemia miocárdica;

IV- Foi possível detectar a troponina I cardíaca nitrada em soro de modelos animais e pacientes com isquemia do miocárdio;

V- Através da caracterização molecular da troponina I cardíaca nitrada foi possível identificar que esta proteína realmente é passível de nitração e identificar seus sítios;

VI- Foi selecionado e nitrado o peptídeo para desenvolvimento de anticorpo para troponina I cardíaca nitrada.

6.2. Perspectivas

Está sendo caracterizado o sítio de nitração *in vivo* da troponina I cardíaca nitrada através de espectrometria de massas. Devido às baixas concentrações de proteínas e aos peptídeos pouco ionizáveis, ainda não foi possível identificar *in vivo* quais os sítios nitrados.

Está sendo padronizada a quantificação de troponina I cardíaca nitrada através de MS.

O anticorpo já foi desenvolvido e está em fase de expansão para padronização de um teste ELISA para quantificação de troponina I cardíaca nitrada.

6.3. Conclusão

O presente trabalho foi capaz de identificar uma nova proteína nitrada em resposta à isquemia cardíaca e que pode ser um alvo potencialmente utilizado no diagnóstico sensível e prognóstico de isquemia cardíaca com ou sem necrose.

7. Anexos

Anexo A

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 30/01/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0754/07**, intitulado: "**IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS PROTÉICOS COM POTENCIAL DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO EM DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA**" apresentado pelo Departamento de **Comissão Científica do Incor**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**

CAPPesq, 12 de Fevereiro de 2008

Reina
COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
14 / 02 / 2008

Eduardo Massad

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403
010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br /
secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo B

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0754/07

Título: "Identificação De Alvos Protéicos Com Potencial Diagnóstico E Prognóstico Em Doença Arterial Coronária"

Pesquisador Responsável: José Eduardo Krieger

Pesquisador Executante: Carlos Alexandre Segre

Departamento: Cardiopneumologia

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** na data de 03/11/11, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 05/08/11:**

- **Relatório parcial;**
- **Prorrogação da data de termino previsto de julho de 2009 para julho de 2014;**
- **Substituição de pesquisador executante de Carlos Alexandre Segre para Gabriela Venturini da Silva que utilizará como vinculação acadêmica no programa de mestrado.**

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 03 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
08/11/2011
Debora

Anexo C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO:..... CIDADE.....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☒ F ☒
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO:..... CIDADE:.....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Identificação de alvos protéicos com potencial diagnóstico e prognóstico em doença arterial coronária

PESQUISADOR: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

CARGO/FUNÇÃO: . Diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP:Instituto do Coração – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

☒	SEM RISCO	☒	RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO
	RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☒	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;
3. desconfortos e riscos esperados;
4. benefícios que poderão ser obtidos;
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Avaliar o perfil de proteínas e marcadores no sangue após procedimento de angioplastia. A forma como é feito o procedimento de angioplastia não sofrerá nenhuma alteração, a única diferença será a coleta de sangue: antes do procedimento, imediatamente depois, 2, 6 e 72 hs após. A pesquisa visa encontrar variações nos níveis das diversas proteínas no sangue, após angioplastia. O objetivo é desenvolver medicações e novos tipos de tratamento a partir desta análise. Não serão testadas novas medicações nem novas maneiras de realizar angioplastia. Além da análise das proteínas no sangue através da técnica de proteômica, serão colhidos exames de glicemia (nível de açúcar no sangue), função renal, Troponina, CKMB, BNP e albumina marcada por isquemia, estes exames são habitualmente colhidos após angioplastia para descartar disfunção renal e infarto do miocárdio. O paciente poderá ter acesso aos resultados dos exames colhidos a qualquer momento.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. José Eduardo Krieger InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 AB – 3069.5579

Dr. Alexandre da Costa Pereira Idem

Dr. Carlos Alexandre Segre Idem

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO (Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

8. Referências bibliográficas

1. Vargas-Alarcon G, Fragoso JM, Delgadillo H. [Acute coronary syndrome. Physiopathology and genetics]. *Rev Invest Clin*. 2011 Jan-Feb;63(1):64-74.
2. Moe KT, Wong P. Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Acad Med Singapore*. 2010 Mar;39(3):210-5.
3. Saúde Md. Sistema de informações de mortalidade. *Datasus*; 2009.
4. Teich V, Araujo DV. Estimativa de Custo da Síndrome Coronariana Aguda no Brasil. *Revista Brasileira de Cardiologia*. 2011;24(2):85-94.
5. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, et al. Management of acute coronary syndromes: acute coronary syndromes without persistent ST segment elevation; recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2000 Sep;21(17):1406-32.
6. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol*. 2002 Oct 2;40(7):1366-74.
7. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical

