



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Raquel Gomes Siqueira

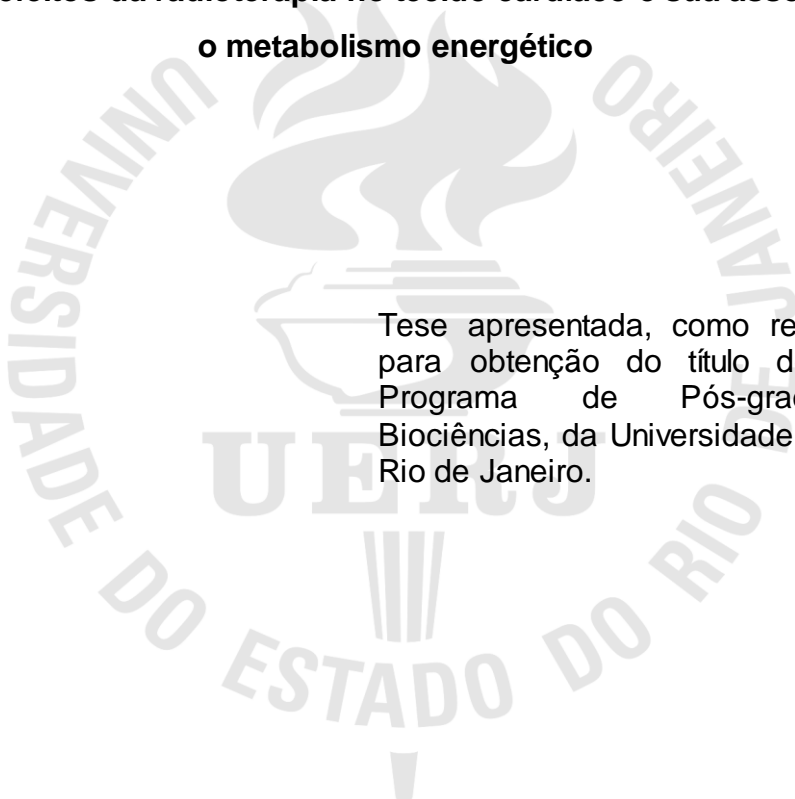
**Estudo dos efeitos da radioterapia no tecido cardíaco e sua
associação com o metabolismo energético**

Rio de Janeiro

2013

Raquel Gomes Siqueira

**Estudo dos efeitos da radioterapia no tecido cardíaco e sua associação com
o metabolismo energético**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S618 Siqueira, Raquel Gomes.
Estudo dos efeitos da radioterapia no tecido cardíaco e sua
associação com o metabolismo energético / Raquel Gomes Siqueira. –
2013
115 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Veloso de Almeida.
Coorientadora: Dayse Aparecida da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Biotecnologia.

1. Radioterapia - Teses. 2. Neoplasias torácicas. 3. Efeitos da
radiação. 4. Lesões por radiação. 5. Cardiopatias - Radioterapia. 6.
Proteoma. 7 Metabolismo energético. I. Almeida, Carlos Eduardo
Veloso de. II. Silva, Dayse Aparecida da. III. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV.
Título.

CDU 618.19-006.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Raquel Gomes Siqueira

Estudo dos efeitos da radioterapia no tecido cardíaco e sua associação com o metabolismo energético

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de outubro de 2013.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Luiz Mencialha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Edson Ramos de Andrade
Instituto Militar de Engenharia

Prof.^a Dra. Suzana Côrte-Real Faria
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese à minha filhinha Maitê, que deu um sentido especial a minha existência e me tem proporcionado grandes momentos de alegria!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as bênçãos concedidas e por ser meu refúgio nos momentos difíceis.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e esforço despendido para me educar e oferecer as condições necessárias para que eu estudasse.

À minha filha Maitê, que chegou em meio a elaboração da tese e me ensinou o significado de ser mãe e amar incondicionalmente.

Ao meu esposo Albert Salles, companheiro de todas as horas, pelo amor, incentivo e ajuda com os animais experimentais.

Ao meu irmão, por trazer alegria e descontração.

Aos meus orientadores Prof. Carlos Eduardo Veloso de Almeida e Prof^ª. Dayse Aparecida da Silva pela oportunidade, apoio, sugestões e conhecimentos transmitidos em todas as etapas deste trabalho.

A Prof^ª. Leila M.L. Bezerra pela oportunidade, confiança e suporte necessários a conclusão desta tese.

À Dra. Nathália Curty e a Dra. Paula Kubtschek pelos conhecimentos transmitidos, fundamentais para a conclusão deste trabalho, e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos professores Erika Côrtez e Marcel Cunha pela grande colaboração.

À Prof^ª. Samara Ferreira pelo auxílio teórico e por ser sempre tão solícita e atenciosa.

À toda equipe do Laboratório de Micologia Celular e Proteômica pelo acolhimento, conhecimentos transmitidos e por todos os bons momentos de conversas e risos. Em especial: Ivy Ortega, Emmyli Dias, Gabriela Neves, Glenda Sanches, Rafaela Alves, Jéssica Flaneto e João Paulo Gonçalves, Jorge Cardoso e Diego Gomes.

A todos do Laboratório de Diagnósticos por DNA e do Laboratório de Ciências Radiológicas pelo apoio técnico e amizade. Em especial: Rose Maria Hermida, por compartilhar os momentos de maternidade, Camila Salata e Cherley Borba pela grande ajuda e amizade.

A persistência é o menor caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

SIQUEIRA, Raquel Gomes. **Estudo dos efeitos da radioterapia no tecido cardíaco e sua associação com o metabolismo energético**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Durante o tratamento radioterápico para tumores localizados na região torácica, parte do coração frequentemente é incluída no campo de tratamento e pode receber doses de radiação ionizante, significativas em relação à terapêutica. A irradiação do coração é capaz de causar importantes complicações cardíacas ao paciente, caracterizadas por alterações funcionais progressivas cerca de 10 a 20 anos após a exposição do órgão. Devido ao seu alto grau de contração e grande consumo energético, o tecido cardíaco é altamente dependente do metabolismo oxidativo que ocorre nas mitocôndrias. Danos as estas organelas podem levar ao decréscimo da produção de energia, tendo um impacto direto sobre a performance cardíaca. Ainda, ao interagir com as células, a radiação ionizante pode gerar uma série de eventos bioquímicos que conduzem a uma resposta celular complexa, em que muitas proteínas parecem estar envolvidas. Tendo em vista tais conhecimentos, o objetivo do estudo foi avaliar o aspecto ultraestrutural do tecido cardíaco, a bioenergética mitocondrial e a expressão diferencial de proteínas após irradiação. Os ensaios foram realizados em amostras de tecido cardíaco de ratos Wistar irradiados com dose única de 20 Gy direcionada ao coração. As análises tiveram início 4 e 32 semanas após irradiação. A análise ultraestrutural foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão. A respiração mitocondrial foi mensurada em oxígrafo, a partir das taxas de consumo de oxigênio pelas fibras cardíacas. A identificação de proteínas diferencialmente expressas foi investigada através de duas técnicas proteômicas: 2D-DIGE (*2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*) e uma abordagem *label-free* seguida de espectrometria de massas. Os resultados mostraram que os efeitos tardios da radiação incluem a degeneração das mitocôndrias e das unidades contráteis do tecido cardíaco, disfunções na cadeia respiratória mitocondrial e expressão diferencial de proteínas envolvidas no metabolismo energético de carboidratos, lipídeos e da fosfocreatina. De forma geral, o estudo mostrou que a irradiação cardíaca prejudica o processo de síntese energética, conduzindo a um déficit da taxa respiratória mitocondrial como efeito tardio. Tal evento pode culminar em disfunções mecânicas no coração, caracterizando o desenvolvimento de doenças cardíacas radioinduzidas.

