



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL



VALÉRIA BEATRIZ DO VALLE

**Análise dos substratos da MMP-2 em tecidos cardíacos usando a proteômica
quantitativa N-terminal multiplex**



Ribeirão Preto

2022

VALÉRIA BEATRIZ DO VALLE

Análise dos substratos da MMP-2 em tecidos cardíacos usando a proteômica quantitativa N-terminal multiplex

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Ribeirão Preto

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Valle, Valéria Beatriz do

Análise dos substratos da MMP-2 em tecidos cardíacos usando a proteômica quantitativa N-terminal multiplex. Ribeirão Preto, 2022.

91 p.: il.; 30 cm

Tese (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP.

Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Gerlach, Raquel Fernanda.

Versão Original

1. Metaloproteinase da Matriz 2 (MMP-2).
2. Doenças cardiovasculares.
3. Proteômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Valéria Beatriz do Valle

Título: Análise dos substratos da MMP-2 em tecidos cardíacos usando a proteômica quantitativa N-terminal multiplex

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha maravilhosa família que ajudou o impossível, tornar-se possível, sempre torcendo pelo meu sucesso, me dando força e suporte necessário para que tudo desse certo!

Agradecimientos

Agradeço,

A Deus e aos anjos da guarda por estarem sempre comigo ao longo dessa caminhada e cuidarem de mim.

Aos meus pais, Alberto S. L. do Valle (*in memoriam*) e Danielle S. do Valle, ao meu irmão Luís Alberto do Valle, aos meus familiares, em especial minha prima Loraine, e ao meu namorado, Augusto, por toda força, incentivo e pensamentos positivos para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Professora Doutora Raquel Fernanda Gerlach, pela orientação, ensinamentos e acolhimento.

À auxiliar técnica do Laboratório, Patrícia Adriana Basile, pelos treinamentos e por estar sempre disposta a ajudar nas práticas laboratoriais.

À secretária Imaculada Jainara Miguel pelo auxílio com todas as dúvidas e demais assuntos sobre o funcionamento dos procedimentos administrativos da pós-graduação.

Ao Professor Doutor Carlos Sorgi, pela atenção, por acreditar no meu potencial e pela experiência de trabalho que também tive em seu laboratório.

Aos meus amigos, Robson, Diana, Pedro Vieira, Adriana, Pedro Nobre, Amanda, Maria Eduarda, Marcelle, Iasmim, Fernanda, pela amizade e bons momentos compartilhados.

Aos colegas e às colegas da Pós-Graduação, Natália, Jonas, Carol, Luan, Veridiana e Gustavo, pelo convívio e ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

À equipe multidisciplinar envolvida neste trabalho e às instituições externas envolvidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Epígrafe

*“Lembre-se que as pessoas podem
tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”*

Albert Einstein

Resumo

VALLE, V. B. **Análise dos substratos da MMP-2 em tecidos cardíacos usando a proteômica quantitativa N-terminal multiplex**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Resumo

As metaloproteinases da matriz (MMPs) pertencem à família das endopeptidases e são dependentes de zinco e cálcio. Elas são proteases que degradam proteínas da matriz extracelular (MEC), como laminina, elastina, colágeno e proteoglicanos. As MMPs estão envolvidas em várias funções e vários processos patológicos devido à grande variedade de seus substratos. Entre os processos em que estão envolvidas estão: destruição e remodelação de tecidos, cicatrização, inflamação e progressão tumoral. Saber e controlar a atividade enzimática é altamente desejável para que possamos compreender e estudar seus papéis individuais e propor novos agentes terapêuticos. Neste trabalho procuramos identificar os substratos da metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2) no coração, para tentar compreender o seu papel proteolítico e seus produtos de clivagens. Isso foi feito com o uso de análise de peptídeos representados diferentemente no coração de animais (ratos) que receberam a MMP-2 recombinante humana (rhMMP-2) por 4 semanas. Essa análise envolveu a análise proteômica, seguindo-se a busca dos resultados em bancos de dados de vias de cascatas de proteínas. Os resultados revelaram que os principais conjuntos de proteínas que se modificaram nos animais que receberam a rhMMP-2 em relação aos animais controles foram enzimas de vias metabólicas do coração, sendo as 3 principais: CAC, TCA e KEGG. Os resultados também mostram não ter havido diferença na quantidade de peptídeos que compõe a maior parte das proteínas estruturais do coração, sugerindo que os resultados de alteração funcional vistos nos corações destes animais estejam mais associados a alterações metabólicas do que a alterações de filamentos proteicos envolvidos nos batimentos cardíacos ou nas junções celulares. Este é o primeiro estudo, ao que sabemos, que mostra a expressão diferencial de proteínas de vias metabólicas em corações expostos a MMP-2 exógena.

Palavras-chave: metaloproteinase; doenças cardiovasculares; proteômica

Abstract

VALLE, V. B. **Analysis of MMP-2 substrates in cardiac tissues using quantitative N-terminal multiplex proteomics.** 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to the endopeptidase family and are dependent on zinc and calcium. They are proteases that degrade extracellular matrix (ECM) proteins such as laminin, elastin, collagen, and proteoglycans. As MMPs are involved in various functions and various pathological processes due to the wide variety of their substrates. Among the processes in which they are involved are: tissue destruction and remodeling, wound healing, inflammation and tumor progression. Knowing and controlling enzymatic activity is highly desirable so that we can understand and study their individual roles and propose new therapeutic agents. In this work, we tried to identify substrates of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in the heart, in order to try to understand its proteolytic role and its cleavage products. This was done using differently represented peptide analysis in the hearts of animals (rats) that received recombinant human MMP-2 (rhMMP-2) for 4 weeks. This analysis involved proteomics analysis, followed by searching the protein cascade pathway databases for results. The results revealed that the main sets of proteins that were modified in the animals that received rhMMP-2 in relation to the control animals were enzymes of the heart's metabolic pathways, the 3 main ones being: CAC, TCA and KEGG. The results also show that there was no difference in the number of peptides that make up most of the heart's structural proteins, suggesting that the functional alteration results seen in the hearts of these animals are more associated with metabolic alterations than with alterations in the protein filaments involved in the processes. heartbeat or cell junctions. This is the first study, to our knowledge, that shows the differential expression of metabolic pathway proteins in hearts exposed to exogenous MMP-2.

Keywords: metalloproteinase; cardiovascular diseases; proteomics.

Sumário

SUMÁRIO

1.....	Introdução.....	20
1.1.....	Metaloproteinases da matriz.....	20
1.2.....	MMPs e doenças cardiovasculares.....	22
1.3.....	MMPs e doença periodontal.....	24
1.4.....	Inibidores das metaloproteinases da matriz.....	26
1.5.....	Metodologia para detecção de proteínas.....	26
1.6.....	Proteômica.....	27
1.7.....	Metodologias na proteômica.....	28
1.8.....	Fracionamento e identificação de proteínas.....	29
1.8.1.....	Eletroforese - uni e bidimensional.....	30
1.8.2.....	Cromatografia.....	32
1.8.3.....	Espectrometria de massas.....	32
1.9.....	Métodos de ionização.....	32
1.9.1.....	MALDI.....	32
1.9.2.....	ESI.....	33
1.10.....	Análise e banco de dados para o estudo de proteínas.....	33
1.10.1....	Métodos quantitativos.....	33
1.10.1.1.	ICAT.....	33
1.10.1.2.	ITRAQ.....	33
1.10.1.3.	SILAC.....	34
1.10.2....	Softwares e banco de dados.....	34
1.11.....	Degradômica.....	34
1.12.....	Metodologias na degradômica.....	34
1.12.1....	Fluxos de trabalho de enriquecimento negativo.....	35
1.12.1.1.	COFRADIC.....	35
1.12.1.2.	TAILS.....	35
1.12.2....	Fluxo de trabalho de enriquecimento positivo.....	37
2.....	Proposição.....	39
3.....	Materiais e Métodos.....	41
3.1.....	Aspectos éticos.....	41
3.2.....	Grupo amostral.....	42
3.3.....	Preparação das amostras para análise do N-terminal pela técnica de TAILS.....	42
3.4.....	Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida.....	43
3.5.....	Processamento dos dados proteômicos.....	44
3.6.....	Análise da anotação N-terminal e análise de enriquecimento.....	44
4.....	Resultados.....	47
5.....	Discussão.....	54
6.....	Conclusão.....	59
	Bibliografia.....	61
	Anexos.....	66
	Apêndices.....	92

Lista de Quadros

Quadro 1.	Candidatos a substrato modulados após tratamento com MMP-2 usando a estratégia de corte.....	69
Quadro 2.	Candidatos a substrato modulados após tratamento com MMP-2 usando a estratégia estatística.....	81
Quadro 3.	Os 10 principais processos biológicos GO e vias KEGG enriquecidas para os candidatos a substrato listados no Quadro 2.....	86

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura das classes de MMPs e seus subtipos.....	21
Figura 2.	Fluxo de trabalho iTRAQ-TAILS.....	37
Figura 3.	Representação esquemática do estudo.....	45
Figura 4.	Número total de peptídeos quantificados e compartilhados entre os grupos controle e MMP-2.....	49
Figura 5.a.	Distribuição de N-terminais (N-terminal Natural e Neo N-terminal) considerando todas as amostras.....	49
Figura 5.b.	Fração N-terminais das amostras agrupadas no grupo controle e grupo tratado com MMP-2.....	50
Figura 6.	Distribuição das razões Log ₂ (MMP-2/Controle) dos Neo N-terminais e N-terminais naturais quantificados pela análise TAILS. O valor de 3 desvios padrão (linhas tracejadas) foi usado para definir os eventos proteolíticos que foram aumentados (Log ₂ (MMP-2/Controle) ≥ 2,88) ou diminuídos (Log ₂ (MMP-2/Controle) ≤ -2,98) em corações murinos após o tratamento com MMP-2.....	50
Figura 7.a.	Clivagem de protease Neo N-terminal quantificado.....	50
Figura 7.b.	Significância estatística do enriquecimento da protease de acordo com os dados TopFIND.....	50
Figura 8.	Processos biológicos GO.....	51
Figura 9.	Via KEGG.....	51
Figura 10.	Intensidades médias de Log ₂ de Neo N-terminal que aumentaram ou diminuíram em corações murinos após o tratamento com MMP-2, considerando teste <i>t</i> de <i>Student</i> (<i>p</i> <0,05) ou peptídeos detectados exclusivamente em um grupo.....	52
Figura 11.	<i>Heatmap</i> ilustrando a ocorrência relativa (%) de cada resíduo de aminoácido encontrado por TAILS no grupo MMP-2.....	52

Introdução

1 Introdução

1.1 Metaloproteinases da matriz

Historicamente, o estudo das metaloproteinases da matriz (MMPs) se iniciou na década de 60, quando Gross e Lapière descobriram uma enzima que foi capaz de degradar a tripla hélice do colágeno tipo I na reabsorção da cauda do girino.

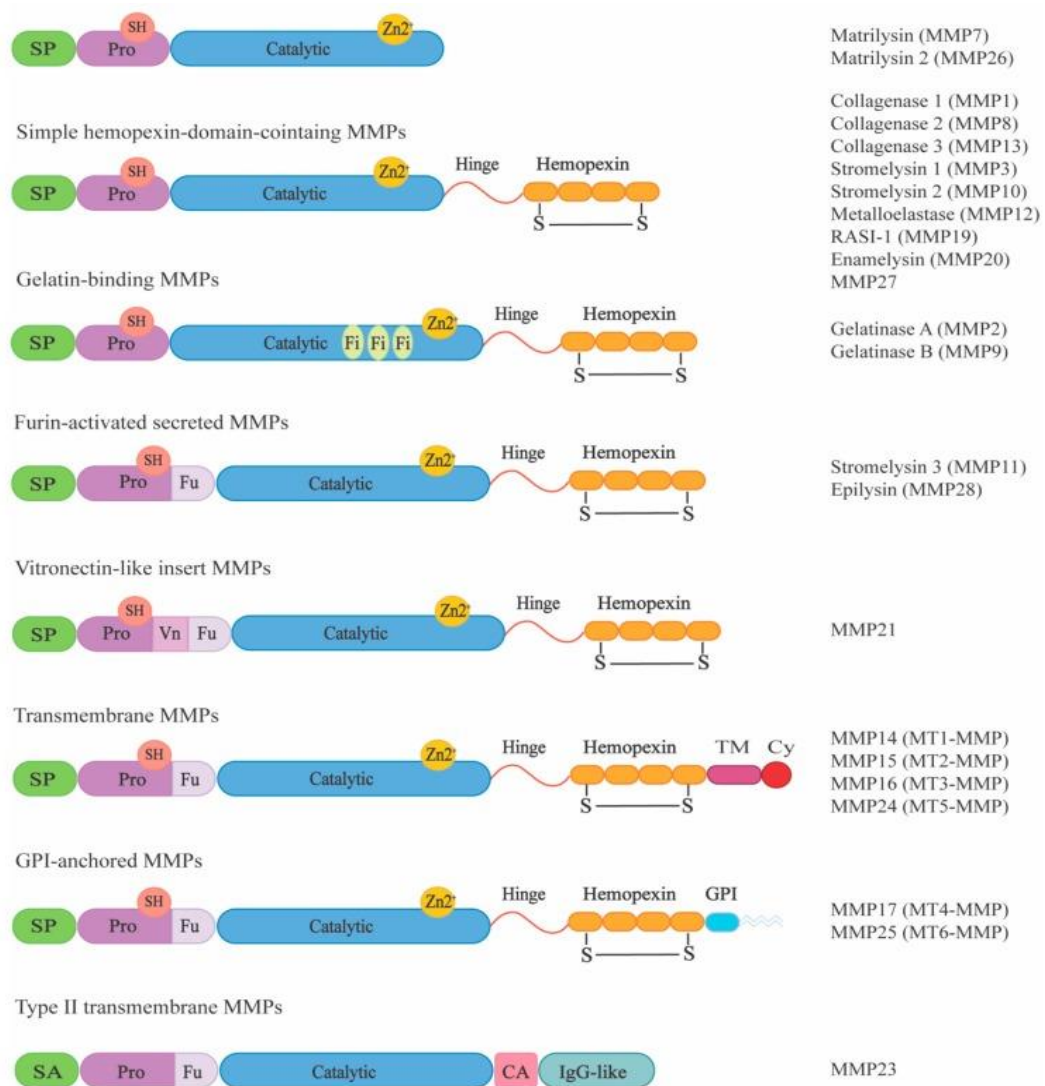
As MMPs são enzimas dependentes de zinco, da família de endopeptidases, responsáveis pela degradação e remodelamento dos componentes da matriz extracelular (MEC). Existem mais de 20 MMPs descritas na literatura e todas elas são secretadas como proenzimas e necessitam de cálcio e zinco para realizar a sua função, por isso, também são enzimas dependentes de metal (Nagase et al., 2006). Devido às suas conformações estruturais, as MMPs são classificadas como colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinases tipo de membrana e um último grupo no qual as demais não se enquadram (Liu e Khalil, 2017). Além disso, há aquelas que são classificadas pelo seu substrato específico e sua estrutura. Já a sua expressão pode ser regulada por meio de quatro vias, tais como: por ativação de precursores, por diferenças de especificidade de substrato, por regulação na transcrição nos genes e por inibidores de MMPs (Murphy & Nagase, 2011).