- markers in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2007 Apr 3;115(13):e356-75.
8. Buja LM, Entman ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation*. 1998 Oct 6;98(14):1355-7.
9. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998 Jun 15;82(11):1111-29.
10. Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc*. 2009 Oct;84(10):917-38.
11. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):310-8.
12. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992 Jan 23;326(4):242-50.
13. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Oct;17(10):1859-67.
14. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009 Jan 27;119(3):e21-181.
15. McCaig LF, Burt CW. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2002 emergency department summary. *Adv Data*. 2004 Mar 18(340):1-34.

16. Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, Woolard RH, Feldman JA, Beshansky JR, et al. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *N Engl J Med*. 2000 Apr 20;342(16):1163-70.
17. Singh V, Martinezclark P, Pascual M, Shaw ES, O'Neill WW. Cardiac biomarkers - the old and the new: a review. *Coron Artery Dis*. 2010 Jun;21(4):244-56.
18. Eggers KM, Jaffe AS, Lind L, Venge P, Lindahl B. Value of cardiac troponin I cutoff concentrations below the 99th percentile for clinical decision-making. *Clin Chem*. 2009 Jan;55(1):85-92.
19. Hochholzer W, Reichlin T, Twerenbold R, Stelzig C, Hochholzer K, Meissner J, et al. Incremental Value of High-Sensitivity Cardiac Troponin T for Risk Prediction in Patients with Suspected Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem*. 2011 Jul 19.
20. Masson S, Latini R, Anand IS. An update on cardiac troponins as circulating biomarkers in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2010 Mar;7(1):15-21.
21. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med*. 2009 Aug 27;361(9):858-67.
22. Parikh SV, de Lemos JA. Biomarkers in cardiovascular disease: integrating pathophysiology into clinical practice. *Am J Med Sci*. 2006 Oct;332(4):186-97.
23. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res*. 2007 Jul 15;75(2):291-302.

24. Levrand S, Vannay-Bouchiche C, Pesse B, Pacher P, Feihl F, Waeber B, et al. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2006 Sep 15;41(6):886-95.
25. Abello N, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res*. 2009 Jul;8(7):3222-38.
26. Ischiropoulos H. Protein tyrosine nitration--an update. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Apr 15;484(2):117-21.
27. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4003-8.
28. Aslan M. Functional consequences of actin nitration: in vitro and in disease states. *Amino Acids*. 2010 May 18.
29. Vaz SM, Prado FM, Di Mascio P, Augusto O. Oxidation and nitration of ribonuclease and lysozyme by peroxynitrite and myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Apr 15;484(2):127-33.
30. Aslan M, Dogan S. Proteomic detection of nitroproteins as potential biomarkers for cardiovascular disease. *J Proteomics*. 2011 May 27.
31. Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res*. 2005 Aug 1;67(2):225-33.
32. Gole MD, Souza JM, Choi I, Hertkorn C, Malcolm S, Foust RF, 3rd, et al. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 May;278(5):L961-7.

33. Heffron SP, Parastatidis I, Cuchel M, Wolfe ML, Tadesse MG, Mohler ER, 3rd, et al. Inflammation induces fibrinogen nitration in experimental human endotoxemia. *Free Radic Biol Med*. 2009 Oct 15;47(8):1140-6.
34. Parastatidis I, Thomson L, Burke A, Chernysh I, Nagaswami C, Visser J, et al. Fibrinogen beta-chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):33846-53.
35. Parastatidis I, Thomson L, Fries DM, Moore RE, Tohyama J, Fu X, et al. Increased protein nitration burden in the atherosclerotic lesions and plasma of apolipoprotein A-I deficient mice. *Circ Res*. 2007 Aug 17;101(4):368-76.
36. Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, et al. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids*. 2007;32(4):501-15.
37. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA*. 2003 Apr 2;289(13):1675-80.
38. Turko IV, Li L, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):33972-7.
39. Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Beisswenger PJ, Thornalley PJ. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Aug;48(8):1590-603.