Palavras-chave: Radioterapia. Doença cardíaca radioinduzida. Respiração mitocondrial. Proteoma.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Raquel Gomes. **Study of the effects of radiation therapy in cardiac tissue and its association with energy metabolism**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

During radiotherapy for tumors located at toracic region, part of the heart is often included in the treatment field and may receive a significant ionizing radiation dose comparing to the therapeutics. Heart irradiation is able to cause substantial cardiac complications to patient, characterized by functional progressive changes from 10 to 20 years after the exposure of the organ. Because of its high level of contraction and large energetic consumption, cardiac tissue is highly depending on oxidative metabolism which happens at mitochondrias. Damage to these organelles can lead to decreased energy production, having a direct impact on cardiac performance. Even when interacting with cells, ionizing radiation can generate a series of biochemical events that lead to a complex cellular response, in many proteins seem to be involved. Given this knowledge, the aim of the study was to evaluate the ultrastructural appearance of cardiac tissue, mitochondrial bioenergetics and differential expression of proteins after irradiation. The tests were performed on samples of cardiac tissue of rats irradiated with single dose of 20 Gy directed to the heart. The analysis started 4 to 32 weeks after irradiation. The ultrastructural analysis was performed by transmission electron microscopy. Mitochondrial respiration was measured in oxigraph from rates of oxygen consumption by cardiac fibers. The identification of differentially expressed proteins was investigated using two proteomic techniques: 2D-DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) and a label-free approach followed by mass spectrometry. The results showed that the late effects of radiation include degeneration of mitochondria and contractile units of cardiac tissue, dysfunction in the mitochondrial respiratory chain and differential expression of proteins involved in energy metabolism of carbohydrates, lipids and phosphocreatine. In general, the study showed that the cardiac irradiation damages the process of synthesis energy, leading to a deficit in mitochondrial respiratory rate as late effect. Such event may result in mechanical dysfunction in the heart, characterizing the development of radiation-induced heart disease.

Keywords: Radiotherapy. Radioinduced cardiac disease. Mitochondrial respiration. Proteome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito direto e efeito indireto das radiações ionizantes.....	19
Figura 2 - Esquema do sarcômero.....	30
Figura 3 - Fluxograma das etapas desenvolvidas.....	39
Figura 4 - Procedimento de irradiação dos animais.....	42
Figura 5 - Análise da área em fotomicrografias com conteúdo citoplasmático eletrólucido.....	44
Figura 6 - Fotomicrografias de amostras de tecido cardíaco controles e irradiadas.....	59
Figura 7 - Rendimento protéico antes e após a precipitação.....	66
Figura 8 - Análise qualitativa de proteínas na etapa de padronização.....	67
Figura 9 - Eletroforese 2D da etapa de padronização.....	71
Figura 10 - Padronização da focalização isoeétrica.....	73
Figura 11 - Eletroforese 2D do sistema DIGE com 4 réplicas biológicas.....	74
Figura 12 - Rede de interação entre proteínas diferencialmente expressas.....	81
Figura 13 - Diagrama representativo da membrana celular, citoplasma e mitocôndria, ilustrando a atuação das proteínas diferencialmente expressas.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise quantitativa da área em fotomicrografia com conteúdo citoplasmático eletrólucido.....	61
Gráfico 2 -	Gráficos originais típicos do oxígrafo dos grupos controle e irradiado.....	62
Gráfico 3 -	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas de animais controles e irradiados (grupo 4 semanas).....	63
Gráfico 4 -	Razão do controle respiratório (RCR) de animais controles e irradiados (grupo 4 semanas).....	64
Gráfico 5 -	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas de animais controles e irradiados (grupo 32 semanas).....	65
Gráfico 6 -	Razão do controle respiratório (RCR) de animais controles e irradiados (grupo 32 semanas).....	65
Gráfico 7 -	Taxa de proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e irradiado de 32 semanas.....	75
Gráfico 8 -	Classificação da função molecular de proteínas diferencialmente expressas em tecido cardíaco irradiado	76
Gráfico 9 -	Localização das proteínas diferencialmente expressas em tecido cardíaco irradiado.....	77
Gráfico 10 -	Processos biológicos associados a proteínas diferencialmente expressas em resposta à RI.....	79
Gráfico 11 -	Disfunções no tecido cardíaco irradiado, associadas ao processo biológico “metabolismo energético”.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos animais, de acordo com a dose de radiação e o tempo de análise após irradiação.....	40
Tabela 2 -	Caracterização das amostras de acordo com os tampões utilizados na lise e rehidratação de proteínas.....	47
Tabela 3 -	Relação dos grupos marcados com fluoróforos.....	51
Tabela 4 -	Relação dos grupos de amostras que foram aplicados em cada gel de acordo com suas marcações.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

acetil-CoA	acetil coenzima A
ADH	álcool desidrogenase de leveduras
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
CCE	conteúdo citoplasmático eletrólítico
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato
Cont	controle
CR	cadeia respiratória
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino tetracético ($\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
IEF	focalização isoeletrica
IAA	iodoacetamida
IAEA	Agência Nacional de Energia Atômica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K-MÊS	etansulfonato
LET	Transferência Linear de Energia
MALDI	ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser
MDA	malonaldeído
Min	minuto
mtDNA	DNA mitocondrial
mRNA	RNA mensageiro
MS	espectrometria de massas
MS/MS	espectrometria de massas em tandem
p/v	peso/ volume
PBS	tampão fosfato salino
PM	peso molecular
PMF	técnica onde a proteína é identificada a partir de massas de diferentes peptídeos
pH	potencial hidrogeniônico

PSA	persulfato de amônio
PMSF	fenilmetanosulfonilfluorido
RCR	razão de controle respiratório
RI	radiação ionizante
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
seg	segundo
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
Tris	trihidroximetil aminometano
Tris-HCl	trihidroximetil aminometano- equilibrado com ácido clorídrico
w/w	peso/peso

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
cGy	centigrays
cm	centímetros
cm ³	centímetros cúbicos
CO ₂	dióxido de carbono
e ⁻	elétron
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo
Gy	Gray
H·	radical livre hidrogênio
H ⁺	íon hidrogênio positivo
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
KHCO ₃	carbonato de potássio
KHz	quilo-hertz
Kv	kilovolts
mA	microampére
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MV	megavoltagem
NaCl	cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
nm	nanômetro

nmol	nanomolar
O ₂	oxigênio molecular
OH·	radical livre hidroxila
OH ⁻	íon hidroxila
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
¹ O ₂	oxigênio singleto
pmol	picomolar
R ²	coeficiente de correlação
rpm	rotações por minuto
V	volts