Todas as MMPs são constituídas pela seguinte sequência: peptídeo sinal (SP), pró-domínio (Pro), domínio catalítico (*Catalytic*), alça de ligação (*Hinge*) e domínio hemopexina (*Hemopexin*). O peptídeo sinal, também conhecido como pré-domínio ou sequência de sinalização N-terminal, direciona as cadeias polipeptídicas para a via secretora. A parte do pró-domínio ou pró-peptídeo proporciona a latência das enzimas, pois tem uma região com uma sequência PRCGXPD que permite esta condição e contém um grupo tiol (SH) (Maskos e Bode, 2003; Madzharova et. al., 2019; Laronha e Caldeira, 2020). A alça de ligação, nada mais é que um peptídeo ligante de sequência variável. Já no domínio catalítico há uma ligação ao zinco (Zn^{2+}) e sequência HEXXHXXGXXH. Este domínio conecta-se por meio da alça de ligação ao domínio hemopexina. O domínio hemopexina possui uma ligação dissulfeto (SS). Algumas MMPs apresentam exceções em relação a esta estrutura, sendo que: as gelatinases possuem três repetições de fibronectina (Fi) tipo II em seu domínio catalítico, as MMPs ativadas por furina possuem um sítio de reconhecimento de furina

(Fu) em seu pró-peptídeo no terminal C, as matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) não possuem região de alça de ligação, nem domínio hemopexina, a MMP-21 tem ainda no pró-domínio uma inserção semelhante à vitronectina (Vn).

As MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) normalmente possuem um domínio transmembrana (TM) e um domínio citosólico (Cy). A MMP-17 e MMP-25 têm uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A MMP-23 possui uma âncora de sinal N-terminal (SA), um domínio de matriz de cisteína (CA) com sequência ALCLLPA e um domínio rico em prolina semelhante à imunoglobulina (IgG-like), conforme a **Figura 1** (Nagase, Visse e Murphy, 2006; Madzharova et. al., 2019).

Figura 1– Estrutura das classes de MMPs e seus subtipos.



Fonte: Madzharova et al., 2019.

As MMPs regulam processos biológicos importantes, como a angiogênese, morfogênese, embriogênese e a remodelação vascular, e também podem estar associadas a distúrbios cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão e pré-eclâmpsia (Wang & Khalil, 2017). Além disso, elas afetam moléculas bioativas na superfície celular e modulam várias vias celulares e de sinalização. Durante a gravidez e processo de cicatrização de feridas há alteração na expressão e atividade das MMPs como um processo biológico natural, no entanto, tem se observado essas alterações em doenças bucais e sistêmicas, como na periodontite e doenças cardiovasculares. Um dos fatores é que, uma vez ativadas, as metaloproteinases da matriz clivam substratos como proteínas de matriz, mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento, ativando diversas vias de sinalização dependentes de MAP quinases, importantes em processos, como a manutenção do tônus vascular, hipertrofia cardíaca e resposta à lesão. Atualmente, sabemos que a ativação das MMPs ocorre via PKC, produção de oxidantes e outras MMPs. No entanto, ainda é necessário conhecer a ativação específica de cada MMP (Nagase et al., 2006).

Nos últimos anos, a atividade e síntese das MMPs têm sido associada aos diferentes componentes da síndrome metabólica, além da hipertensão, a dislipidemia, hiperglicemia, recentemente na fisiologia pulmonar em manifestações da COVID-19, estado pró-inflamatório e pró-oxidante. Dentre as MMPs, as collagenases (MMP-1 e MMP-8) e gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) são as mais associadas a estas doenças, sendo responsáveis por digerir gelatina e desnaturar colágeno IV, elastina e fibronectina (Wang & Khalil, 2017), entre outros substratos ainda não caracterizados completamente. Várias doenças crônicas, por exemplo, diferentes doenças cardiovasculares como hipertensão (Morillas et al, 2013) e aterosclerose (Bäck et al., 2010), doença periodontal (Marcaccini et al., 2010) e obesidade (Belo et al., 2010), entre muitas outras, caracterizam-se por aumento de MMPs circulantes.

Sendo assim, ao conhecer seus substratos e produtos de clivagem, as MMPs podem servir como biomarcadores e alvos terapêuticos para determinadas doenças.

1.2 MMPs e doenças cardiovasculares

Nas últimas décadas, a gelatinase A, também conhecida como MMP-2 (72kDa), tem sido associada a doenças cardiovasculares, como hipertensão, pré-eclâmpsia, aterosclerose e insuficiência cardíaca, pois pesquisadores observaram que quando seu nível de expressão está elevado, esta acaba contribuindo para a

progressão das doenças cardiovasculares. Sabemos que a MMP-2 também está localizada no interior de cardiomiócitos, tendo alvos proteolíticos nestas células e elas podem ser ativadas em questões de segundos pelo peroxinitrito (Hughes et al., 2014; Hughes e Schulz, 2014).

David Lovett e colaboradores demonstraram que a expressão de MMP-2 ativa no coração por transgenia leva à perda da função contrátil de cardiomiócitos (Wang et al., 2006) e à importante remodelamento ventricular e disfunção sistólica (Bergman et al., 2007). Além disso, a expressão de MMP-2 no coração levou à degeneração valvular (Mahimkar et al., 2009). A MMP-2 já é atualmente aceita como uma protease cujo aumento isolado no coração leva ao prejuízo da função cardíaca nos animais transgênicos que vivem por mais tempo (Dahi et al., 2011).

O papel fundamental destas metaloproteases na função cardíaca deve estar relacionada, ao menos em parte, com a clivagem e liberação (*shedding*) de substratos necessários para ativar genes durante o desenvolvimento embrionário via ativação de quinases da família MAP (Xu et al., 2010). Este mecanismo de sinalização está relacionado a diversos processos, que incluem o tônus de cardiomiócitos e músculo liso, além de regulação de hipertrofia cardíaca e remodelamento vascular (Hao et al., 2006; Castro et al., 2010).

O grupo de estudo de doenças cardiovasculares e MMPs do qual a Profa. Dra. Raquel Gerlach (USP/RP) faz parte, por meio de trabalhos publicados em 2008, 2010 e 2011, demonstrou que a MMP-2 aumenta na aorta torácica de ratos hipertensos renais e por meio da inibição seletiva de MMP com doxiciclina foi possível diminuir a pressão arterial e proporcionar o remodelamento vascular (Castro et al., 2008; Castro et al., 2010; Rizzi et al., 2010; Guimaraes et al., 2011). O mesmo efeito da doxiciclina foi observado em modelo experimental de hipertensão arterial em ratos (Rizzi et al., 2009), similar aos efeitos de tratamento com drogas anti-hipertensivas ou antioxidantes (Ceron et al., 2010; Marcal et al., 2011; Martinez et al., 2008).

A presença de MMP-2 aumentada no coração (por modelo de transgenia) leva a áreas de infarto maiores e a uma diminuição no funcionamento contrátil nos corações dos animais quando estes corações são submetidos a isquemia/reperfusão (Zhou et al., 2007). Também já foi demonstrado que há uma melhora na lesão do ventrículo esquerdo induzida por um aumento de pós-carga cardíaca em camundongos nocaute para MMP-2 (Matsusaka et al., 2006). Já camundongos nocaute para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e para a MMP-2 (MMP-2^{-/-}) apresentaram

uma diminuição da placa aterosclerótica e arco aórtico e ainda uma diminuição da camada muscular lisa (Kuzuya et al., 2006).

Olejarz, Lacheta e Kubiak-Tomaszewska (2020) confirmaram o papel das MMPs no desenvolvimento da placa e patogênese da aterosclerose em sua revisão. Ademais, mostraram que o aumento das MMP-2 e MMP-9 no sangue periférico na síndrome coronariana aguda pode ser uma forma de detecção de vulnerabilidade da placa, sendo uma maneira de prever casos severos de eventos cardiovasculares ateroscleróticos. Segundo o *Global Burden of Disease* (2017), entre 2007 e 2017, a mortalidade por aneurisma da aorta aumentou 23,7%.

Além disso, níveis baixos de atividade de MMPs também não são bons para nosso organismo, pois aumenta a biodisponibilidade de citocinas pró-inflamatórias que geralmente são clivadas e inativadas pela MMP-2, levando à produção de citocinas e à secreção da fosfolipase A2 na circulação e estimulando a inflamação sistêmica comprometendo o metabolismo lipídico em órgãos-alvo (Hardy, Hardy-Sosa e Fernandez-Patron, 2018).

D Avila-Mesquita e colaboradores (2021) buscaram caracterizar níveis plasmáticos das MMP-2 e MMP-9 em pacientes com COVID-19 grave e investigaram esta associação em resultados clínicos e mortalidade. Eles mostraram que os pacientes que eram hipertensos e estavam com COVID-19 apresentaram níveis mais altos de MMP-2 em relação ao grupo não hipertenso com COVID-19 e controle.

Diante destas evidências, compreendemos que o aumento da expressão de MMPs podem aumentar a progressão de doenças cardíacas, no entanto, ainda não se sabe exatamente a cascata proteolítica envolvida neste processo, necessitando que haja continuidade destes estudos.

1.3 MMPs e doença periodontal

A doença periodontal (DP) é caracterizada como uma inflamação de origem bacteriana que acomete os tecidos de suporte e proteção do elemento dentário (Steffans & Marcantonio, 2018). Normalmente, esse processo inflamatório envolve uma interação complexa entre bactérias periodontopatogênicas e a resposta inflamatória do hospedeiro, ativando várias vias moleculares, compostas por mediadores pró-inflamatórios, como fatores de crescimento, citocinas, MMPs e seus inibidores e reguladores. Ela costuma ser uma doença silenciosa, geralmente sem causar dor, sendo observada pelo paciente no estágio mais avançado da doença.

Possui algumas espécies bacterianas de prevalência, tais como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium ssp.* e espécies de *Selenomonas* (Kamma et al, 2004; Faveri et al, 2008).

A DP é uma das doenças que mais afetam a população brasileira e mundial. De acordo com a Pesquisa SB Brasil (2010) 5,8% da população brasileira apresenta casos graves de doença periodontal e cerca de 15,3% de casos moderados a graves da doença. Segundo Nazir (2017) as doenças periodontais afetam cerca de 20 a 50% da população mundial e, quando associadas a doenças cardiovasculares, ocorre um aumento de 19% no risco das doenças periodontais, e este aumento pode chegar a 44% em indivíduos com 65 anos ou mais. De acordo com o *Global Burden of Disease Study* (2019) mais de 3,5 bilhões de pessoas sofrem de doenças bucais, sendo 14% dos adultos, representando mais de um bilhão de casos em todo o mundo.

A Organização Mundial da Saúde (2020) estima que até 2030 cerca de 267 milhões de pessoas serão afetadas pela doença periodontal, principalmente os idosos, sendo uma das principais causas a má higiene bucal e o uso do tabaco.

Várias evidências sugerem que as MMPs compreendem a via mais importante na destruição tecidual associada à doença periodontal devido ao seu papel na degradação do colágeno e na quebra patológica da matriz extracelular (MEC) dentro dos tecidos periodontais. Como o colágeno tipo I é o principal componente da matriz extracelular periodontal, constituindo 60% do volume do tecido gengival, 70 a 80% do volume do ligamento periodontal e 90% do volume do osso alveolar (Bartold e Narayanan, 2000), muito tem se estudado sobre o papel das colagenases e gelatinases associadas a doença periodontal, principalmente as MMP-8, MMP-13, MMP-2 e MMP-9.

Marcaccini e colaboradores (2009) compararam os níveis de MMP-8, inibidores de tecido de MMPs (TIMP-1 e TIMP-2), mieloperoxidase (MPO) e MMP-9 no fluido crevicular gengival em pacientes com periodontite crônica, mostrando que houve aumento destes níveis em comparação aos controles e os marcadores diminuíram em três meses o tratamento periodontal dos pacientes. Em outro estudo (Meschiari et al., 2013), investigaram as alterações nas concentrações salivares das MMP-8, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e MPO durante o tratamento de doença periodontal, comparando resultados com níveis de plasma e mostraram que existe uma correlação entre as atividades das MMP-8 e MMP-9 em níveis de plasma.

Mesmo com tantas evidências científicas ainda não estão claros os substratos de MMP-2 e seus métodos de clivagem. E talvez justamente este aumento de MMPs que acontece em várias doenças, e é bem caracterizado na doença periodontal, seja justamente um dos mecanismos que associa a doença periodontal à doença cardiovascular.

1.4 Inibidores das metaloproteinases da matriz

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMPs quando ativadas, por meio do domínio hemopexina na ligação de alguns substratos e algumas atividades proteolíticas (Nagase, Visse e Murphy, 2006). Existem quatro TIMPS descritos na literatura: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Os TIMPS -1 e -3 são glicoproteínas e os TIMPS-2 e -4 não possuem carboidratos.

Dentre elas, preferencialmente, o TIMP-1 forma complexo com a MMP-9 e o TIMP-2 com a MMP-2. O equilíbrio entre as MMPs e os TIMPS, é o que chama atenção, pois ele que irá determinar o tamanho da degradação da proteína na MEC e na remodelação tecidual (Wang e Khalil, 2018).

Além dos TIMPs, temos os inibidores endógenos, os inibidores à base de hidroxamato e os inibidores não hidroxamato. Nos últimos anos, os antibióticos da classe das tetraciclinas, como a doxiciclina, também demonstraram esta capacidade inibitória de MMPs. A doxiciclina tem sido utilizada em estudos de doenças cardiovasculares e mostrado melhorias após seu uso, principalmente redução da proteólise da troponina I e da distrofina (Tessone et al., 2005; Antonio et al., 2014; Mata et al., 2015; Parente et al., 2021). Na doença periodontal a doxiciclina, nos Estados Unidos da América, é utilizada no seu tratamento, inibindo as MMPs e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Liu e Khalil, 2017). Outros fármacos também têm sido estudados para a diminuição e inibição da expressão das MMPs (Gong et al., 2018; Mendes et al., 2020; Skrzypiec-Spring et al., 2021).

Portanto, a compreensão do papel das MMPs na fisiologia das doenças cardiovasculares é interessante, pois assim, poderemos pensar em inibidores que funcionem como tratamento e diminuição da progressão da doença.