40. Zhao Y, Lu N, Zhang Y, Gao Z. High glucose induced rat aorta vascular smooth muscle cell oxidative injury: involvement of protein tyrosine nitration. *J Physiol Biochem*. 2011 May 28.
41. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol*. 2005 Jun;76(2):126-52.
42. Isobe C, Abe T, Terayama Y. Remarkable increase in 3-nitrotyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with lacunar stroke. *Brain Res*. 2009 Dec 11;1305:132-6.
43. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*. 2003 Jun;85(6):1394-401.
44. Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield DA. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jul 1;45(1):81-5.
45. Choi DY, Zhang J, Bing G. Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging*. 2010 Sep;31(9):1649-53.
46. Crow JP, Ye YZ, Strong M, Kirk M, Barnes S, Beckman JS. Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *J Neurochem*. 1997 Nov;69(5):1945-53.

47. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*. 1998 Feb 10;37(6):1613-22.
48. Blanchard-Fillion B, Souza JM, Friel T, Jiang GC, Vrana K, Sharov V, et al. Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):46017-23.
49. Lee JR, Kim JK, Lee SJ, Kim KP. Role of protein tyrosine nitration in neurodegenerative diseases and atherosclerosis. *Arch Pharm Res*. 2009 Aug;32(8):1109-18.
50. Tyther R, McDonagh B, Sheehan D. Proteomics in investigation of protein nitration in kidney disease: technical challenges and perspectives from the spontaneously hypertensive rat. *Mass Spectrom Rev*. 2011 Jan-Feb;30(1):121-41.
51. Piroddi M, Palmese A, Pilolli F, Amoresano A, Pucci P, Ronco C, et al. Plasma nitroproteome of kidney disease patients. *Amino Acids*. 2011 Feb;40(2):653-67.
52. Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJ. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics*. 1996 Jul 1;35(1):11-23.
53. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, et al. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004 Mar 5;279(10):8820-6.

54. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):778-84.
55. Nowak P, Kolodziejczyk J, Wachowicz B. Peroxynitrite and fibrinolytic system: the effect of peroxynitrite on plasmin activity. *Mol Cell Biochem.* 2004 Dec;267(1-2):141-6.
56. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004 Aug;114(4):529-41.
57. Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, et al. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42977-83.
58. Zweier JL, Fertmann J, Wei G. Nitric oxide and peroxynitrite in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal.* 2001 Feb;3(1):11-22.
59. Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Sep 25;1102(2):119-66.
60. Ventura-Clapier R, Veksler V, Hoerter JA. Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Mol Cell Biochem.* 1994 Apr-May;133-134:125-44.
61. Mihm MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA. Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc Res.* 2001 Mar;49(4):798-807.

62. Stachowiak O, Dolder M, Wallimann T, Richter C. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16694-9.
63. Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure: roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport. *Circ Res*. 2003 Sep 19;93(6):487-90.
64. Viner RI, Ferrington DA, Williams TD, Bigelow DJ, Schoneich C. Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in skeletal muscle. *Biochem J*. 1999 Jun 15;340 (Pt 3):657-69.
65. Adachi T, Matsui R, Xu S, Kirber M, Lazar HL, Sharov VS, et al. Antioxidant improves smooth muscle sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function and lowers tyrosine nitration in hypercholesterolemia and improves nitric oxide-induced relaxation. *Circ Res*. 2002 May 31;90(10):1114-21.
66. Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, et al. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in human heart failure. *Circulation*. 2005 Mar 1;111(8):988-95.
67. Knyushko TV, Sharov VS, Williams TD, Schoneich C, Bigelow DJ. 3-Nitrotyrosine modification of SERCA2a in the aging heart: a distinct signature of the cellular redox environment. *Biochemistry*. 2005 Oct 4;44(39):13071-81.
68. Twerenbold R, Reichlin T, Reiter M, Muller C. High-sensitive cardiac troponin: friend or foe? *Swiss Med Wkly*. 2011;141:w13202.

69. Budas GR, Churchill EN, Mochly-Rosen D. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 2007 Jun;55(6):523-36.
70. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424.
71. Dong X, Sumandea CA, Chen YC, Garcia-Cazarin ML, Zhang J, Balke CW, et al. Augmented phosphorylation of cardiac troponin I in hypertensive heart failure. *J Biol Chem.* 2012 Jan 6;287(2):848-57.
72. Zhang J, Guy MJ, Norman HS, Chen YC, Xu Q, Dong X, et al. Top-down quantitative proteomics identified phosphorylation of cardiac troponin I as a candidate biomarker for chronic heart failure. *J Proteome Res.* 2011 Sep 2;10(9):4054-65.