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Radiações ionizantes e o uso terapêutico	18
1.2	O planejamento radioterápico e a principal desvantagem do tratamento	21
1.3	Radioterapia e complicações cardíacas	23
1.3.1	<u>Manifestações clínicas</u>	23
1.3.2	<u>Epidemiologia</u>	26
1.3.3	<u>Monitoramento das complicações cardíacas radioinduzidas</u>	28
1.4	Estrutura do coração	29
1.5	Bioenergética mitocondrial do músculo cardíaco	31
1.6	Análise proteômica e doenças cardíacas radioinduzidas	34
2	PROPOSIÇÃO	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Modelo radiobiológico	40
3.2	Simulação e planejamento	40
3.3	Irradiação	41
3.4	Obtenção das amostra de tecido cardíaco	42
3.5	Microscopia eletrônica	42
3.6	Análise da respiração mitocondrial	44
3.7	Padronização da análise proteômica	45
3.7.1	<u>Extração e dosagem de proteínas totais</u>	46
3.7.2	<u>Precipitação, rehidratação e dosagem de proteínas totais</u>	46
3.7.3	<u>Eletroforese 1D em mini gel de poliacrilamida SDS-PAGE</u>	48
3.7.4	<u>Focalização isoeétrica</u>	49
3.7.5	<u>Equilíbrio das <i>strips</i> e eletroforese bidimensional (2D)</u>	50
3.8	Análise proteômica das amostras experimentais	50
3.8.1	<u>Extração precipitação, rehidratação e dosagem de proteínas totais</u>	50
3.8.2	<u>2D-DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)</u>	51
3.8.3	<u>Eletroforese bidimensional</u>	52

3.8.4	<u>Análise dos géis</u>	53
3.8.5	<u>Análise de proteínas <i>Label-free</i> por espectrometria de massas</u>	53
3.8.5.1	Pesquisa em banco de dados e quantificação.....	55
3.8.5.2	Análise funcional das proteínas diferencialmente expressas e predição das interações proteína-proteína.....	56
4	RESULTADOS	57
4.1	Microscopia eletrônica de transmissão	57
4.2	Respiração mitocondrial 4 semanas após irradiação	61
4.3	Respiração mitocondrial 32 semanas após irradiação	65
4.4	Padronização da análise proteômica	66
4.4.1	<u>Quantificação e qualificação de proteínas, perfil de separação em eletroforese bidimensional (2D) e ajustes da focalização isoelétrica</u>	66
4.5	Análise proteômica das amostras experimentais	73
4.5.1	<u>Análise de proteínas por DIGE</u>	73
4.5.2	<u>Análise de proteínas <i>Label-free</i> por espectrometria de massas</u>	74
4.5.2.1	Interação proteína-proteína.....	79
5	DISCUSSÃO	84
	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE A - Proteínas diferencialmente expressas identificadas no tecido cardíaco 32 semanas após irradiação.....	107
	APÊNDICE B - Proteínas diferencialmente expressas em tecido cardíaco associadas ao metabolismo energético, de acordo com a base de dados <i>UniProtKB / Swiss-Prot</i>	113

INTRODUÇÃO

Durante o tratamento radioterápico para tumores localizados na região torácica, parte do coração pode estar incluída no campo de tratamento e receber uma dose de radiação ionizante significativa em relação à terapêutica. A irradiação do coração é capaz de causar importantes complicações cardíacas aos pacientes, caracterizadas por alterações funcionais progressivas, muitos anos após a exposição do órgão.

O presente estudo investigou os potenciais efeitos adversos provocados pela radioterapia sobre o tecido cardíaco, tendo em vista que este é um tema atual e relevante, onde os mecanismos da gênese e evolução das complicações cardíacas radioinduzidas ainda não estão completamente esclarecidos.

Neste trabalho foi desenvolvido um modelo animal, com ratos Wistar, para análise dos aspectos funcionais, ultraestruturais e moleculares envolvidos na cardiotoxicidade provocada pela radioterapia.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Colaborações foram realizadas com o Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento (LFND), Laboratório de Micologia Celular e Proteômica (LMCProt), ambos localizados na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e com a Plataforma de Microscopia eletrônica Rudolf Barth, do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ.

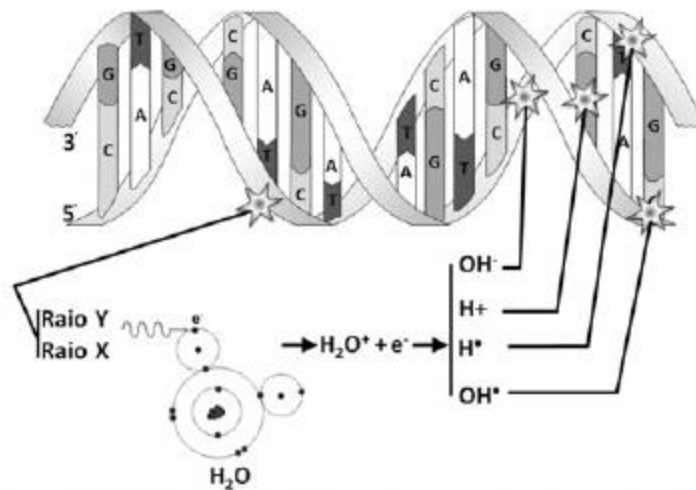
1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Radiações ionizantes e o uso terapêutico

Por definição, radiações ionizantes são aquelas capazes de excitar e ionizar os átomos do meio com o qual interage, pois possuem energia superior a energia de ligação dos elétrons de um átomo com o seu núcleo. Exemplos de radiações ionizantes são os raios-X, raios-gama (fótons), elétrons rápidos, partículas carregadas pesadas (prótons, íons), nêutrons, dentre outros.¹

A interação das radiações ionizantes com as moléculas biológicas promove a retirada de elétrons dos átomos que compõe estas moléculas, que neste caso são constituídas principalmente por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio.² Esta interação ocorre de duas formas distintas: por meio do Efeito Direto e do Efeito Indireto. No primeiro caso, a energia da radiação é transferida para as biomoléculas modificando sua estrutura. Entretanto, em muitas situações predomina o segundo evento, onde a energia é transferida para uma molécula intermediária (como a água, em cerca de 80% dos casos), cuja radiólise acarreta a formação de produtos altamente reativos, como o radical livre hidrogênio ($\text{H}\cdot$), o íon hidrogênio positivo (H^+), o radical livre hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e o íon hidroxila (OH^-) que na presença de oxigênio levam a formação de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Figura 1). Os íons, radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são metabólitos instáveis, altamente oxidantes, com capacidade de modificar a estrutura das biomoléculas, dificultando ou impedindo sua posterior regeneração.³

Figura 1 - Efeito direto e efeito indireto das radiações ionizantes.



Nota: Na lesão indireta, há deslocamento de elétron (e^-) da molécula de água (H_2O), que se torna um íon positivo (H_2O^+). O elétron reagirá com outra molécula de água formando H_2O^- , que se dissocia em íon hidroxila (OH^-) e radical livre hidrogênio (H^-). O íon positivo (H_2O^+) se dissocia em íon hidrogênio positivo (H^+) e radical livre hidroxila (OH^-). Os íons e radicais livres são altamente reativos com as estruturas celulares.

Fonte: Brenner et al.³, 2003.