1.5 Metodologia para detecção de proteínas

As proteínas são macromoléculas formadas por uma cadeia de aminoácidos,

sendo conectados por ligações peptídicas. Elas desempenham diversas funções no nosso organismo e há uma grande variedade em células e tecidos, por isso, cientistas buscam compreender seu funcionamento em sistemas biológicos, para que então possam ser alvos farmacológicos e biomarcadores de doenças. Vale ainda a pena ressaltar que, entre as funções que apenas as proteínas desempenham no organismo de vertebrados está a função enzimática e a função estrutural, sendo esta última particularmente importante em vários tecidos de vertebrados, que são organismos grandes e multicelulares, e que apresentam espaços extracelulares com grande volume em relação ao volume de células, como acontece no tecido conjuntivo humano. Assim, o estudo de eventos proteolíticos passa a ser de suma importância, pois ele tem o potencial de revelar vias que afetam diretamente processos conduzidos por enzimas e processos que afetam a estrutura do organismo. Embora muitos processos que são controlados por enzimas já tenham sido descritos (por exemplo a cascata da coagulação, o complemento, entre outros), certamente muitos processos controlados por enzimas ainda irão ser descobertos a partir do uso de métodos mais específicos para descobrir clivagens proteolíticas, ao invés dos métodos de proteômica quantitativa, centrados nas variações de quantidade de proteínas e peptídeos das proteínas mais abundantes.

Como citado anteriormente, as MMPs ficam aumentadas em diversas doenças, principalmente a MMP-2. Para compreendermos seu funcionamento e pensarmos em alvos farmacológicos e biomarcadores precisamos conhecer os substratos da MMP-2. Para isso, precisamos primeiramente separar as proteínas e analisar. Podemos utilizar métodos clássicos, como a eletroforese e *western blotting*, servindo também como pré-fracionamento da amostra. No entanto, com o passar dos anos, a cromatografia líquida também tem sido outra metodologia de que podemos usufruir, pois separa as proteínas e peptídeos por meio da digestão de todo extrato proteico. Tanto os métodos clássicos quanto os mais modernos podem utilizar e/ou associar a espectrometria de massa para a identificação das proteínas.

1.6 Proteômica

Para entender alguns processos biológicos necessitamos compreender a proteína de forma individual e para isto contamos com técnicas de separação e purificação para determinar as suas propriedades, assim sendo, neste contexto, surge a proteômica e o termo proteoma.

A proteômica estuda, identifica e analisa de forma descritiva e quantitativa o conjunto de proteínas e suas isoformas expressas em uma célula, tecido ou organismo, além da análise de vias de sinalização e o desenvolvimento de sistemas de ensaio de biomarcadores de proteínas (Mallick & Kuster, 2010; Valledor & Jorin, 2011). Ela pode ser utilizada em diferentes configurações de pesquisa, como detecção de vários marcadores de diagnóstico, candidatos para a produção de vacinas, compreensão dos mecanismos de patogenicidade, alteração dos padrões de expressão em resposta a diferentes sinais e interpretação das vias de proteínas funcionais em diferentes doenças (Aslam et al., 2017).

O termo proteoma surgiu na década de 90 quando foi descrito pela primeira vez por Marc Wilkins e colaboradores (Wilkins et al., 1996), que diferenciam genoma e proteoma. Eles descreveram como um conjunto de todas as proteínas que atuam nos processos biológicos, sendo gerados com base no genoma, pois o número de proteínas pode exceder o número de genes presentes devido aos *splicings* alternativos e modificações pós-traducionais (PTMs). O proteoma não é estático, podendo mudar de uma célula para outra, alterando o seu perfil de acordo com as condições fisiológicas e estado celular.

Existem inúmeras possibilidades de interações proteína-proteína e PTMs. Por isso a proteômica tem se revelado uma ferramenta poderosa para identificar, compreender, quantificar e analisar proteínas, peptídeos e vias metabólicas da célula, além de permitir aprimorar e aplicar os conhecimentos sobre essas interações e modificações, contribuindo para o conhecimento de sua bioquímica, mecanismos de patologias e desenvolvimento de terapias e fármacos.

1.7 Metodologias na proteômica

Diferentes metodologias podem ser utilizadas e associadas em estudos proteômicos, tais como: espectrometria de massa (MS), ionização por eletrospray (ESI) e ionização, dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e softwares para equipamentos (Mallick & Kuster, 2010; Aslam et al., 2017). No entanto, na proteômica a espectrometria de massas associada à cromatografia líquida (LC-MS/MS) tem sido escolhida em estudos de proteínas e proteomas, diminuindo cada vez mais as abordagens por gel e anticorpo. Normalmente, utilizam-se duas abordagens metodológicas de análises na proteômica que são classificadas em *bottom-up* ou *top-down*. Na *bottom-up* ou *shotgun*, utiliza-se a cromatografia líquida para separar os

peptídeos obtidos após digestão triptica de soluções proteicas complexas e a análise por MS. Já a segunda é um processo onde as proteínas intactas são submetidas à análise por espectrometria de massas, não sendo necessário fazer a digestão prévia das proteínas a serem analisadas (Ahrens et al., 2010; Armirotti & Damonte, 2010).

1.8 Fracionamento e identificação de proteínas

Como já dito acima, antes da análise proteômica propriamente dita, as proteínas costumam ser separadas. Isso pode ser feito pela eletroforese em gel (o que praticamente já caiu em desuso, mas pode ainda ser feito, utilizando-se o gel unidimensional ou bidimensional). A outra forma de separação de proteínas antes da injeção de amostras de proteína em espectrômetro de massas é a cromatografia líquida, que é a forma mais utilizada hoje. Neste caso, existe ainda a cromatografia líquida de fase reversa e a cromatografia líquida de alta eficiência.

É importante ressaltar que, seja qual for o método separação usado, há sempre a necessidade prévia de redução das pontes dissulfeto, que são muito comuns na maioria das proteínas. As pontes dissulfeto (-S-S-) são um tipo de ligação covalente entre os dois enxofres de dois aminoácidos cisteína que ficam em regiões distantes da estrutura da proteína, e fazem parte do que é conhecido como “estrutura terciária” das proteínas. Ao se desfazer as ligações covalentes entre diferentes partes distantes da cadeia polipeptídica de uma proteína, ela se torna uma ou mais cadeia(s) linear(es) de aminoácidos. Para desfazer as pontes dissulfeto, o reagente mais utilizado o ditioneitol (DTT). Para impedir que novas pontes dissulfeto surjam (pois em todo lugar há oxigênio, que torna a reação de formação de pontes dissulfeto muito favorável), faz-se o “bloqueio” dos grupamentos sulfidril (-SH) mediante a alquilação dos enxofres, frequentemente utilizando iodoacetamida (Zhang et al., 2013).

Logo após a eliminação das estruturas terciárias das proteínas, descrita acima, estas são digeridas em um processo enzimático ou químico. Isso é necessário para que haja um certo controle do tamanho da massa dos peptídeos que serão injetados nas câmaras de ionização dos espectrômetros de massas. Isso é um procedimento comum na proteômica bottom-up, não se aplicando à proteômica top-down.

Dentre as opções de digestão enzimática, a tripsina normalmente é escolhida por conseguir clivar no lado C-terminal em lisina e arginina. Existem softwares que permitem antever os fragmentos gerados pela digestão por tripsina (ou por outras proteases) quando a proteína estudada é conhecida, o que acontece para a maioria

das proteínas de genomas já descritos. Após este processo, é utilizada uma técnica de ionização (ESI ou MALDI), proporcionando a fragmentação. Basicamente três princípios podem ser utilizados para alcançar a separação das massas, são elas: separação baseada no tempo de voo (TOF-MS), separação através de campos elétricos gerados por hastes metálicas (quádrupolo MS) ou separação pela ejeção de íons de um campo de aprisionamento de íons tridimensional (aprisionamento de íons ou transformada de Fourier ciclotron íon MS). É feita então a análise de massas, onde ocorre a separação dos íons gerados por meio da razão massa/carga, passando pela fase de detecção e por fim análise dos dados. O analisador de massas Orbitrap é considerado um dos mais novos analisadores em espectrometria de massas (Knochenmuss & Zeboni, 2003; Makarov, 2010; Paulo et al., 2012; Overall, 2014).

Já o tipo de espectrometria de massas que será utilizado neste trabalho é conhecido como Espectrometria de Massas em *tandem* (MS/MS), o que quer dizer que inicialmente a informação do tamanho do íon do peptídeo que entrou na câmara é usado (o MS1), seguindo-se uma nova ação do laser na câmara, com a geração dos fragmentos (e massas) dos aminoácidos componentes daquele peptídeo (o MS2).

Alguns destes termos serão detalhados a seguir, para se conseguir, na discussão, mostrar os grandes avanços tecnológicos que foram necessários para ser possível termos informações fidedignas sobre os substratos de proteases em tecidos complexos de animais.

1.8.1 Eletroforese - uni e bidimensional

A eletroforese unidimensional foi apresentada pelo bioquímico Arne Tiselius em 1937 e a bidimensional por O'Farrel em 1975, sendo uma ferramenta robusta para identificar o proteoma de um organismo. Nesta técnica as proteínas podem ser separadas com base na migração de proteínas usando um campo elétrico e separadas por meio de suas massas moleculares, no qual o pesquisador já pode visualizar a separação e estimar o número de proteínas.

A análise unidimensional separa as proteínas apenas por seu peso molecular sem previamente passar pela etapa de ponto isoelétrico. Já a bidimensional normalmente é realizada em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para obter a separação das proteínas. O dodecil-sulfato de sódio atua como detergente aniônico que se liga às proteínas, permitindo a desnaturação inicial e fazendo com que todas as proteínas fiquem com carga negativa permitindo assim que

as proteínas se deslocam em direção ao pólo positivo. Em seguida, o gel que contém acrilamida permite a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. A concentração da acrilamida irá influenciar na matriz porosa do gel, desta forma, quanto maior a sua concentração menor serão os poros. (Nowakowski, Wobig e Petering, 2014). Além disso, para a confecção destes géis, utiliza-se tetrametiletilenodiamina (TEMED) como catalisador, para facilitar a transferência do elétron do radical livre e para gerar os radicais livres, o persulfato de amônio (Srinivas, 2012).

1.8.2 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica para separação físico-química de misturas que envolve duas fases para a separação dos seus componentes: uma móvel e outra estacionária. Existem diferentes técnicas cromatográficas, sendo que sua escolha dependerá do material a ser analisado (identificação necessária). Dentre as principais técnicas para análise cromatográfica podemos citar: cromatografia delgada, cromatografia gasosa, cromatografia em papel e cromatografia líquida (LC). Dentre as técnicas de cromatografia mais modernas destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que se difere um pouco da técnica clássica (Coskun, 2016).

Para a purificação de proteínas é necessário obter o extrato bruto para que então se possa realizar o fracionamento. Um dos métodos mais utilizados para o fracionamento de proteínas é a cromatografia em coluna. Além disso, na purificação de proteínas podemos utilizar a cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia de exclusão por tamanho e cromatografia de afinidade para diferenciar tamanho, carga, afinidades de ligação e outras propriedades (Saraswat et. al., 2013).

1.8.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é também uma técnica analítica bastante utilizada em processos de caracterização de compostos. Essa técnica permite a ionização de um composto e a separação de partículas de diferente relação massa-carga (m/z) em uma mistura. Esta técnica pode ser aplicada para a identificação de proteínas porque estas, quando clivadas, geram fragmentos ionizáveis na grande maioria das vezes. O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador de

massas, podendo haver mais de um detector (Parker et al., 2010).

A fonte de ionização é responsável por produzir os íons proteicos ou peptídicos, normalmente transferindo prótons (H^+) para as moléculas sem modificar a sua estrutura química. A ionização pode ser feita por MALDI ou ESI que serão explicados mais adiante (1.9). Após isto, os íons são acelerados por meio de um campo elétrico e separados por razão massa-carga no analisador de massas ou selecionados a partir de uma m/z pré-determinada e fragmentados em *tandem*. Os analisadores mais utilizados são: tempo de voo (TOF- *Time of flight*), quadrupolo (Qs) e armadilha de íons (*ion trap*). Por último, os íons passam pelo detector que está acoplado em um computador, sendo os dados processados e por meio de softwares realizada a análise de dados (Aebersold e Mann, 2003).

1.9 Métodos de ionização

Normalmente, em proteômica são utilizados dois métodos de ionização, a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* - MALDI) e a ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization* - ESI) (Fenn et al., 1989; Karas; Glückmann; Schäfer, 2000). Como apenas fonte de ionização, temos a ionização por elétrons (*Electron ionization* - EI) e a de ionização química (*Chemical ionization* - CI) que são geralmente utilizadas para amostras voláteis e termicamente estáveis e sensíveis. Já com as fontes de dessorção não necessitam ter a volatização seguida de ionização. MALDI é mais indicada para polímeros apolares e alto peso molecular, enquanto ESI é mais apropriado para polímeros polares e de baixa massa (Nadler et al., 2017).

1.9.1 MALDI

É um método que proporciona a ionização e a dessorção de amostras do estado sólido para a fase gasosa e de característica não volátil. Neste método, o analito é dissolvido ou suspenso em uma matriz, normalmente constituída por pequenas moléculas orgânicas para que então realize a co-cristalização em uma matriz orgânica, frequentemente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Por último, um feixe de laser é inserido sobre esta mistura, fazendo com que a matriz e seus íons transfiram a carga para os analitos, promovendo a ionização e dessorção do analito. (Darie-Ion et al., 2022; Schey et al., 2021)

1.9.2 ESI

É um método de transferência de íons da solução aquosa para a fase gasosa. Dissolve-se o analito em um solvente adequado para que ele possa ser bombeado atravessando uma agulha capilar. No momento da saída da mistura analito/solvente da agulha, é aplicada uma alta voltagem (3-5kV) para formar a mistura em um spray eletrolítico. Com a evaporação do solvente, há formação de aerossol de gotas altamente carregadas que criam formas ionizadas do analito (Zhang et al., 2006; Gropengieser et al., 2009).

1.10 Análise e banco de dados para o estudo de proteínas

1.10.1 Métodos quantitativos

Primeiramente, o gel de eletroforese bidimensional era uma técnica para quantificação de proteínas. No entanto, nos últimos anos, novos métodos de quantificação de proteínas têm sido desenvolvidos por meio da espectrometria de massas. Alguns métodos utilizam a marcação de peptídeos ou proteínas por isótopos ou outros reagentes que são identificados por MS, como *linkers* com isótopos pesados na ocorrência do *Isotope-Coded Affinity Tag* (iCAT), tags isobáricas ou *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (iTRAQ) e incorporação *in vivo* de aminoácidos contendo isótopos não radioativos no *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell Culture* (SILAC).

1.10.1.1 ICAT

O ICAT é comercializado em duas formas isotópicas diferentes dos átomos de carbono ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$), proporcionando assim, a quantificação relativa entre duas amostras em condições diferentes no espectrômetro de massas. Ele atua no nível dos resíduos de cisteína, o que dependendo do caso pode ser uma desvantagem, pois as proteínas que não possuem cisteína acabam não sendo detectadas (Colangelo e Williams, 2006).

1.10.1.2 iTRAQ

O iTRAQ permite a marcação isobárica de peptídeos por meio de uma combinação de Carbono (C), Nitrogênio (N) e Oxigênio (O) no processo de fragmentação de MS². É comercializado em kits de duas formas, o primeiro contém um conjunto de marcação isobárica de quatro moléculas (iTRAQ-4plex) e o segundo

com oito (iTRAQ-8plex) marcações, permitindo uma análise multiplex das amostras. Sua atuação de marcação está no nível da amina primária das proteínas (Dean e Overall, 2007).