Desta forma, o efeito global de um feixe de radiações ionizantes em um organismo é a soma dos efeitos diretos e indiretos, cujas importâncias relativas variam em função de diversos fatores, tais como temperatura, teor em água, oxigenação do meio, presença de outras moléculas que possam “capturar” os produtos de radiólise da água, dentre outros.⁴

A transformação de uma molécula específica (água, proteína, açúcar, DNA, RNA, etc.) pela ação das radiações leva a consequências que devem ser analisadas em função do papel biológico desempenhado pela molécula atingida,² sendo os alvos biológicos mais relevantes os lipídeos de membrana e o DNA, pois os danos causados a estas biomoléculas normalmente resultam em morte celular. A interação com lipídeos de membrana induz a formação de peróxidos lipídicos e consequente alteração das propriedades das membranas, tais como: inativação de substâncias receptoras e mudança de permeabilidade, eventos que culminam em lise celular. Ademais, a interação com o DNA pode levar a uma série de modificações na estrutura desta molécula, como alterações nas estruturas das bases nitrogenadas e das desoxirriboses, eliminação de bases, rompimento de pontes de hidrogênio entre as duas hélices, quebras simples e quebras duplas e ligações cruzadas (*cross-*

linkings) entre moléculas de DNA e proteínas.^{1;4}

A radiação ionizante (RI) tornou-se há muitos anos parte integrante da vida do homem. A radioterapia, seu emprego para fins terapêuticos, teve início menos de 60 dias após a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895, e da radioatividade natural por Antoine Henri Becquerel em 1896.⁵ A terapia com raios-X foi sugerida após a comprovação de que teriam capacidade de produzir alterações biológicas na pele, causando vermelhidão e ulcerações.⁶ Na época eram utilizadas doses elevadas que provocavam severas complicações.⁷

Com os progressos da física médica na década de 30 foi possível quantificar e estabelecer uma relação entre as doses de radiação e os efeitos biológicos possíveis de serem observados na época. Foi estabelecido então, o fracionamento da dose (dividindo a dose total em várias frações), estratégia de tratamento que causa a morte das células tumorais, permitindo, contudo, o reparo do tecido sadio.⁸

Na década de 50 foi realizado o primeiro tratamento com uma unidade de cobalto-60 e desenvolveram-se aceleradores lineares para tratamento de tecidos mais profundos, que reduziam a dispersão de radiação para os tecidos sadios adjacentes.⁸

Nas duas últimas décadas houve um considerável avanço no tratamento do câncer, tendo-se a cura real obtida em 50% dos tumores diagnosticados. É importante ressaltar que o câncer é hoje considerado um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima para o ano de 2030 aproximadamente 27 milhões de casos incidentes de câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer.⁹ Neste sentido, o tratamento radioterápico é de ampla utilização, visto que mais da metade dos pacientes são submetidos à radiação em algum momento durante o curso de tratamento da enfermidade.¹⁰

A radioterapia tem a molécula de DNA como alvo crítico, uma vez que, as células neoplásicas são mais sensíveis por apresentarem alta taxa de divisão mitótica. O tratamento também leva em conta a sensibilidade do tumor às radiações. Esta depende fundamentalmente da origem celular do tumor (etiologia), do seu grau de diferenciação, da oxigenação e da forma clínica de apresentação. A maioria dos tumores radiosensíveis são radiocuráveis. Entretanto, alguns se disseminam independentemente do controle local; outros apresentam sensibilidade tão próxima à dos tecidos normais, que esta impede a aplicação da dose de erradicação. A curabilidade local só é atingida quando a dose de radiação aplicada é letal para

todas as células tumorais, mas não ultrapassa a tolerância dos tecidos normais. A morte celular pode ocorrer então por variados mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução.¹¹

Quanto à finalidade, o tratamento radioterápico pode ser radical (ou curativo), quando se busca a cura total do tumor, como no caso de cânceres com lesões iniciais; ou paliativo, quando se busca a remissão de sintomas como dor intensa, sangramento, obstrução e compressão de órgãos.¹² Além disso, a radioterapia pode ser empregada como recurso isolado; combinada a cirurgia para o tratamento loco-regional, ou a quimioterapia e a hormonioterapia, para o tratamento sistêmico.¹¹

Concentraremos-nos em explicar principalmente a radioterapia, por ser o foco deste estudo.

1.2 O planejamento radioterápico e a principal desvantagem do tratamento

O planejamento da radioterapia é feito com a participação de profissionais das áreas médica e física. Comumente levam-se em conta: a histologia do tumor, seu tamanho e profundidade, as suas vias de disseminação, a idade e estado geral de saúde do paciente e o estágio da doença. Uma vez que todos estes parâmetros tenham sido avaliados, são definidos: o tipo de radiação (fótons ou partículas), a dose total, o esquema de fracionamento e o equipamento adequado que será utilizado para o tratamento. Entretanto, o aspecto mais importante do planejamento radioterápico é a definição, com precisão, da área a ser irradiada.⁵

Atualmente, a área irradiada é definida com o auxílio de aplicativos computacionais de imagens tridimensionais (tomografia computadorizada), que permitem a melhor visualização e avaliação do campo a ser irradiado, considerando as peculiaridades anatômicas de cada paciente.¹³

Uma vez que precisão é fundamental, a reprodutibilidade do tratamento realizada por meio de fracionamentos diários com o posicionamento correto do paciente é outro fator relevante. Para isso, o paciente geralmente é posicionado com auxílio de imobilizadores para impedir a movimentação, mesmo que discreta, durante a sessão de radioterapia.^{14;15}

Outra questão envolve a proteção de regiões e órgãos críticos; para isso são

utilizados blocos de materiais que absorvem a radiação (geralmente de chumbo), impedindo-a de atingir outras áreas do corpo do paciente.¹⁴

De acordo com a localização e o tipo de tumor, a radioterapia pode ser realizada com fontes de radiação internas ao paciente, em contato direto ou próximo ao tumor, para que o mesmo receba maior dose (braquiterapia); ou por meio de uma fonte de radiação externa, posicionada a uma distância de 80-100 cm do paciente emitindo um feixe que alcança a massa tumoral (teleterapia).¹⁶

Em radioterapia geralmente são utilizados feixes de fótons ou elétrons. O feixe de fótons costuma ser utilizado no tratamento de tumores mais profundos em relação à pele, pois a sua energia é pouco dissipada ao longo do trajeto e, portanto, alcança tecidos mais profundos. Ao contrário, o feixe de elétrons costuma ser utilizado para o tratamento de tumores mais superficiais em relação à pele, pois ocorre maior dissipação de energia logo no início do seu trajeto no tecido irradiado.⁴

O tratamento é comumente administrado em doses fracionadas, sendo realizadas em média 25 a 30 aplicações, sendo uma por dia e cinco vezes por semana. Esta distribuição da dose total ao longo de semanas permite maior tolerância do tecido sadio à irradiação.¹⁷

Com objetivo de minimizar os efeitos secundários da radioterapia, existem atualmente máquinas sofisticadas inspiradas na tomografia computadorizada que distribuem a radiação em doses menores ao redor do corpo do paciente, contudo focadas na região do tumor. Desta forma é possível emitir uma alta dosagem de radiação no tumor, suficiente para sua eliminação, e simultaneamente, minimizar a radiação nas regiões vizinhas, compostas de tecido saudável, reduzindo ao máximo as complicações nestas regiões, que são muitas vezes críticas.^{10;18}

Mesmo com a utilização de todas as ferramentas empregadas no planejamento, e dos benefícios associados à prática da radioterapia, como o aumento da taxa de sobrevivência, a principal desvantagem desse tratamento é que a radiação, além de promover a morte de células neoplásicas, também alcança os tecidos saudáveis que por ventura estejam no trajeto do feixe. As lesões provocadas pela radiação no tecido sadio, quando ocorrem, podem estar associadas à gênese de uma série de doenças.¹⁹

Conseqüentemente, a possível destruição de tecido saudável é fator limitante, considerando a ampla capacidade da utilização da radioterapia.²⁰

Os efeitos colaterais associados a radioterapia causam desconfortos aos

pacientes, que dificultam ou limitam as suas atividades normais, entretanto, não são obrigatoriamente apresentados por todas as pessoas que são submetidas ao tratamento, uma vez que, dependem da localização do tumor, da energia utilizada, da área de tecido irradiado, da dose total e do estado geral de saúde do paciente.²¹

Os efeitos colaterais comumente são classificados em imediatos e tardios. Os efeitos imediatos costumam ser caracterizados por inflamação, edema, descamação do epitélio e hemorragia. Enquanto, os efeitos tardios podem ser manifestados por fibrose, atrofia e ulceração,⁵ e normalmente surgem de 3 a 6 meses, ou anos após o tratamento.¹²

1.3 Radioterapia e complicações cardíacas

1.3.1 Manifestações clínicas

Durante o tratamento radioterápico para tumores localizados na região torácica, parte do coração pode ser incluída no campo de tratamento e receber doses de RI significativas em relação à terapêutica, capazes de causar importantes complicações cardíacas ao paciente.^{22;23}

O efeito cardiotoxico das RI pode ser potencializado caso haja associação com quimioterápicos.^{24;25} As antraciclinas, como a doxorrubicina e epirrubina, estão entre os quimioterápicos mais cardiotoxicos já desenvolvidos.²⁶

A irradiação do coração pode ocorrer durante o tratamento para linfoma de Hodgkin, câncer de mama, câncer de pulmão, timoma e câncer de esôfago.^{27;28}

Além das complicações cardíacas, alterações funcionais também são observadas nos pulmões. Estas ocorrem de forma imediata, enquanto que as alterações cardíacas geralmente são tardias.^{29;30} Pacientes irradiados costumam apresentar complicações cardíacas em um período de 5 a 30 anos após a exposição.^{23;31}

A cardiotoxicidade progressiva e de manifestação tardia é de particular importância para os pacientes jovens curados do câncer, pois geralmente sobrevivem por muitas décadas.³² No passado, esse risco era menos evidente, pois

sua expectativa de vida ao ter uma doença metastática era muito curta para evidenciar complicações cardiovasculares. Entretanto, com os progressos em relação ao diagnóstico, terapia e intervenções é comum que o paciente oncológico tenha considerável aumento na sua expectativa de vida, podendo até assumir que ele possui uma doença crônica. Assim, a cardiotoxicidade provocada pela terapia para o câncer é um importante assunto a ser estudado.³³

Neste contexto, a literatura destaca especialmente o câncer de mama, pois agrega três importantes aspectos: a alta incidência na população (no Brasil estimou-se para o biênio 2012/2013, cerca de 520.000 novos casos),³⁴ a grande indicação à radioterapia (de aproximadamente 60%),³⁵ e o crescente aumento nas taxas de sobrevida, que permitem a observação das complicações cardíacas a longo prazo³¹, sendo a sobrevida média após cinco anos de 85% em países desenvolvidos, e de 60% em países periféricos.³⁶

Pesquisas revelam que o desenvolvimento de doenças cardíacas radioinduzidas parece estar relacionado ao tamanho do tumor e o local onde se encontra, sobretudo quando este está localizado do lado esquerdo do tórax; sendo as principais áreas afetadas o pericárdio, as válvulas cardíacas, o miocárdio, o sistema de condução e a artéria coronária.³⁷

De forma geral, o ventrículo esquerdo é a região anatômica que recebe maior atenção nos estudos que tratam das manifestações cardíacas radioinduzidas, pois constitui a principal câmara contrátil do coração e a responsável pela ejeção de sangue para todo o corpo. No entanto, complicações em outras estruturas cardíacas podem ocorrer em resposta à irradiação. As manifestações clínicas variam de pericardite a falência do miocárdio.^{17;25}

A toxicidade cardíaca representa um processo multifatorial de extrema complexidade e tem relação direta com a idade do paciente, índice de massa corporal (IMC), seus hábitos de vida e fatores de risco (estar ou não na menopausa, o histórico de doenças cardiovasculares prévias ou familiares). Ainda, as complicações são diretamente associadas à dose de radiação utilizada, esquema de fracionamento e técnica empregada.³⁸

Em 2010, Stewart et al.⁴⁰ sugeriram que as alterações cardíacas decorrentes da radiação são inicialmente causadas por inflamação microvascular, que leva a adesão e transmigração de monócitos circulantes, conduzindo a microtrombose, oclusão de vasos, redução da densidade vascular, defeitos na perfusão e isquemia

focal. Estes eventos são seguidos por morte celular progressiva e desenvolvimento de fibrose. Entretanto a hipótese mais aceita sobre a causa do desenvolvimento da doença cardíaca radioinduzida é que a RI cause apoptose dos microvasos sanguíneos cardíacos, diminuindo o fluxo sanguíneo do tecido, levando a um quadro de isquemia miocárdica. Os grandes vasos coronarianos também podem ser afetados pela irradiação, porém este será um efeito tardio, e sua consequência é a aterosclerose, um espessamento da parede das artérias.⁴¹ É importante ressaltar que os efeitos secundários cardíacos da RI não são completamente explicados em termos radiobiológicos, principalmente devido ao coração apresentar estruturas com sensibilidades muito distintas à radiação.

O dano vascular causado pela radioterapia pode ser silencioso; Aproximadamente 50% dos pacientes assintomáticos desenvolvem alterações de perfusão no miocárdio. O dano ao miocárdio parece ser resultante da diminuição do fluxo sanguíneo, decorrente do dano causado na microvasculatura cardíaca, podendo levar à fibrose do tecido.⁴² Dados da necropsia de pacientes jovens tratados com irradiação torácica para linfoma de Hodgkin's, com doses superiores a 36 Gy, mostraram um aumento de fibrose no pericárdio, miocárdio e endocárdio, além de severa aterosclerose nas artérias coronarianas, no volume cardíaco irradiado.⁴³

A pericardite, principal manifestação clínica percebida após irradiação, está associada a edema, aumento da permeabilidade vascular, formação de cicatriz fibrótica e adesão do epicárdio e pericárdio. O pericárdio se torna espessado devido à substituição do tecido normal por tecido fibrótico e seus vasos sanguíneos podem apresentar fibrose perivascular.⁴⁴ A pericardite aguda desenvolve-se semanas após o tratamento, enquanto a pericardite crônica após cinco a dez anos, estando associadas à disfunção diastólica ventricular e aumento nas taxas de óbitos.⁴⁵

Aumento nas taxas de doenças isquêmicas do coração foram observados a partir de cinco anos, até três décadas após a radioterapia, em estudo realizado por Darby et al.⁴⁶, em 2013.