1.10.1.3 SILAC

O SILAC utiliza o crescimento celular em meio enriquecido com os isótopos de aminoácidos, normalmente arginina ou lisina são adicionadas em dos meios de cultura, permitindo assim, a incorporação da forma isotópica e não isotópica dos aminoácidos nas proteínas (Ong et al., 2002).

1.10.2 Softwares e banco de dados

Utilizamos softwares para facilitar a análise, assim, os espectros gerados pelo espectrômetro de massas são processados e comparados com os bancos de dados disponíveis para a identificação do peptídeo ou proteína de interesse, tais como: MASCOT, Uniprot, SEQUEST, TopFIND, Tandem e Comet.

1.11 Degradômica

A degradômica é uma área da Proteômica focada na descoberta de novos substratos de proteases, eventos de clivagem das proteases e identificação de Neo N-terminais, caracterizando a cascata proteolítica responsável. Geralmente são os N-terminais da proteína que são analisados devido à composição favorável da presença da amina primária no N-terminal de cada peptídeo. Mais detalhes serão vistos abaixo.

1.12 Metodologias na degradômica

Muitos estudos têm seu foco na detecção das proteínas mais abundantes, neste caso, nosso interesse na degradômica está nas proteoformas de baixa abundância. Portanto, para que haja a detecção e identificação, a maioria dos protocolos emprega uma etapa de enriquecimento específico para o subproteoma escolhido antes da análise e pode incluir um fracionamento ortogonal offline para diminuir a complexidade das amostras injetadas. Essas metodologias normalmente se encaixam em duas categorias de enriquecimento negativo ou positivo (Haack, Overall e Keller, 2022).

1.12.1 Fluxos de trabalho de enriquecimento negativo

O enriquecimento negativo permite a detecção de N-terminais e dos Neo N-terminais, por meio de uma marcação na sua amina primária livre em nível proteico antes da digestão e remoção dos peptídeos trípticos. A seguir serão explicadas brevemente as principais técnicas de enriquecimento negativo.

1.12.1.1 COFRADIC

Combined Fractional Diagonal Chromatography (COFRADIC) foi uma das primeiras técnicas de marcação negativa. As proteínas são desnaturadas em altas concentrações de sais, as pontes de dissulfeto são reduzidas e os grupos tióis livres são alquilados usando iodoacetamida. Após a redução e alquilação, todas as aminas primárias livres (α - e ϵ - aminas) são bloqueadas por acetilação. Depois, as amostras são digeridas com tripsina ou qualquer outra endopeptidase altamente específica para gerar os N-terminais da proteína e expor as α -aminas livres. Em seguida, os peptídeos representando N- e C- terminais são enriquecidos pela cromatografia de troca catiônica, ao mesmo tempo, os peptídeos internos interagem com a resina. Por fim, duas corridas de cromatografia líquida de fase reversa ortogonal (RP-HPLC) são realizadas com tratamento com ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS). Somente as frações contendo os peptídeos que representam a proteína N-terminal original são analisados por LC-MS/MS (Eckhard et al., 2016; Staes et al., 2008).

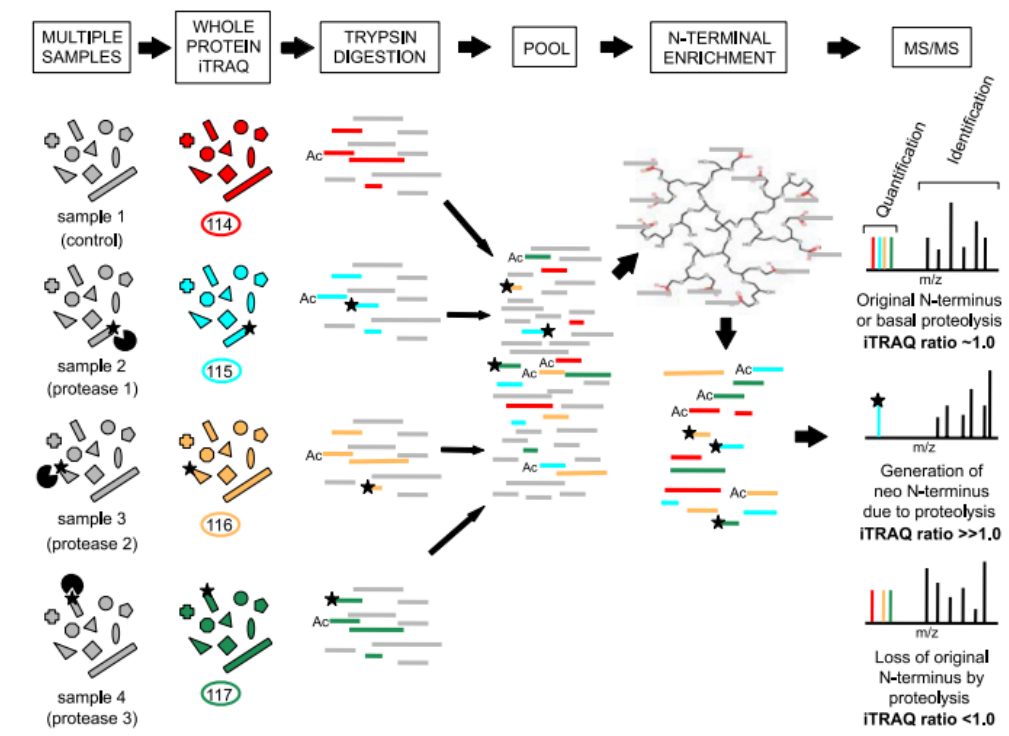
1.12.1.2 TAILS

O Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates (TAILS) é o mais utilizado para detecção de substratos, além disso, permite a identificação de produtos de clivagem de proteases. Pois, esta estratégia remove os peptídeos trípticos e C-terminais internos, ligando-se a um polímero de aldeído de poliglicerol dendrítico e enriquece os peptídeos N-terminais (Doucet et al., 2011). Neste caso, as cadeias laterais de cisteína e aminas primárias são bloqueadas no nível da proteína antes do processo de digestão do proteoma, permitindo a análise do N-terminais e Neo N-terminais. Em TAILS utiliza-se formaldeído ou marcadores isobáricos para fazer o bloqueio das aminas. Após a digestão com tripsina ou outra endopeptidase, a mistura é incubada com um polímero derivado de aldeído e solúvel em água. Esse polímero liga covalentemente aos peptídeos internos que foram digeridos e que possuem aminas primárias reativas livres. Como os N-terminais bloqueados não são reativos,

eles são facilmente separados dos peptídeos internos ligados ao polímero por ultrafiltração antes da análise LC-MS/MS (Kleifeld et al., 2011; Eckhard et al., 2016).

A análise “multiplex” dos N-terminais fornece a informação do proteoma e a identificação de proteína por dois ou mais peptídeos diferentes e únicos. Ademais, permite a análise dos peptídeos N-terminais de acordo com a razão de isótopos válidos para identificar os Neo N-terminais gerados e quantifica a perda de peptídeos N-terminais acetilados ou clivados, estendo a cobertura geral do substrato. Normalmente, associa-se o iTRAQ com TAILS, conforme a **Figura 2**, pois ela permite a caracterização simultânea dos N-terminais Naturais das proteínas e suas modificações, além disso, a identificação do produto da proteólise e do local de clivagem, por fim, a quantificação no modo MS2 (Prudova et al., 2010). Na **Figura 2** podemos ver uma proteína que sofreu proteólise com uma estrela preta nas amostras 2, 3 e 4, geradas por diferentes proteases (ou sob diferentes condições). As proteínas de cada amostra (2,3 e 4) são marcadas com os reagentes/moléculas do sistema iTRAQ-TAILS (114, 115, 116 e 117) que se diferem um do outro em 1 a 4 Daltons (indicados na figura por diferentes cores), permitindo serem usados como molécula repórter para comparar o número de peptídeos e proteínas entre os grupos estudados, permitindo uma melhor e mais precisa análise quantitativa. No processamento a seguir, as amostras de todos os grupos são misturadas e tripsinizadas. As amostras são então reunidas em um *pool* de amostras e passadas por uma coluna com uma resina que liga fragmentos trípticos. Assim, o resultado será a seleção negativa dos peptídeos não trípticos, e por fim, esses serão injetados no espectrômetro de massas, proporcionando a obtenção dos dados para serem analisados posteriormente.

Figura 2 – Fluxo de trabalho iTRAQ-TAILS



Fonte: Prudova et al., 2010.

1.12.2 Fluxo de trabalho de enriquecimento positivo

No enriquecimento positivo, as estratégias descartam os N-terminais modificados. Elas visam reter e isolar os Neo N-terminais e a marcação das aminas primárias N-terminais no nível da proteína com um marcador de afinidade, como biotina, para isolar subsequentemente usando a purificação por afinidade de avidina-biotina ou streptavidina-biotina. Outras técnicas alternativas foram desenvolvidas, mas não obtiveram sucesso ou são especializadas para proteínas específicas (Haack, Overall e Keller, 2022).

Proposição

2 Proposição

O presente trabalho teve por objetivo identificar os substratos de MMP-2 no coração, buscando compreender seu papel proteolítico e seus produtos de clivagens.

Materiais e

Métodos

3 Materiais e Métodos

O presente trabalho utilizou amostras de coração congeladas durante a fase experimental do doutorado de Alejandro Ferraz do Prado, intitulada: *“Localização in vivo e efeitos cardiovasculares após exposição por 4 semanas a metaloproteinase da matriz 2 fusionada com a proteína verde fluorescente em camundongos saudáveis e ateroscleróticos”* e faz parte de um subprojeto do Projeto Temático (Processo FAPESP nº 2014/23888-0) que foi desenvolvido durante o período da pandemia causada pelo Sars-Cov-2, mundialmente conhecida por COVID-19, contando com uma equipe multidisciplinar e multirregional para sua execução, dos quais: Laboratório de Histologia e Proteínas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/SP (FORP-USP), Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) de Campinas/SP, Laboratório Especial de Toxicologia Aplicada do Centro de Toxinas, Imuno-Resposta e Sinalização Celular (CeTICS) do Instituto Butantã/SP e Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ-UFRJ). A parte experimental de processamento das amostras dos corações foi desenvolvida pela Pós-Doutoranda Ariane Fidelis Busso Lopes (Processo FAPESP nº 2019/21815-9) A parte de encubação com a resina para seleção negativa dos peptídeos foi feita pelo grupo do Prof. André Zelanis. A injeção no equipamento de espectrometria de massas foi feita pelo grupo do Prof. Fábio Nogueira. Finalmente foi feita a análise proteômica quantitativa de descoberta no programa MaxQuant, sendo a seguir realizada a etapa de validação dos resultados, como descrito em mais detalhes abaixo.

3.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com as diretrizes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). Foram utilizados camundongos C57BL/6. Os animais foram mantidos em ciclo claro:escuro de 12h com temperatura controlada entre 22-25°C e com livre acesso de ração e água no Biotério da FORP-USP. O presente trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, processo nº 120/2010).

3.2 Grupo amostral

Neste trabalho utilizamos tecidos cardíacos coletados de camundongos C57BL/6 do sexo masculino que, aleatoriamente, foram divididos em dois grupos. O primeiro, grupo controle (n=6) recebeu o veículo (0,9% salina) e o segundo, grupo MMP-2 (n=6) recebeu tratamento com 0,15 µg da proteína quimera catMMP-2/GFP por g de peso corpóreo, via intraperitoneal, diariamente por um período de quatro semanas. No início das injeções os animais estavam na décima primeira semana de vida, o que corresponde a uma idade de aproximadamente 10 anos da idade humana, pois na idade adulta a cada mês do rato é aproximadamente 2,5 anos humanos (Andreollo et al., 2012).

Após o tratamento, os animais foram pesados, anestesiados e a cavidade torácica exposta para a remoção rápida do coração. Depois, os tecidos cardíacos foram lavados com solução salina 0,9% e congelados a -80°C até a sua utilização.

3.3 Preparação das amostras para análise do N-terminal pela técnica de TAILS

O preparo de amostras para a técnica de TAILS (*Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates*) foi realizada de acordo com protocolo descrito por Zelanis e colaboradores (2019) e Kleifeld e colaboradores (2011). Brevemente, os tecidos cardíacos (42 – 75 mg) obtidos do grupo controle (n = 6) e do grupo MMP-2 (n = 6) foram macerados em nitrogênio líquido e ressuspendidos em 200 µL de tampão de extração com adição de inibidores de protease (2% CHAPS, 200 mM NaCl, 50 mM HEPES, cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1mM NaF, 1mM beta-glycerophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM PMSF, and 1mM EDTA, pH 7.5). A concentração proteica no sobrenadante foi determinada pela técnica de Bradford e 500 µg de proteína foram utilizadas para redução das pontes dissulfeto com dithiothreitol (DTT) (concentração final = 5 mM), alquilação dos grupos tióis livres dos resíduos de cisteínas com iodoacetamida (IAA) (concentração final = 15 mM) e *quench* do excesso de IAA com DTT (concentração final = 10 mM). Regiões N-terminais foram marcadas diferencialmente via dimetilação isotópica redutora (Kleifeld et al., 2011) utilizando soluções de formaldeído leve ($^{12}\text{CH}_2\text{O}$; grupo controle) e pesada ($^{13}\text{CD}_2\text{O}$; grupo MMP-2), que resultam em diferenças de massa de +28.0313 Da e +36.0689 Da, respectivamente. As amostras marcadas com o isótopo leve e pesado foram combinadas na razão 1:1 e precipitadas

com acetona (8 volumes) e metanol (1 volume). A digestão ocorreu com adição de tripsina (Promega) na razão 1:100 (enzima/substrato). Peptídeos N-terminais foram enriquecidos utilizando o polímero aldeído poliglicerol dendrítico (patenteado e produzido pelo grupo do Dr. Christopher Overall, e vendido pela empresa de inovação Flintbox a partir da Universidade de British Columbia, UBC, Canadá), seguindo o protocolo de Kleifeld et al. (2011), sendo no final os peptídeos dessalinizados (Cox et al., 2011). A quantificação de peptídeos foi realizada com o kit Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo Scientific) e uma alíquota foi submetida a LC-MS/MS.

3.4 Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida

Utilizamos o espectrômetro de massas acoplado ao aparelho cromatografia líquida de alta eficiência para detectar, identificar e quantificar relativamente às proteínas e peptídeos. O conjunto de peptídeos foi obtido em um espectrômetro de massas QExactive Plus acoplado a um sistema Easy nano LC 1000 (Thermo Scientific) em modo positivo.