Quanto à função autônoma, alguns pacientes apresentam arritmias, com acentuada taquicardia. Também são descritos perda do ritmo circadiano e variabilidade na taxa respiratória do coração.¹⁷

Fibrose e calcificação são mudanças típicas das valvas cardíacas relatadas após radioterapia, frequentemente com progressão para falha cardíaca e óbito. Em

adição, podem promover a presença significativa de estenose.⁴⁷

Disfunções na sístole e diástole são parcialmente explicadas após irradiação do mediastino pelo aumento de fibrose no miocárdio, apesar da contribuição de outros fatores, tais como isquemia e doença valvular.^{48;49} Também são relatadas alterações no sistema de condução do coração após a exposição.⁴⁹

A RI aumenta o risco do desenvolvimento de aterosclerose, pois os danos endoteliais ativam a proliferação de macrófagos ativados. E sua incidência aumenta ainda mais na presença de fatores de risco cardiovasculares pré-existentes, tal como hipercolesterolemia.^{40;50}

Comumente, as artérias coronárias direita e descendente anterior esquerda são incluídas no campo de irradiação resultando na maior probabilidade de desenvolvimento de estenose nestes vasos.⁴⁸ Entretanto, vasos de todos os calibres podem ser danificados, resultando em dilatação e aumento na permeabilidade da parede. Como consequência, surgem eritema característico da radiação seguido de infiltrado celular inflamatório.³¹ Ainda, estudos experimentais têm mostrado que a radiação predispõe a formação de placa inflamatória, que quando rompida pode levar ao infarto do miocárdio.⁴⁰

1.3.2 Epidemiologia

Pesquisas realizadas em modelos animais mostram que os riscos de desenvolvimento de doenças cardíacas radioinduzidas parecem aumentar com a dose e a área irradiada. Em 2005, Stamler et al.⁵¹ relataram que altas doses de RI (>10Gy) são prejudiciais as estruturas cardíacas, resultando em injúrias microvasculares, excessiva morte celular e isquemia. Porém ainda é difícil definir com precisão a relação entre dose e complicação.^{52;53}

Outra importante constatação é que no tratamento de câncer de mama as complicações cardíacas aumentam quando o tumor encontra-se na mama esquerda, pois a dose de radiação que chega ao coração é significativamente aumentada nestes casos.²⁵

É nítido que, o uso de técnicas modernas tem reduzido de forma significativa a exposição cardíaca, minimizando os riscos de desenvolvimento de complicações

associadas à radioterapia torácica.^{38;39} Entretanto, diversos estudos afirmam que ainda há a possibilidade da radioterapia induzir doenças cardiovasculares, uma vez que, em alguns casos, o tratamento não permite a total eliminação do coração do campo de irradiação, além do fato de muitos centros de radioterapia utilizarem técnicas convencionais que não permitem avaliar com precisão a área cardíaca irradiada.^{54;55}

Os estudos epidemiológicos que analisam o impacto da radioterapia no desenvolvimento de doenças cardiovasculares esbarram em diversos obstáculos como, a impossibilidade de avaliação de riscos oferecidos pelas técnicas mais modernas, uma vez que, as alterações cardíacas são clinicamente diagnosticadas décadas após o tratamento,⁵⁶ a necessidade de um grande número de pacientes para o estudo apresentar diferenças significativas,^{52;57} além da interferência de fatores de risco específicos de cada paciente, como uso de quimioterápicos cardiotoxicos, terapia hormonal, menopausa, etnia, idade, obesidade, tabagismo, diabetes *mellitus*, hipercolesterolemia e hipertensão.^{54;58}

Mesmo diante das dificuldades apresentadas, estudos epidemiológicos são realizados e mostram, por exemplo, que a irradiação da região do mediastino está associada a um aumento de 2 a 7 vezes nos riscos para infarto do miocárdio, angina *pectoris*, falha cardíaca congestiva e desordens valvulares. Estes estudos também apontam que, aproximadamente 20-40% dos pacientes irradiados desenvolvem pericardite.^{17;59}

Em sobreviventes de linfoma de Hodgkin que receberam radioterapia, a taxa de mortalidade, decorrente de complicações cardíacas, é de aproximadamente 25%,⁴⁸ e em pacientes que receberam radioterapia para o câncer de mama, o risco de morte devido a complicações cardíacas é de cerca de 27%.¹³

Uma análise preliminar obtida no ano 2000 pelo *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group*,⁶⁰ que teve início do ano de 1998, sugeriu que a taxa de infarto do miocárdio é 2 vezes maior em pacientes com câncer na mama esquerda que são submetidas a radioterapia pós-operatória em relação àquelas que não utilizam este tratamento. No ano de 2005, outra pesquisa realizada pelo mesmo grupo confirmou esta tendência.

Em 2011, McGale et al.⁵⁵ estudaram cerca de 35.000 mulheres tratadas com radioterapia para câncer de mama na Dinamarca e Suécia entre 1976 e 2006. Estes pesquisadores relataram que a incidência de infarto agudo do miocárdio foi 1,22

vezes maior em mulheres irradiadas para tumores localizados do lado esquerdo, em relação àquelas irradiadas para tumores localizados do lado direito, este resultado foi similar para a incidência de angina (1,25 vezes), pericardite (1,61 vezes) e doença valvular (1,54 vezes). Este estudo também revelou que a incidência de doenças cardíacas foi tão alta em mulheres irradiadas a partir de 1990 quanto para aquelas irradiadas de 1976 a 1989.

Em 2004, Crestanello et al.⁶¹ observaram que 27% dos pacientes submetidos à radioterapia na região torácica necessitaram do uso de marcapasso, devido a danos causados pelo tratamento ao sistema de condução sanguínea. Outra pesquisa revela que, aproximadamente 60% dos pacientes irradiados desenvolvem a doença de valva cardíaca, que é uma importante causa de morbidade a longo prazo entre sobreviventes de Linfoma de Hodgkin.⁴⁸ Em adição, cerca de 10% dos indivíduos irradiados na região do mediastino desenvolvem doença da artéria coronária, cujo período de latência pode se prolongar até cerca de 30 anos.⁶²

Em 2003, Aleman et al.⁵⁹ estudaram a causa primária da morte de pacientes com idades inferiores a 41 anos tratados para Linfoma da Hodgkin, e encontraram aumento do risco de morte por doenças cardiovasculares e infarto do miocárdio. Tais riscos foram especialmente altos em pacientes tratados antes dos 21 anos de idade.

No ano de 2007, o grupo supracitado publicou outro estudo com pacientes irradiados para Linfoma de Hodgkin que sobreviveram pelo menos cinco anos após o tratamento. Estes indivíduos apresentaram um aumento de 3 a 5 vezes na incidência de doença valvular, infarto do miocárdio e falha cardíaca congestiva comparados à população em geral.

1.3.3 Monitoramento das complicações cardíacas radioinduzidas

A colaboração e a interação das disciplinas de Cardiologia e Oncologia têm contribuído para reduzir os efeitos adversos cardiovasculares e obter melhores resultados no tratamento do paciente com câncer.

A Sociedade Brasileira de Cardiologia e a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica propõem o monitoramento das funções cardíacas por meio da

ecocardiografia, uma técnica não invasiva, indicada para o caso do paciente irradiado apresentar alguma alteração cardíaca anterior ao início do tratamento.