As amostras foram injetadas em duplicata técnica em uma coluna trap empacotada com C18 (100 µm diâmetro interno x 2 cm) e submetidas a dessalinização adicional com 100% do solvente A (ácido fórmico 0,1%). Em seguida, os peptídeos foram carregados em uma coluna analítica Acclaim PepMap (Thermo Scientific), com 2 µm de tamanho de partícula, poro de 100 Å, comprimento de 150 mm e diâmetro interno de 50 µm e eluídos em um gradiente linear de 3 a 30% de Solvente B (acetonitrila em ácido fórmico 0,1%) em uma taxa de fluxo de 300 nL/min durante 120 minutos. A voltagem do nanoeletrospray foi ajustada para 1.9 KV a temperatura de fonte foi de 250°C. Para aquisição dos dados, o espectrômetro de massas foi operado em modo dependente de dados, também conhecido como DDA (data-dependent acquisition), no qual cada segundo do equipamento adquire um espectro de MS. A varredura completa dos espectros MS (*full scan*), m/z 375-1650, foi adquirida no analisador Orbitrap. A resolução no Orbitrap foi de $r=70.000$, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) dos 20 mais intensos íons peptídeos. Foi utilizado um *target value* de AGC de $3e6$ para os eventos de MS e de $1e6$ para os eventos de MS/MS. A exclusão dinâmica foi definida para isótopos, com duração de 40 seg.

3.5 Processamento dos dados proteômicos

Os dados espectrais gerados pelo espectrômetro de massas foram processados no software MaxQuant, versão 1.5.8, que possui especificidade para que sejam analisados os conjuntos dos dados proteômicos quantitativos em espectrometria de massas (Cox & Mann, 2008) e os espectros MS/MS foram combinados com as sequências de peptídeos integrado Andromeda (Cox et al., 2011) contra a base de dados internacionais de proteínas *murine UniProt* (63.624 sequências de proteínas, lançamento em fevereiro de 2020). A tolerância do precursor de massa foi de 20 ppm e tolerância da massa dos íons fragmentados foi de 0,02 Da. A taxa de falsas descobertas (FDR- *False discovery rate*) de peptídeos e proteínas foi de 1%. A especificidade enzimática foi definida para semi-ArgC (busca de N-terminal livre), com até dois sítios de clivagem não digeridos. A carbamidometilação de resíduos de cisteína (+57.0214 Da) foi definida como modificação fixa e a desamidação de asparagina ou glutamina (+0.9840), modificação N-terminal por acetilação (+42.0105 Da) e oxidação de metionina (+15.9949 Da) foram selecionadas como modificações de variáveis. A dimetilação N-Terminal e lisina pesada (+36.0689 Da) e leve (+28.0313 Da) foram definidas como marcadores para quantificação relativa em MMP-2 e amostras de controle, respectivamente. Os dados das duas réplicas técnicas foram mesclados. Após o escaneamento, conseguimos os valores de abundância relativa de todas as proteínas identificadas pela técnica de quantificação livre de marcadores baseada na intensidade normalizada do espectro (LFQ - *label-free quantification*).

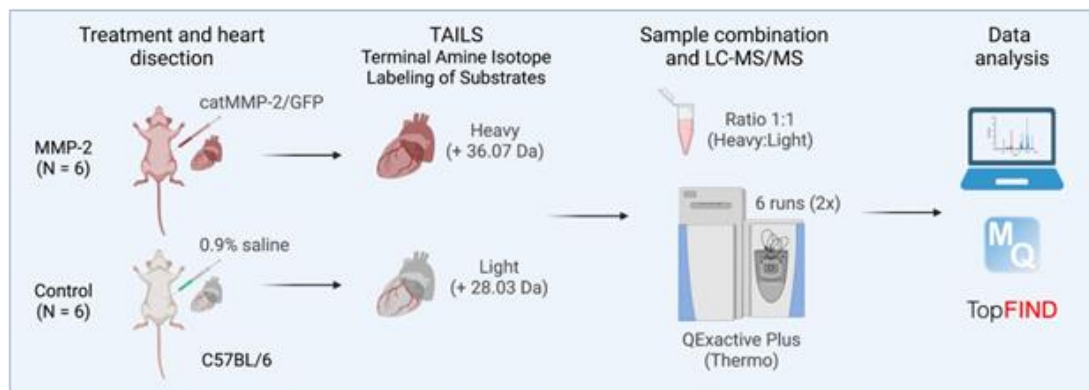
3.6 Análise da anotação N-terminal e análise de enriquecimento

A lista de peptídeos e os números de acesso correspondentes foram submetidos à análise posicional e enriquecimento de proteases usando a base de conhecimento *Terminus Oriented Protein Function INferred Database* (TopFIND) 4.1 (Fortelny, 2015). A base para o enriquecimento de proteases é composta por clivagens das proteínas na lista de proteases identificadas pelo TopFIND, seguidas pelo cálculo de q-valores usando o teste múltiplo de correção de Benjamini-Hochberg. As razões de intensidade (MMP-2/controle) Natural e Neo N-terminais foram transformadas em log₂ e plotadas usando a linguagem R. A variação experimental foi derivada da distribuição de razão Natural de N-terminais e isso foi usado para

determinar pontos de corte significativos (três vezes o desvio padrão) que identificariam os Neo N-terminais aumentados e diminuídos após o tratamento com MMP-2 (estratégia de corte) (Zelanis et al., 2019; Kleifeld et al., 2011; Prudova et al., 2016). Processos biológicos GO super-representados ou vias KEGG foram determinados para os N-terminais aumentados ou diminuídos por proteólise usando ShinyGO v. 0,61 (FDR \leq 0,05) (Ge et al., 2020). Também realizamos uma análise estatística para determinar os Neo N-terminais que foram modulados pelo tratamento com MMP-2, comparando suas intensidades log2 entre os grupos MMP-2 e controle (teste *t Student*; $p \leq$ 0,05) (estratégia estatística).

Estas etapas da metodologia são exemplificadas na **Figura 3** de forma esquemática.

Figura 3 – Representação esquemática do estudo.



Fonte: Lopes, A.B., 2022.

Resultados

4 Resultados

Na degradômica utilizamos enriquecimento do N-terminal com TAILS, sendo uma abordagem poderosa para identificar características específicas no espectrômetro de massas de peptídeos e proteínas específicas. Neste trabalho, utilizamos este enriquecimento para estudar e compreender os eventos proteolíticos em tecidos cardíacos de camundongos C57BL/6 associados ao tratamento com MMP-2. Neste estudo foram identificados 947 peptídeos de 456 proteínas em amostras tratadas de controle (n=6) e MMP-2 (n=6), incluindo 815 peptídeos únicos. Destes 947 peptídeos, 758 peptídeos foram quantificados em grupos controle ou de MMP-2 (**Figura 4**), sendo que 448 peptídeos correspondiam a anotação posicional no banco de dados TopFIND. Cerca de 55% dos 448 peptídeos anotados no TopFIND correspondem a proteína N-terminal Natural esperada (ou seja, posições 1 ou 2, ou após a remoção do sinal ou pró-peptídeo ou locais de processamento interno curados pelo UniProt), enquanto 45% dos peptídeos representavam o Neo N-terminal gerado pela proteólise, com percentuais semelhantes entre os grupos controle e de MMP-2 (**Figura 5a-b**).

Depois, usamos a distribuição de \log_2 (MMP-2/Controle) da proteína original N-terminal para definir os pontos de corte para diferenciar a proteólise de fundo que ocorre em condições normais, ou seja, independentemente da exposição a MMP-2, sabendo assim, se houve aumento ou diminuição após o tratamento. Para a N-terminal Natural, a maioria das razões \log_2 (MMP-2/Controle) estavam centradas em torno de 0, seguindo uma distribuição normal, com média e desvio padrão de -0,04 e 0,97 (**Figura 6**), respectivamente. Isso significa, que conforme o esperado, centrar em 0 significa que esses terminais não foram afetados pela clivagem proteolítica por MMP-2. Com base nestes dados, foi utilizado um corte de razão de três vezes o desvio padrão e as razões de \log_2 (MMP-2/Controle). A distribuição da razão de peptídeos Neo N-terminais variou desde aqueles que desapareceram no grupo da exposição a MMP-2 e aqueles que foram gerados no grupo da exposição com MMP-2 em $\leq -2,98$ e $\geq 2,88$, respectivamente (**Figura 6**), sempre em relação ao grupo controle. Considerando os cortes significativos e peptídeos identificados exclusivamente quantificados em grupos de MMP-2 ou controle, 53 peptídeos que foram diminuídos após o tratamento com MMP-2 e 3 peptídeos foram aumentados após o tratamento com MMP-2 (**Quadro 1**). No geral, esses peptídeos mapearam 26

proteínas que poderiam ser consideradas como candidatas a substrato da MMP-2 ou de outras proteases de cascatas proteolíticas ativadas pelo aumento da MMP-2. Dos 53 peptídeos diminuídos após o tratamento com MMP-2, dois corresponderam a locais de clivagem previamente anotados no banco de dados TopFIND N-terminal, incluindo um peptídeo, FLGDEETVR, anteriormente identificado como um local de clivagem pela MMP-2 e um N-terminal, VLIAAHGNSLR, previamente identificado como um local de clivagem pela protease CATE (**Figura 7a**), mesmo esta anotação de proteases não sendo estatisticamente significativa (teste exato de Fisher seguido pela correção de Benjamini-Hochberg; $q \geq 0,05$) (**Figura 7b**). Não foi encontrada anotação para os três peptídeos (AAVADVDISNIDR; ESLSGQAAARPLVATVGLNVPASVR; VTGAPVPAVSEPQDGDDEFQSR) cuja razão MMP-2/controlado aumentou após o tratamento com MMP-2. Finalmente, as análises de enriquecimento de vias GO (**Figura 8**) e KEGG (**Figura 9**) dos 26 substratos potenciais revelaram uma representação muito expressiva de processos fortemente associados ao metabolismo celular ($FDR \leq 0,05$).

Ademais, determinamos peptídeos que foram diminuídos ou aumentados após o tratamento MMP-2, fazendo uma análise estatística das intensidades de log2 determinadas para cada Neo N-terminal (MMP-2 vs. controle; Teste *t* de Student, $p \leq 0,05$) e peptídeos detectados exclusivamente em um grupo. As intensidades médias são apresentadas para MMP-2 e grupo controle, com o nome dos genes e suas sequências de peptídeos. A cor cinza indica os peptídeos que não foram quantificados em MMP-2 e grupo controle (**Figura 10**). Por esta abordagem estatística, 25 peptídeos Neo N-terminais foram diminuídos, e dois peptídeos N-terminais foram aumentados por proteólise após o tratamento MMP-2, e esses peptídeos pertenciam a 16 proteínas. Dessas 16 proteínas, 13 também foram identificadas como candidatas a substratos utilizando novamente a estratégia de corte (**Quadro 2**) e, conjuntamente, revelaram-se proteínas que participam de processos e vias metabólicas (**Quadro 3**).

Conforme a nomenclatura de Schechter e Berger (1967), em que os resíduos C-terminais ao local de clivagem são referidos com apóstrofe após o P (P'), enquanto que os resíduos peptídicos N-terminais são referidos se apóstrofe após o P (P), podemos dizer que neste estudo foi avaliada a frequência dos resíduos de aminoácidos nas posições P5 a P5'. O mapeamento posicional dos peptídeos mostrou predominância de alanina na posição P1', arginina na posição P1 e leucina

de P5-P5' (Figura 11).

Figura 4 – Número total de peptídeos quantificados e compartilhados entre os grupos controle e MMP-2.

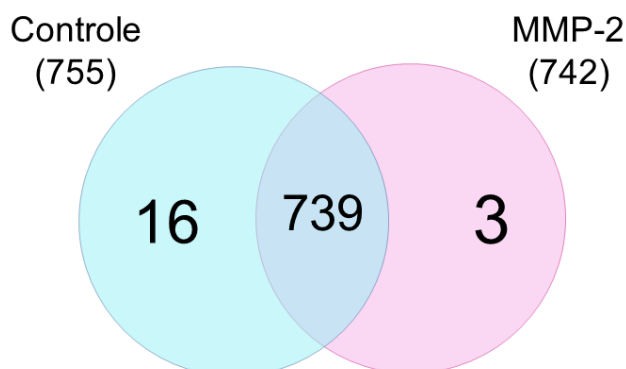


Figura 5 – (a) Distribuição de N-terminais (N-terminal Natural e Neo N-terminal) considerando todas as amostras. (b) Fração N-terminais das amostras agrupadas no grupo controle e grupo tratado com MMP-2.

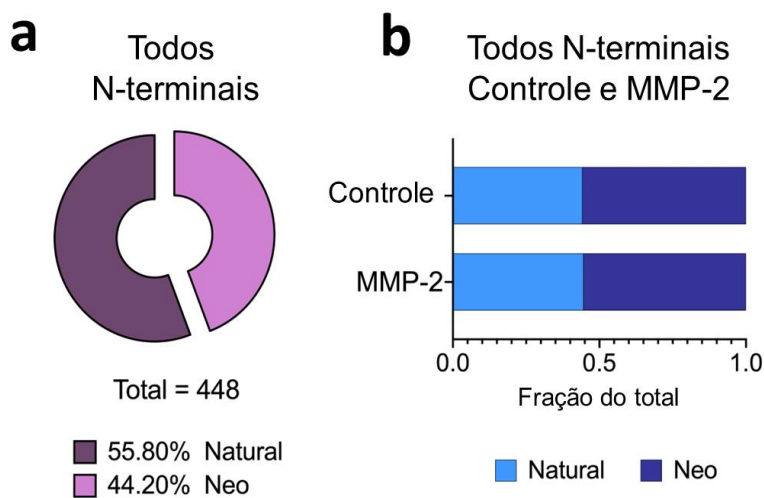


Figura 6 – Distribuição das razões Log2 (MMP-2/Controle) dos Neo N-terminais e N-terminais naturais quantificados pela análise TAILS. O valor de 3 desvios padrão (linhas tracejadas) foi usado para definir os eventos proteolíticos que foram aumentados ($\text{Log}_2(\text{MMP-2}/\text{Controle}) \geq 2,88$) ou diminuídos ($\text{Log}_2(\text{MMP-2}/\text{Controle}) \leq -2,98$) em corações murinos após o tratamento com MMP-2.

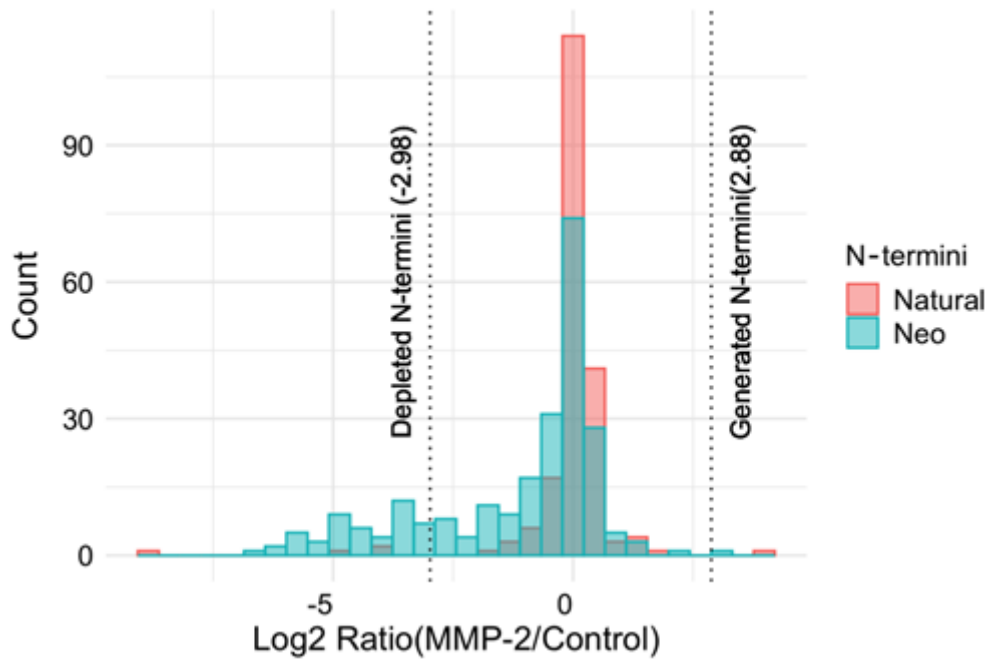


Figura 7 – (a) Clivagem de protease Neo N-terminal quantificado (b) e significância estatística do enriquecimento da protease de acordo com os dados TopFIND.

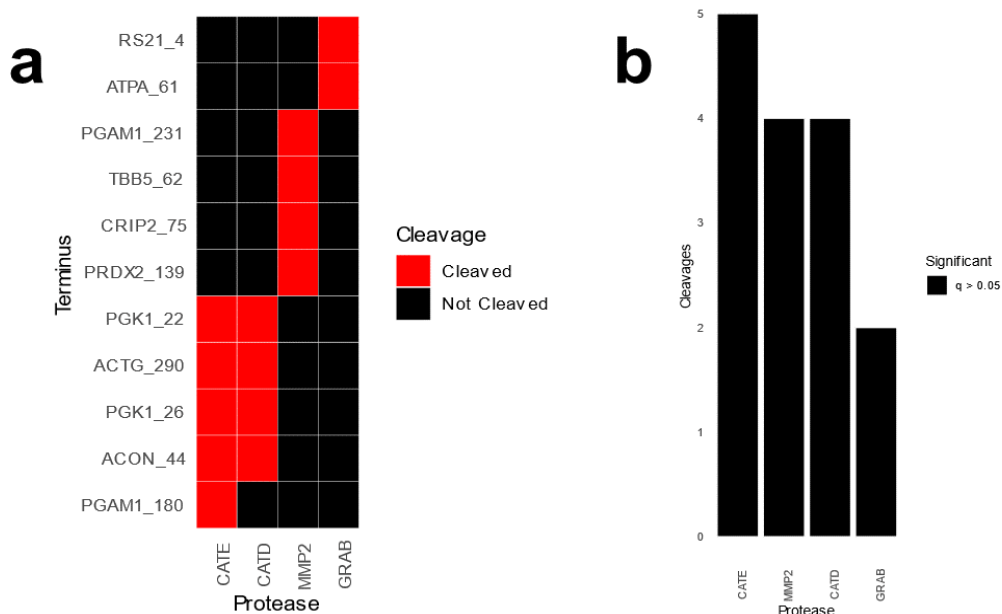


Figura 8 – Processos biológicos GO.

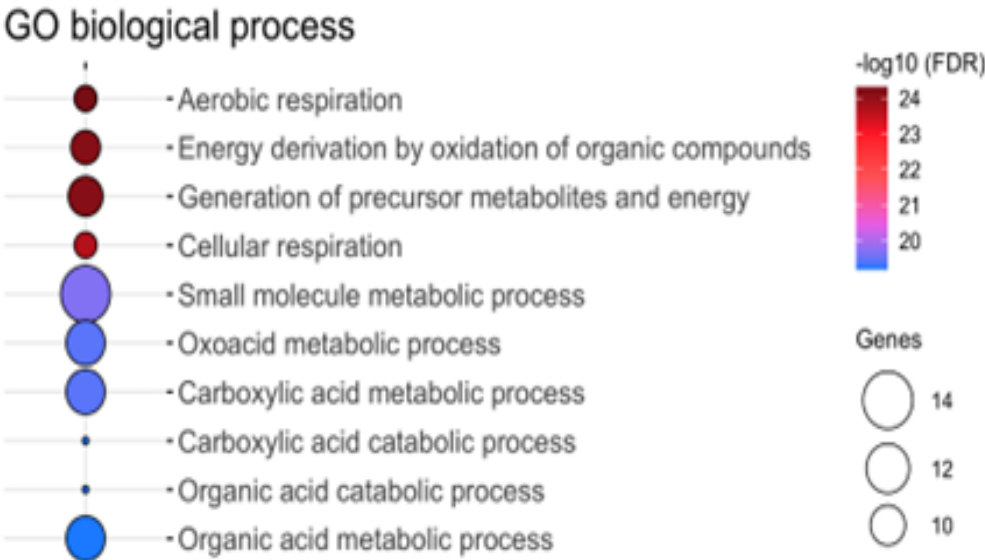


Figura 9 – Via KEGG.

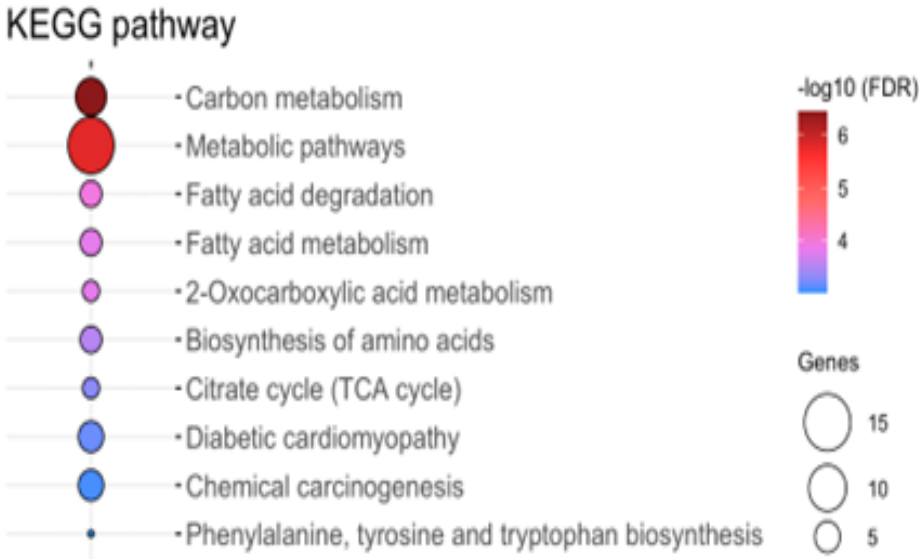


Figura 10 – Intensidades médias de Log2 de Neo N-terminal que aumentaram ou diminuíram em corações murinos após o tratamento com MMP-2, considerando teste *t* de Student ($p < 0,05$) ou peptídeos detectados exclusivamente em um grupo.

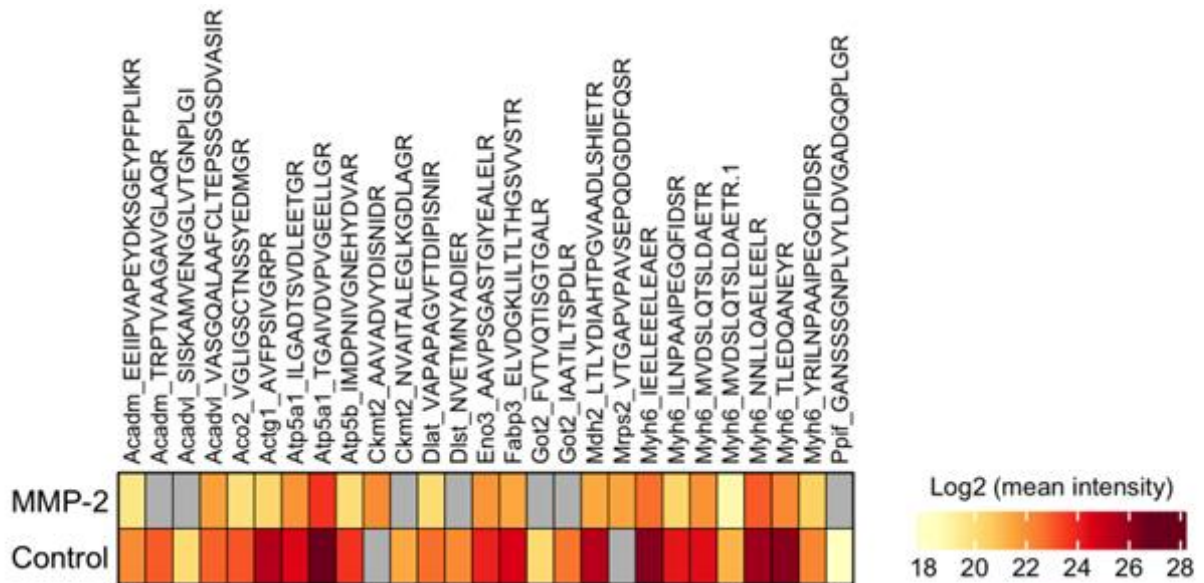
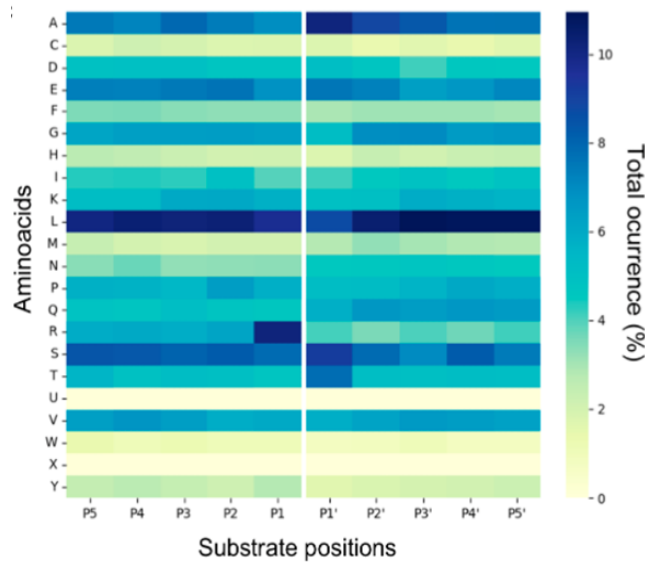


Figura 11 – *Heatmap* ilustrando a ocorrência relativa (%) de cada resíduo de aminoácido encontrado por TAILS no grupo MMP-2.



Discussão

5 Discussão

Por meio dos resultados apresentados e, confirmando o descrito na literatura, observamos que a metaloproteinase da matriz 2 difere das demais MMPs por possuir um domínio catalítico formado por uma tripla repetição de fibronectina tipo II, formando uma afinidade com o colágeno, e assim, permitindo a ligação e degradação da gelatina (colágeno desnaturado) e do colágeno tipo IV. Sua isoforma inativa ou extracelular tem peso molecular de 72kDa, conhecida também como pro-MMP-2 e quando a cisteína não está ligada no domínio catalítico com zinco possibilita a ligação e proteólise dos substratos, pois ela está na sua forma ativa com 67kDa de peso molecular (Shimokawa, et al., 2002).

A gelatinase pode ser produzida e secretada no coração por células endoteliais, células inflamatórias, fibroblastos e cardiomiócitos na progressão de doenças cardíacas. Entretanto, neste estudo, o aumento da MMP-2 circulante, que era uma proteína quimérica fluorescente, indicou que o aumento da MMP-2 na circulação pode levar ao aumento da MMP-2 no coração, situação em que ela está fora das células, no espaço extracelular ou na superfície dos cardiomiócitos (tais dados ainda não estão publicados mas, podem ser verificados na tese de doutorado do aluno Alejandro Ferraz do Prado, pertencente ao nosso grupo de pesquisa). Possivelmente esta localização e a atividade proteolítica da MMP-2 pode aumentar o estresse oxidativo, como já demonstramos em músculo de aortas de coelho (Prado et al., 2018). Eventualmente aumentos do estresse oxidativo podem ativar vias proteolíticas que resultem nos resultados vistos neste estudo. Mas, mesmo havendo esta possibilidade, naturalmente é de grande valor saber se as alterações proteolíticas encontradas neste experimento seriam compatíveis com a clivagem direta das proteínas no novos peptídeos N-terminais pela MMP-2. Embora interessante e eventualmente possível, esta não é a hipótese mais provável. Mas como este é o primeiro estudo no coração de animais que receberam a rhMMP-2 de forma crônica, muito ainda terá que ser estudado, sendo este um estudo inicial, que nos traz informações altamente relevantes e necessárias para a compreensão de novos possíveis mecanismos que possam ajudar a explicar o impacto muito negativo da atividade aumentada da MMP-2 no funcionamento do coração.

A compreensão do perfil e composição dos proteomas da amostra é fator determinante para o sucesso da identificação de substratos das proteases em

estudos proteômicos. Devido à complexidade da amostra, pelo número elevado de peptídeos, foi selecionada a análise iTRAQ-TAILS para explorar a atividade de MMP-2 em tecido cardíaco. Através desta análise conseguimos detectar os N-terminais naturais das proteínas, suas modificações N-terminais e, com isto, constatar o produto de proteólise e do local de clivagem.

A sequência do N-terminal de uma proteína pode apontar diversas características da proteína, como a sua função, estrutura, localização, interação proteína-proteína e taxa de degradação e renovação proteica. Essas informações são importantes para anotar funcionalmente o proteoma. Dependendo do processo proteolítico, mesmo com a remoção de um ou mais aminoácidos, gera-se um novo N-terminal da proteína, que é conhecido como Neo N-terminal. Essa pequena modificação pode alterar a função da proteína ou nos mostrar etapas iniciais ou fundamentais no controle proteolítico de cascatas de sinalização.

No presente estudo apresentamos os possíveis candidatos a substratos de MMP-2 por meio da análise proteômica usando LC-MS/MS de tecido cardíaco murino sendo que foi possível mapear 26 proteínas que poderiam ser candidatas ao substrato de MMP-2. Dentre as proteínas analisadas, observamos que em sua grande maioria temos proteínas associadas ao metabolismo celular e não foram identificadas alterações de proteínas estruturais, no entanto, é possível que de alguma forma existam tais alterações ainda não identificadas, o que poderia acarretar em alterações de proteólise de proteínas que participam das vias metabólicas.

Boumiza e colaboradores (2021) estudaram a associação de MMPs e TIMPs em pacientes saudáveis, obesos com e sem síndrome metabólica, usando diversos parâmetros antropométricos, pressão arterial e função endotelial. Eles mostraram que as pessoas obesas possuem níveis mais elevados de MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, e diminuição dos valores de índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura em níveis de MMP-3/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-1 em comparação com pessoas não obesas. Além disso, os níveis de MMP-3 foram positivamente correlacionados com a pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) em pessoas obesas e com síndrome metabólica.