O principal parâmetro avaliado é a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, pois indica importantes sinais de doença cardíaca. O *National Institutes of Health* (NIH) por meio da análise das medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, define cardiotoxicidade em: Grau I: redução assintomática da fração de ejeção do ventrículo esquerdo entre 10% e 20%; Grau II: redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo abaixo de 20% ou abaixo do normal; Grau III: insuficiência cardíaca sintomática.⁶³

A principal desvantagem da ecocardiografia é ser ineficaz na detecção precoce. O diagnóstico da cardiotoxicidade só é feito quando a lesão já está bem estabelecida, e é irreversível na maior parte das vezes.⁶³

1.4 Estrutura do coração

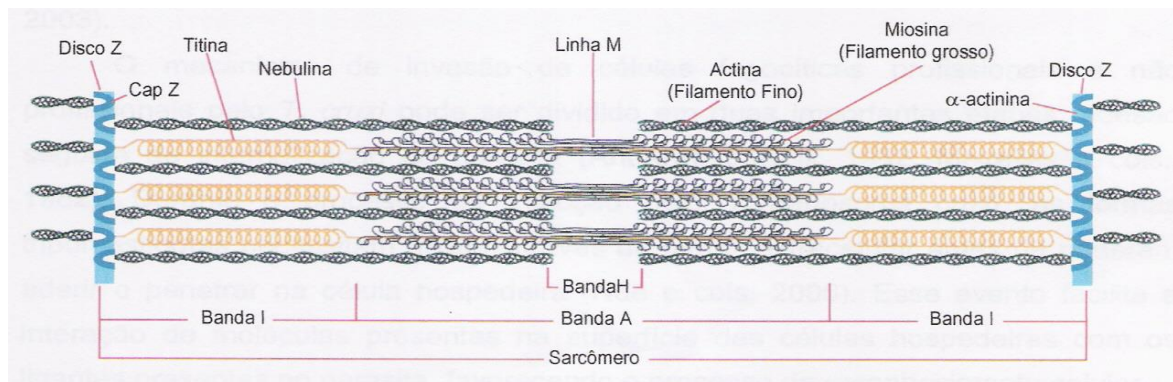
O coração é constituído por duas bombas separadas por um septo que juntas, propulsionam o sangue no sistema circulatório. Cada bomba consiste de um átrio e um ventrículo. Essas duas câmaras estão separadas pelas valvas atrioventriculares: à esquerda, denominada mitral e, à direita, tricúspide. Estas valvas atuam, direcionando o sangue dos átrios para os ventrículos e assegurando a direção do fluxo sanguíneo. Os átrios, após receberem sangue das veias pulmonares (átrio esquerdo), das veias cavas e do seio coronário (átrio direito), o repassam aos ventrículos. A partir dos ventrículos, o sangue segue em direção aos pulmões e ao restante do corpo, originando a circulação pulmonar e sistêmica respectivamente.⁶⁴

Esse órgão é formado por uma parede muscular, denominada miocárdio, que é constituído por fibras musculares, os cardiomiócitos, células alongadas e ramificadas, contendo um núcleo central. O contato entre as células é realizado por meio de junções nomeadas de discos intercalares, que atuam na estabilidade física e na comunicação elétrica e química das células adjacentes. Nos discos intercalares, encontram-se três especializações juncionais: junções aderentes, servindo para ancorar os filamentos de actina dos sarcômeros terminais; desmossomos, auxiliares na estabilização mecânica por integrarem filamentos

intermediários; e junções comunicantes (junções *Gap*), responsáveis pela difusão de íons entre as células. Dessa forma, o músculo cardíaco atua como um sincício. Quando uma célula é excitada, o potencial de ação se propaga para as demais células.⁶⁵

A fibra muscular cardíaca é constituída de miofibrilas, dispostas paralelamente entre si. Cada miofibrila é formada de unidades contráteis denominadas de sarcômeros (Figura 2). Essas unidades são complexos multiproéticos, constituídos de filamentos finos (actina e proteínas associadas como nebulina, tropomiosina e troponina) e filamentos grossos (miosina II), encontrados, parcialmente sobrepostos e delimitados por duas linhas Z, que, por sua vez, apresentam α -actinina e Cap Z como proteínas majoritárias. Os filamentos de actina e proteínas associadas constituem a banda I e a região de sobreposição de filamentos de actina e miosina II é denominada de banda A, enquanto a banda H é constituída somente de miosina II. Dividindo a banda H, existe uma região, denominada linha M. Nela, os filamentos de miosina se ligam entre si por projeções transversais. Proteínas, como a titina, possuem alto grau de elasticidade e participam da manutenção do comprimento e estabilidade dos sarcômeros, enquanto a nebulina regula o comprimento do filamento de actina no sarcômero.⁶⁶

Figura 2 - Esquema do sarcômero



Nota: Organização das proteínas que constituem a unidade contrátil do músculo esquelético – o sarcômero.

Fonte: Alberts⁶⁷ em 2004.

Quando o potencial de ação se propaga pela membrana plasmática do cardiomiócito, ele é conduzido pelos túbulos T ao retículo sarcoplasmático, onde

ocorre o fluxo de íons Ca^{2+} para o citoplasma. O Ca^{2+} , no citoplasma, se liga à troponina C, um componente do complexo troponina-tropomiosina, que muda sua conformação estrutural e permite a exposição do sítio de ligação do filamento de actina. A cabeça da miosina interage com o filamento de actina, promovendo a contração muscular (encurtamento do sarcômero). Esse fenômeno é dependente da hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP), gerador da força de contração e facilitador do movimento da cabeça da miosina pelo filamento de actina.⁶⁸

Recobrando, internamente, o miocárdio, existe o endocárdio. Constituído por um epitélio simples pavimentoso, chamado de endotélio, está apoiado sobre uma delgada camada subendotelial, de tecido conjuntivo frouxo. Externamente ao miocárdio, encontra-se o pericárdio, um saco fibrosseroso que envolve o coração, preenchido por uma pequena quantidade de líquido que facilita os batimentos cardíacos. O coração apresenta um sistema especializado de excitação e condução controladora das contrações cardíacas. São fibras musculares especializadas em regular a frequência do coração. Essas constituem os nodos sinoatrial e atrioventricular, assim como o feixe de His e as fibras de Purkinje. O ritmo inerente do coração é modulado pelo sistema nervoso autônomo, no qual as fibras parassimpáticas, derivadas do nervo vago, diminuem a frequência cardíaca, enquanto as fibras, derivados de gânglios simpáticos, a aumentam. Além disso, o coração apresenta um sistema próprio de irrigação constituído pelas artérias coronárias. Elas se iniciam nos óstios coronários, junto às cúspides coronarianas da valva aórtica e formam os primeiros ramos emergentes da aorta.⁶⁹

1.5 Bioenergética mitocondrial do músculo cardíaco

A musculatura cardíaca é muito ativa metabolicamente e possui alto grau de contração, tanto que, cerca de 75% da energia do miocárdio é empregada nesta função.⁷⁰ A contractilidade é altamente dependente da energia liberada pela hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP).⁶⁸

Entre os mamíferos, 80 a 90% das moléculas de ATP são geradas por meio do processo de fosforilação oxidativa, que ocorre nas mitocôndrias.³⁷ Estas organelas citoplasmáticas têm um papel central no processo de síntese energética

celular.

As mitocôndrias foram descritas pela primeira vez por Altmann, em 1894, que as denominou "bioblastos". Morfologicamente, estas organelas são representadas como cilindros alongados e rígidos embora sejam extraordinariamente móveis e plásticas.