Em um outro estudo de Sun e colaboradores (2016) sobre as alterações no DNA mitocondrial (mtDNA), colágeno e expressão de MMPs com prolapso de órgãos pélvicos (POP) nos ligamentos útero-sacros (UL) de mulheres na pré-menopausa, num grupo de 56 mulheres na pré-menopausa, todas com menos de 52 anos de

idade, mostraram que o IMC das mulheres foram maiores e tiveram valores do número de cópias do mtDNA, expressão de colágeno III alfa 1 (COL3 α 1) e a expressão de MMP-2 expressivamente maiores no grupo POP quando comparado ao grupo não POP, sendo esses fatores associados com POP no UL de mulheres na pré-menopausa. Estas informações sugerem que, estas alterações metabólicas afetam a proteólise de vias metabólicas celulares em nosso organismo, incluindo os cardiomiócitos.

Auf dem Keller e seu grupo de pesquisa (2010) apontaram 33 novos substratos e 148 outros locais de clivagem em substratos previamente conhecidos, mas não caracterizados para a MMP-2. Além disso, demonstraram um novo substrato de MMP-2, a citocina pró-EMAP/p43 que não havia sido detectada em análises anteriores sem o iTRAQ.

A literatura mostra que o IGFBP-4 e o IGFBP-6 são substratos da MMP-2, além da osteopontina, galectina-1, HSP90 α e CX₃CL1 (fractalquina, também conhecida como ligante 1 de quimiocina) que foram identificadas e confirmadas bioquimicamente (Dean e Overall, 2007). Prudova e colaboradores (2010) compararam os substratos de MMP-2 e MMP-9 e identificaram 201 peptídeos únicos para MMP-2 e 19 para a MMP-9. Além disso, demonstraram novos substratos identificados, tais como: proteína-4 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina, galectina-1, proteína-3 relacionada a dickkopf, subcomponente C1r-A do complemento, trombospondina-1, trombospondina-2, piruvato quinase M1/M2 e bioquimicamente validado uma clivagem de MMP-2 conhecida de peptidil-prolil cis-trans isomerase A. No entanto, um dos fatores limitantes é que o estudo dos substratos da MMPs ainda é algo novo e desafiador.

Levando-se em consideração a literatura citada, realizamos o mapeamento posicional dos peptídeos deste trabalho verificando a predominância de alanina na posição P1', arginina na posição P1 e leucina de P5-P5'. No entanto a literatura mostra a predominância de leucina em posição P1' (40%), alanina (14%) e glicina (12%) em P1, alanina (19%), glicina (12%) e serina (14%) em P2, prolina (21%) em posições P3 e alanina (16%), glicina (14%) e serina (15%) nas posições P3' (auf dem Keller et L., 2010).

Através destas informações podemos gerar novas hipóteses com mais precisão sobre os substratos das MMP-2 e apresentar novos dados, que já vem sendo observadas em outras literaturas mesmo que de forma indireta. Ademais, estudos

futuros podem levar em consideração esta análise e aprofundá-la na medida do possível buscando compreender o papel biológico destes candidatos a substratos da MMP-2 e sua ampla especificidade.

Conclusão

6 Conclusão

A proteômica vem nos mostrando novos caminhos para a ciência. Neste trabalho conseguimos, com auxílio de softwares e banco de dados, mapear 26 proteínas que poderiam ser candidatas ao substrato de MMP-2, além disso, por meio da análise via GO e KEGG dos 26 substratos potenciais revelaram uma superrepresentação de processos associados ao metabolismo celular e três peptídeos foram aumentados após o tratamento com MMP-2 em relação ao grupo controle. Este estudo tem o potencial de fornecer novas direções para o estudo dos substratos, por meio dos candidatos encontrados neste estudo e dos mecanismos subjacentes a várias doenças cardiovasculares.

Bibliografia

Bibliografia

AHRENS, C.H. et al. **Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry.** Nat Rev Mol Cell Biol. 11(11):789-801, 2010.

ANTONIO, R.C. et al. **Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR.** Mol. Cell. Biochem. 386:99–105, 2014.

ANDREOLLO, N. A. et al. **Rat's age versus human's age: what is the relationship?** Arq Bras Cir Dig. 25(1):49-51, 2012.

ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. **Achievements and perspectives of top-down proteomics.** Proteomics. 10(20):3566-76, 2010.

ASLAM, B. et al. **Proteomics: Technologies and Their Applications.** Journal of Chromatographic Science. 55(2) 182–196, 2017.

AUF DEM KELLER, U. et al. **A statistics-based platform for quantitative N-terminome analysis and identification of protease cleavage products.** Mol Cell Proteomics. 9(5):912-27, Maio, 2010.

BANTSCHIEFF, M. et al. **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review.** Anal. Bioanal. Chem. 389, 1017–1031, 2007.

BARTOLD, P. M.; Narayanan, A.S. **Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues.** Periodontol. 40:29-49, 2000.

BERGMAN, M. R. et al. **Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction.** American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 292, H1847-1860, 2007.

BOUMIZA, S. et al. **MMPs and TIMPs levels are correlated with anthropometric parameters, blood pressure, and endothelial function in obesity.** Sci Rep. Oct 8;11(1):20052, Out 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2012

CASTRO, M. M. et al. **Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats.** Atherosclerosis. 198, 320-331, 2008.

CASTRO, M. M. et al. **Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling.** Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology 29, 194-201, 2010.

CERON, C. S. et al. **Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension.** British journal of pharmacology 160, 77-87, 2010.

COLANGELO, C.; WILLIAMS, K.R. **Isotope Coded Affinity Tag for Protein Quantification in Methods in Molecular Biology: New and Emerging Proteomics Techniques.** Humana Press, 328 (10):151-158, 2006.

COSKUN, O. **Separation techniques: Chromatography.** North Clin Istanbul. 11;3(2):156-160, Nov 2016.

COX, J; MANN, M. **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.** Nat Biotechnol. 26(12):1367-72, 2008.

COX, J. et al. **Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment.** J Proteome Res. 10(4):1794-805, 2011.

D AVILA-MESQUITA, C. et al. **MMP-2 and MMP-9 levels in plasma are altered and associated with mortality in COVID-19 patients.** Biomed Pharmacother. 142:112067, Out 2021.

DAHI, S. et al. **Transgenic expression of matrix metalloproteinase-2 induces coronary artery ectasia.** Int. J. Exp. Pathol. 92, 50-56, 2011.

DARIE-ION, L. et al. **Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research.** Molecules. 21;27(19):6196, Set 2022.

DEAN, R.A.; OVERALL, C. M. **Proteomics discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQ labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome.** Mol Cell Proteomics. 6(4):611-23, Abr 2007.

DOUCET, A. et al. **Identification of proteolytic products and natural protein N-termini by Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates (TAILS).** Methods Mol Biol. 753:273-87, 2011.

DRUMOND-SANTANA, T. et al. **Impact of periodontal disease on quality of life for dentate diabetics.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 23(3):637-644, mar, 2007.

ECKHARD, U. et al. **Positional proteomics in the era of the human proteome project on the doorstep of precision medicine.** Biochimie. 122:110-8, Mar 2016.

FAVERI, M. et al. **Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis.** Oral Microbiol Immunol. 23(2):112-118, 2008.

FORTELNY, N. et al. **Proteome TopFIND 3.0 with TopFINDER and PathFINDER: database and analysis tools for the association of protein termini to pre- and post-translational events.** *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D290-7, 2015.

Global Burden of Disease Collaborative Network. **Causes of Death Collaborators Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.** *Lancet.* 2018;392:1736–1788.

GE, S.X. et al. **ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants.** *Bioinformatics.* 36(8):2628-9, 2020.

Global Burden of Disease Collaborative Network. **Seattle: Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME); 2020.** *Global Burden of Disease Study 2019.*

GONG, W. et al. **Trimetazidine suppresses oxidative stress, inhibits MMP-2 and MMP-9 expression, and prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction.** *Cardiovasc. Ther.* 36:e12460, 2018.

GROPENGIESSER, J. et al. **The relative influence of phosphorylation and methylation on responsiveness of peptides to MALDI and ESI mass spectrometry.** *J Mass Spectrom.* 44(5):821-31, Maio 2009.

GROSS, J; LAPIERE, C M. **Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 48, n. 6, p. 1014–22, 15 Jun 1962.

GUIMARAES, D. et al. **Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension.** *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108, 318-325, 2011.

HAACK, A.M., OVERALL, C.M., KELLER, U.A.D. **Degradomics technologies in matrisome exploration.** *Matrix Biol.* 21:S0945-053X(22)00125-1, Out 2022.

HAO, L. et al. (2006) **Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 819-825

HARDY, E. HARDY-SOSA, A., FERNANDEZ-PATRON, C. **MMP-2: is too low as bad as too high in the cardiovascular system?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1;315(5):H1332-H1340, Nov 2018.

HUGHES, B.G. et al. **MMP-2 is localized to the mitochondria-associated membrane of the heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1;306(5):H764-70, Mar 2014.

HUGHES, B.G.; SCHULZ, R. **Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury.** Basic Res Cardiol. 109(4):424, 2014.

KAMMA, J.J. et al. **Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients.** Oral Microbiol Immunol.19(5):314-321, 2004.

SHIMOKAWA, K. et al. **Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma.** Molecular Human Reproduction. 8(1); 32–36, 2002

KLEIFELD, O. et al. **Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates.** Nat Protoc. 6(10):1578-611, 2011.

KNOCHENMUSS, R.; ZENOBI, R. **MALDI ionization: the role of in-plume processes.** Chemical Reviews, Washington. 103(2) 441-452, Feb 2003.

KUZUYA, M. et al. (2006) **Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26, 1120-1125, 2006.

Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. Cells. 2020 Apr 26;9(5):1076. doi: 10.3390/cells9051076. PMID: 32357580; PMCID: PMC7290392.

LIU, J.; KHALIL, R.A. **Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders.** Prog Mol Biol Transl Sci. 148:355-420, Maio 2017.

MADZHAROVA, E. et al. **Post-Translational Modification-Dependent Activity of Matrix Metalloproteinases.** Int J Mol Sci. 24;20(12):3077, Jun 2019.

MAHIMKAR, R. et al. **Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression induces myxomatous valve degeneration: a potential model of mitral valve prolapse disease.** Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology. 18, 253-261, 2009.

MAKAROV, A. **Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis.** Analytical Chemistry, Manchester. 72(6) 1156-1162, Mar 2000.

MALLICK, P.; KUSTER, B. **Proteomics: a pragmatic perspective.** Nature Biotechnology. 28(7), 2010.

Marcaccini, A. et al. **Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy.** Clin. Chim. Acta. 409,1-2: 117-22, 2009.

MARCAL, D. et al. **Comparative study on antioxidant effects and vascular matrix metalloproteinase-2 downregulation by dihydropyridines in renovascular hypertension.** *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 383:35-44, 2011.

MARTINEZ, M. L. et al. (2008) **Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats.** *European journal of pharmacology.* 591:224-230, 2008.

MASKOS, K.; BODE, W. **Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases.** *Mol Biotechnol.* 25(3):241-66, Nov 2003.

MATA, K.M. et al. **Interference of doxycycline pretreatment in a model of abdominal aortic aneurysms.** *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 24:110–120, 2015.

MATSUSAKA, H. et al. **Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload.** *Hypertension.* 47(4):711-717, 2006.

MENDES, A.S. et al. **Verapamil decreases calpain-1 and matrix metalloproteinase-2 activities and improves hypertension-induced hypertrophic cardiac remodeling in rats.** *Life Sci.* 244:117153, 2020.

MESCHIARI, C. A. et al. **Salivary MMPs, TIMPs, and MPO levels in periodontal disease patients and controls.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 421:140-6, 2013.

MURPHY, G.; Nagase, H. **Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment.** *Febs Journal*, v. 278, n. 1, p. 2-15, 2011.

NAGASE H., VISSE R., MURPHY G. **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.** *Cardiovasc. Res.* 69 :562-573, 2006.

NAZIR, M. A. **Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention.** *Int J Health Sci (Qassim).* 11(2):72-80, 2017.

NOWAKOWSKI, A.B., WOBIG, W.J, PETERING, D.H. **Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions.** *Metallomics.* 6(5):1068-78, Maio 2014.

OLEJARZ, W., ŁACHETA, D., KUBIAK-TOMASZEWSKA, G. **Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability.** *Int J Mol Sci.* 31;21(11):3946, Maio 2020.

ONG, S.E. et al. **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics.* 1(5):376-86, Maio 2002.

OVERALL, C. M. **Can proteomics fill the gap between genomics and phenotypes?** J. Proteomics. 100:1-2, Abr 2014.

PARENTE, J.M. et al. **MMP inhibition attenuates hypertensive eccentric cardiac hypertrophy and dysfunction by preserving troponin I and dystrophin.** Biochem. Pharmacol. 193:114744, 2021.

PAULO, J. A. et al. **Mass spectrometry-based proteomics for translational research: a technical overview.** Yale J Biol Med. 85(1) 59-73, Mar 2012.

PARKER, C.E. et al. **Mass Spectrometry for Proteomics.** In: Alzate O, ed. *Neuroproteomics*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010.

PEREZ-RIVEROL, Y. et al. **The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data.** Nucleic Acids Res. 47(D1):D442-D50, 2019.

PRADO, A.F. **Localização in vivo e efeitos cardiovasculares após exposição por 4 semanas a metaloproteinase da matriz 2 fusionada com a proteína verde fluorescente em camundongos saudáveis e ateroscleróticos.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

PRADO, A.F. et al. **Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction.** Redox Biol. 18:181-190, 2018.

PRUDOVA A. et al. **TAILS N-Terminomics and Proteomics Show Protein Degradation Dominates over Proteolytic Processing by Cathepsins in Pancreatic Tumors.** Cell Rep. 16(6):1762-73, 2016.

PRUDOVA, A. et al. **Multiplex N-terminome Analysis of MMP-2 and MMP-9 Substrate Degradomes by iTRAQ-TAILS Quantitative Proteomics.** Mol. Cell. Proteom. 9: 894 - 911, 2010.

RIZZI, E. et al. **Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension.** J. Card. Fail. 16, 599-608, 2010.

SARASWAT, M. et al. **Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends.** Biomed Res Int. 2013:312709, 2013.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. **On the size of the active site in proteases. I. Papain.** Biochem Biophys Res Commun. 20;27(2):157-62, Abr 1967

SCHEY, G.L. et al. **MALDI-MS Analysis of Peptide Libraries Expands the Scope of Substrates for Farnesyltransferase.** Int J Mol Sci. 7;22(21):12042, Nov 2021.

SKRZYPIEC-SPRING, M. et al. **Matrix Metalloproteinase-2 Inhibition in Acute Ischemia-Reperfusion Heart Injury-Cardioprotective Properties of Carvedilol.** *Pharmaceuticals*. 14:1276, 2021.

SRINIVAS, P.R. **Introduction to protein electrophoresis.** *Methods Mol Biol*. 869:23-8, 2012.

STAES, A. et al. **Improved recovery of proteome-informative, protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC).** *Proteomics*. 8(7):1362-70, Abr 2008.

STEFFANS, J.P.; MARCANTONIO, R.A.C. **Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares: guia Prático e Pontos-Chave.** *Rev Odontol UNESP*, 47(4): 189-197, 2018.

SUN, M.J. et al. **Changes in mitochondrial DNA copy number and extracellular matrix (ECM) proteins in the uterosacral ligaments of premenopausal women with pelvic organ prolapse.** *Taiwan J Obstet Gynecol*. 55(1):9-15, 2016.

TESSONE, A. et al. **Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction.** *Cardiovasc. Drugs Ther*. 19:383–390, 2005.

VALLEDOR, L, JORRIN, J. **Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses.** *J Proteomics*. 74(1):1-18, 2011.

WANG, X., KHALIL, R.A. **Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease.** *Adv Pharmacol*. 81:241-330, 2018.

WANG, G. Y.et al. **Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression directly induces impaired contractility.** *Cardiovasc. Res*. 69, 688-696, 2006.

XU, P.; Derynck, R. **Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation.** *Molecular cell*. 37, 551-566, 2010.

ZELANIS, A. et al. **Deep Profiling of the Cleavage Specificity and Human Substrates of Snake Venom Metalloprotease HF3 by Proteomic Identification of Cleavage Site Specificity (PICS) Using Proteome Derived Peptide Libraries and Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates (TAILS) N-Terminomics.** *J Proteome Res*. 18(9):3419-28, 2019.

ZHANG, X. et al. **Identification of mammalian cell lines using MALDI-TOF and LC-ESI-MS/MS mass spectrometry.** *J Am Soc Mass Spectrom*. 17(4):490-499, Abr 2006.

ZHOU, H. Z. et al. **Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction.** *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 358, 189-195, 2007.

Anexos

Anexos

Quadro 1 - Candidatos a substrato modulados após tratamento com MMP-2 usando a estratégia de corte.

Sequência de Entrada	N-terminal	Nomes das Proteínas	Proteínas	Quantificação controle (L)	Quantificação MMP2 (H)	Neo N-terminal
AASEPVSIVNFS VAERTQR	Neo N-terminal	<i>Bardet-Biedl syndrome 2 protein homolog</i>	Q9CWF6	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
AAVADVVDISNID R	Neo N-terminal	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	Q6P8J7		X	Aumentou após o tratamento com MMP-2
AIAELGIYPAVDP LDSTSR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

AVFPSIVGRPR	Neo N-terminal	<i>Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed;Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle;Actin, alpha skeletal muscle</i>	P63260;P60710;G3UYG0;E9Q606;B1ATY1;D3Z2K3;A0A494B9T3;D3YZY0;E9Q5F4;G3UZ07;E9Q1F2;P68033;A0A1D5RM20;P63268;P62737;P68134;F6WX90;E9Q2D1	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
DAGMQLQGYR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	P05202	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
DLEEATLQHEAT AAALR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7;Myosin-4;Myosin-8</i>	Q02566;Q91Z83;Q5SX39;P13542	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
ESLSGQAAARPL VATVGLNVPASV R	Neo N-terminal	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;Cytochrome b-c1 complex subunit 11</i>	Q9CR68	X	X	Aumentou após o tratamento com MMP-2

FLGDEETVR	Neo N-terminal	<i>Phosphoglycerate mutase 1;Phosphoglycerate mutase 2</i>	Q9DBJ1;O70250	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
FTQAGSEVSALLGR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
FVTVQTISGTGALR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	P05202	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2
GANSSSGNPLVYLDVGADGQPLGR	Neo N-terminal	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial</i>	Q99KR7	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
GANSSSGNPLVYLDVGADGQPLGR	Neo N-terminal	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial</i>	Q99KR7	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2

GAPAYNPTGPQV TPLAR	Neo N-terminal	<i>LIM domain-binding protein 3</i>	Q9JKS4-3;Q9JKS4;E9PYJ9;Q9JKS4-4;Q9JKS4-2	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
IAATILTSPDLR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	P05202	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2
IEEEEELEAER	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
IKELTYQTEEDKK NLMR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6</i>	Q02566;A0A2I3BPY4	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
ILGADTSVDLEET GR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;ATP synthase subunit alpha</i>	Q03265;D3Z6F5;D6RJ16	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

ILNPAAIPEGQFID SR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
IMDPNIVGNEHY DVAR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
IMEGPAFNFLDA PAVR	Neo N-terminal	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial</i>	Q9D051	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
IMNVIGEPIDER	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
LAAAFVSR	Neo N-terminal	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial;3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	Q99JY0;D3YXU1	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

LGYILTCPSNLGT GLR	Neo N-terminal	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial; Creatine kinase U-type, mitochondrial</i>	Q6P8J7;P30275	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
LNELEVENQNL	Neo N-terminal	<i>Pleckstrin homology domain-containing family H member 2</i>	Q8C115-2;Q8C115-3;Q8C115	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
LQNEIEDLMVDV ER	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
LTLYDIAHTPGVA ADLSHIETR	Neo N-terminal	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	P08249;A0A0G2JGY4;A0A0G2JF23	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
LVLEVAQHLGES TVR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

LVLGDNSLAIR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	P05201;F7ALS6	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
MEQDEYALR	Neo N-terminal	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial;3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	Q99JY0;D3YXU1	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
NNLLQAELEELR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
NNLLQAELEELR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
NVAITALEGLKGD LAGR	Neo N-terminal	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	Q6P8J7	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2

NVETMNYADIER	Neo N-terminal	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Q9D2G2;Q9D2G2-2	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2
QYNNPIGLYSAE TLR	Neo N-terminal	<i>LIM domain-binding protein 3</i>	Q9JKS4-3;Q9JKS4;Q9JKS4-5	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
RNNLLQAELEEL R	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
RNNLLQAELEEL R	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Q02566;Q91Z83	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
SISKAMVENGGL VTGNPLGI	Neo N-terminal	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	P50544;B1AR28	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2

SLNDFTTQR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6</i>	Q02566	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
SVNVDQVRMRN EDRMR	Neo N-terminal	<i>Centrosome and spindle pole associated protein 1</i>	B2RX88-2;B2RX88-4;B2RX88	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
TDESQPWVLPVVR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	P05201;F7ALS6	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
TIAMDGTEGLVR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
TLEDQANEYR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6</i>	Q02566	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

TRPTVAAGAVGL AQR	Neo N-terminal	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	P45952	X		Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VALTGLTVAEYF R	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	P56480	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VGGVQSLGGTG ALR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	P05201;F7ALS6	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VGLIGSCTNSSY EDMGR	Neo N-terminal	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	Q99KI0	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VGVPTETGALTL NR	Neo N-terminal	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	Q8BWT1	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

VIQYFASIAAIGD R	Neo N-terminal	<i>Myosin-6</i>	Q02566	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VISLSGEHSIIGR	Neo N-terminal	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	P08228	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VLIAAHGNSLR	Neo N-terminal	<i>Phosphoglycerate mutase 1;Phosphoglycerate mutase 2</i>	Q9DBJ1;O70250	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VLSIGDGIAR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;ATP synthase subunit alpha</i>	Q03265;D3Z6F5	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VTFVDTPGIIENR	Neo N-terminal	<i>Sarcalumenin</i>	Q7TQ48-2;Q7TQ48	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

VTGAPVPAVSEP QDGDDFQSR	Neo N-terminal	<i>28S ribosomal protein S2, mitochondrial</i>	Q924T2		X	Aumentou após o tratamento com MMP-2
VVDALGNAIDGK GPIGSKTR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial; ATP synthase subunit alpha</i>	Q03265;D3Z6F5	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
VVLPMELPIR	Neo N-terminal	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	P00405	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2
WVVIGDENYGEG SSR	Neo N-terminal	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	Q99K10	X	X	Diminuiu após o tratamento com MMP-2

Quadro 2 - Candidatos a substrato modulados após tratamento com MMP-2 usando a estratégia estatística.

Sequência de Entrada	N-terminal	Nome das Proteínas	Nome Gene Exclusivo	Gene	Quantificação Controle (L)	Quantificação MMP-2 (H)	Log2 fold change (MMP-2/controle)	Teste t de Student (p-value)
VGLIGSCTNSSYEDMGR	Neo N-terminal	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	Aco2	Aco2	X	X	-3,258	0,001
ILGADTSVDLEETGR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial; ATP synthase subunit alpha</i>	Atp5a1	Atp5a1	X	X	-2,614	0,003
LTLYDIAHTPGVAADLSHIETR	Neo N-terminal	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Mdh2	Mdh2	X	X	-4,063	0,003
TLEDQANEYR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6</i>	Myh6	Myh6	X	X	-4,087	0,004
EEIIPVAPEYDKSGEYPFPLIKR	Neo N-terminal	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	Acadm	Acadm	X	X	-2,497	0,005

YRILNPAAIPEGQFIDSR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Myh6	Myh6;Myh7	X	X	-1,736	0,008
TGAIVDVPVGEELLGR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;ATP synthase subunit alpha</i>	Atp5a1	Atp5a1	X	X	-3,072	0,009
IEELEEELEAER	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Myh6	Myh6;Myh7	X	X	-3,554	0,011
VASGQALAAFCLTEPS SGSDVASIR	Neo N-terminal	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	Acadvl	Acadvl	X	X	-1,338	0,014
VAPAPAGVFTDIPISNIR	Neo N-terminal	<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Dlat	Dlat	X	X	-2,700	0,014
ILNPAAIPEGQFIDSR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Myh6	Myh6;Myh7	X	X	-3,949	0,016

MVDSLQTSLEAETR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Myh6	Myh6;Myh7	X	X	-2,451	0,020
AVFPSIVGRPR	Neo N-terminal	<i>Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed;Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle;Actin, alpha skeletal muscle</i>	Actg1	Actg1;Actb;Actg2;Actc1;Acta2;Acta1	X	X	-5,225	0,024
MVDSLQTSLEAETR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Myh6	Myh6;Myh7	X	X	-2,423	0,031
ELVDGKLILTLTHGSV VSTR	Neo N-terminal	<i>Fatty acid-binding protein, heart</i>	Fabp3	Fabp3	X	X	-3,188	0,032
AAVPSGASTGIYEAL LR	Neo N-terminal	<i>Beta-enolase;Enolase;Gamma-enolase;Alpha-enolase</i>	Eno3	Eno3;Eno2;Eno1	X	X	-2,194	0,040

IMDPNIVGNEHYDVAR	Neo N-terminal	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	Atp5b	Atp5b	X	X	-3,689	0,047
NNLLQAELEELR	Neo N-terminal	<i>Myosin-6;Myosin-7</i>	Myh6	Myh6;Myh7	X	X	-2,858	0,048
FVTVQTISGTGALR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	Got2	Got2	X		NaN	NaN
IAATILTSPDLR	Neo N-terminal	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	Got2	Got2	X		NaN	NaN
TRPTVAAGAVGLAQR	Neo N-terminal	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	Acadm	Acadm	X		NaN	NaN
SISKAMVENGGGLVTGN PLGI	Neo N-terminal	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	Acadvl	Acadvl	X		NaN	NaN
NVAITALEGLKGDLAG R	Neo N-terminal	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	Ckmt2	Ckmt2	X		NaN	NaN

GANSSSGNPLVYLDV GADGQPLGR	Neo N-terminal	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial</i>	Ppif	Ppif	X		NaN	NaN
NVETMNYADIER	Neo N-terminal	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Dlst	Dlst	X		NaN	NaN
AAVADVVDISNIDR	Neo N-terminal	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	Ckmt2	Ckmt2		X	NaN	NaN
VTGAPVPAVSEPQDG DDFQSR	Neo N-terminal	<i>28S ribosomal protein S2, mitochondrial</i>	Mrps2	Mrps2		X	NaN	NaN

Quadro 3 - Os 10 principais processos biológicos GO e vias KEGG enriquecidas para os candidatos a substrato listados no Quadro 2.

Enriquecimento FDR	n. Genes	Via Genética	<i>Fold Enrichment</i>	Vias	URL	Genes
Processo biológico GO						
3,56004E-09	9	446	27,60159753	<i>Generation of precursor metabolites and energy</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0006091	Dlat Dlst Mdh2 Ppif Aco2 Atp5b Atp5a1 Eno3 Acadm
3,56418E-09	7	171	55,99232456	<i>Aerobic respiration</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0009060	Dlat Dlst Mdh2 Ppif Aco2 Atp5b Atp5a1
3,56418E-09	8	300	36,475	<i>Energy derivation by oxidation of organic compounds</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0015980	Dlat Dlst Mdh2 Ppif Aco2 Atp5b Atp5a1 Acadm

1,3408E-08	7	215	44,53343023	<i>Cellular respiration</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045333	Dlat Dlst Mdh2 Ppif Aco2 Atp5b Atp5a1
2,34742E-07	11	1703	8,834960364	<i>Small molecule metabolic proc.</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0044281	Dlat Dlst Acadvl Mdh2 Aco2 Atp5b Atp5a1 Fabp3 Got2 Eno3 Acadm
2,69898E-07	9	893	13,78534434	<i>Carboxylic acid metabolic proc.</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0019752	Dlat Dlst Acadvl Mdh2 Aco2 Fabp3 Got2 Eno3 Acadm
2,69898E-07	9	905	13,60255525	<i>Oxoacid metabolic proc.</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043436	Dlat Dlst Acadvl Mdh2 Aco2 Fabp3 Got2 Eno3 Acadm
4,15225E-07	4	31	176,4919355	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0006099	Dlat Dlst Mdh2 Aco2

5,7477E-05	5	261	26,2033046	<i>ATP metabolic proc.</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0046034	Ppif Atp5b Atp5a1 Myh6 Eno3
8,54466E-05	7	890	10,75807584	<i>Organophosphate metabolic proc.</i>	http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0019637	Dlat Dlst Ckmt2 Atp5b Atp5a1 Fabb3 Eno3
Vias KEGG						
1,22895E-08	6	120	68,390625	<i>Carbon metabolism</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu01200	Dlat Dlst Mdh2 Aco2 Got2 Eno3
3,14029E-08	11	1597	9,421376018	<i>Metabolic pathways</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu01100	Dlat Dlst Acadvl Mdh2 Ckmt2 Aco2 Atp5b Atp5a1 Got2 Eno3 Acadm

3,50575E-05	3	32	128,2324219	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu00020	Dlat Mdh2 Aco2
0,000395095	3	78	52,60817308	<i>Biosynthesis of amino acids</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu01230	Aco2 Got2 Eno3
0,001266083	2	20	136,78125	<i>2-Oxocarboxylic acid metabolism</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu01210	Aco2 Got2
0,002570059	2	31	88,24596774	<i>Glyoxylate and dicarboxylate metabolism</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu00630	Mdh2 Aco2
0,00363175	2	52	52,60817308	<i>Fatty acid degradation</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu00071	Acadvl Acadm

0,00363175	2	52	52,60817308	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu00270	Mdh2 Got2
0,00363175	2	44	62,17329545	<i>Pyruvate metabolism</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu00620	Dlat Mdh2
0,00363175	3	228	17,99753289	<i>Thermogenesis</i>	http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu04714	Atp5b Atp5a1 Actg1

Apêndices

Apêndices

Tabelas com os dados analíticos utilizados para elaboração deste trabalho:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/13XUyoH6XOmhTvAf8Y_ano34eVNk7Jlm2/edit?usp=sharing&oid=114687488263405641938&rtpof=true&sd=true