Cada mitocôndria é composta por um sistema de membranas duplas: a membrana externa e a membrana interna. Estas membranas são altamente especializadas e delimitam o espaço intermembranar, enquanto que o espaço interno se designa matriz. Cada um destes componentes tem um papel funcional distinto, sendo a membrana interna e a matriz mitocondrial os principais locais da atividade das mitocôndrias.⁷¹

Enquanto a membrana externa é constituída por cerca de 50% de lípidos e 50% de proteínas e permeável a moléculas de peso molecular até 6.000 daltons, a membrana interna é constituída por 20% de lípidos e 80% de proteínas, sendo significativamente menos permeável que a externa e impermeável à maior parte dos íons, incluindo prótons e pequenas moléculas. Esta característica de impermeabilidade lhe confere uma função de barreira, sendo fundamental para o desempenho da principal atividade das mitocôndrias: a produção de ATP.⁷²

Entre os 60 tipos diferentes de proteínas localizadas na membrana interna encontram-se as enzimas da cadeia respiratória (CR), as que estão envolvidas na síntese de ATP (ATP sintase), várias desidrogenases e outras proteínas envolvidas no transporte de substâncias (piruvato e ácidos graxos) para o interior da mitocôndria.⁶⁷

A membrana interna é constituída por cristas que aumentam bastante a área superficial interna da mitocôndria além de possuírem os elementos necessários para a respiração aeróbica. A quantidade de cristas é diretamente proporcional à demanda energética da célula, por isso, o número de cristas é 3 vezes maior em mitocôndrias de uma célula muscular cardíaca em relação aquelas de uma célula hepática, por exemplo.⁶⁷

A matriz mitocondrial, outro local de grande atividade, contém o material genético da mitocôndria e as enzimas relacionadas principalmente com o ciclo de Krebs e responsáveis pelo metabolismo oxidativo.⁷¹

Por apresentarem mobilidade no citoplasma, as mitocôndrias estão associadas aos microtúbulos que, por sua vez, podem determinar a sua orientação e

distribuição nos diferentes tipos de células. Por isso, podem formar longos filamentos móveis ou cadeias, ou permanecerem fixas a um local onde o consumo de ATP é mais elevado. É o que acontece nas células do músculo cardíaco, onde elas se encontram formando feixes entre miofibrilas adjacentes.⁶⁷ Em adição, a quantidade de mitocôndrias por célula também é fortemente influenciada pela sua demanda energética. Órgãos que são muito ativos metabolicamente como fígado, cérebro, músculos esquelético e cardíaco, contém um número maior destas organelas, o que os torna, portanto, mais suscetíveis a doenças mitocondriais.³⁷

Especificadamente, quase metade da célula muscular cardíaca é ocupada por mitocôndrias.⁷³ Por ser a maior fonte celular de ATP, alterações e injúrias nestas organelas podem levar ao decréscimo da produção de energia, tendo um impacto direto sobre a performance cardíaca.⁷⁴

No coração, o aporte energético é proveniente de lipídeos (cerca de 60% em nível basal) e carboidratos.⁷³ O metabolismo cardíaco contém três principais componentes. O primeiro consiste da produção de energia a partir de ácidos graxos e do piruvato (proveniente da glicólise), que são oxidados através das vias de beta-oxidação e da piruvato desidrogenase respectivamente, para gerar acetil-CoA, principal combustível do ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs). Como resultado deste processo, ocorre a retirada de elétrons, sendo a acetil-CoA oxidada enzimaticamente até CO₂.

O segundo componente é a fosforilação oxidativa, que consiste na produção de energia pela CR mitocondrial, nesta etapa a energia liberada pela oxidação é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos, NADH e FADH₂. Esses cofatores reduzidos são oxidados, desfazendo-se de prótons (H⁺) e elétrons; estes elétrons são introduzidos ao longo de uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons, até o O₂, o qual reduz para formar H₂O. Durante estas etapas de transferências de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP.⁷⁵

O terceiro componente é a transferência e utilização de ATP pelas miofibrilas, mediado pelo sistema da creatina quinase. Neste, a creatina quinase mitocondrial catalisa a transferência da ligação fosfato de alta energia do ATP para a creatina formando a fosfocreatina e ADP. A fosfocreatina é uma molécula menor que o ATP e se difunde rapidamente da mitocôndria para miofibrilas, onde a creatina quinase miofibrilar catalisa a produção do ATP a partir da fosfocreatina. A creatina livre

difunde novamente para a mitocôndria.⁷⁵

Uma importante função do sistema da creatina quinase é agir como um tampão energético. Quando a demanda de energia supera a produção, o nível de fosfocreatina cai, mantendo o nível de ATP, aumentando o nível do ADP livre. O aumento na quantidade de ADP livre estimula a produção de ATP pelo complexo da ATP sintase, no entanto, inibe a função de muitas enzimas intracelulares, causando uma falha nos mecanismos de contração do coração.⁷⁶

Estudos apontam que mudanças persistentes no metabolismo oxidativo mitocondrial podem mediar as respostas à RI, conduzindo a inflamações, danos endoteliais e ao posterior desenvolvimento de doenças cardiovasculares.⁷⁷ Ainda, estas mudanças levam a uma diminuição de energia, gerando disfunção mecânica do coração, especialmente quando os sistemas de transporte de ácidos graxos para a mitocôndria estão afetados, ou pela alteração de outras enzimas envolvidas no metabolismo energético.⁷⁸

Mecanismos propostos para explicar as disfunções mitocondriais incluem: danos aos complexos da cadeia transportadora de elétrons e estresse oxidativo.⁷⁹ Em ambos os casos ocorrem perda do controle dos processos de redução e oxidação no interior das organelas, alteração do metabolismo homeostático e aumento da produção de ROS como peróxidos, superóxidos e radicais hidroxila. O excesso de ROS é capaz de causar danos a muitos componentes celulares incluindo DNA, lipídios e proteínas.⁷⁷

1.6 Análise proteômica e doenças cardíacas radioinduzidas

Para se compreender a função gênica em toda a sua plenitude é necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas, uma vez que alterações no genoma nem sempre refletem uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e conseqüentemente, da atividade biológica. A razão disso é que o controle da expressão gênica ocorre desde a transcrição do mRNA até as modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação, acilação, hidroxilação, carboxilação, ubiquitinação, entre outras, as quais alteram a atividade protéica.⁸⁰

O termo proteoma foi proposto em 1995 por Wilkins e é definido como a

composição de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo em um dado momento, refletindo condições fisiológicas e fisiopatológicas específicas.⁸¹ “Análise Proteômica” significa a análise simultânea de misturas complexas de proteínas, como lisados celulares e extratos de tecidos, com a principal finalidade de observar mudanças quantitativas nos níveis de expressão das proteínas. Ela inclui a separação e identificação das proteínas, quantificação, determinação da função, caracterização de modificações pós-traducionais e estudos de interações protéicas.⁸²

Quanto a aplicabilidade, o estudo da proteômica tem permitido a descoberta de importantes vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes, tem viabilizado a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos e permitido também a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar estas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento.⁸¹

Quanto as técnicas de análise, as comumente utilizadas para separação de misturas complexas são a eletroforese bidimensional (2D) e a *Multidimensional protein identification technology* (MudPIT). Combinadas com a espectrometria de massas, centenas de proteínas podem ser separadas e identificadas por estas técnicas.

A eletroforese bidimensional é muito utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos, ou outras amostras biológicas. Ela separa proteínas através de duas propriedades em dois passos distintos: a etapa da primeira dimensão (a focalização isoeletrica (IEF)) separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI); e a etapa da segunda dimensão (a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)) separa as proteínas de acordo com o seu peso molecular (PM).⁸²

A resolução da eletroforese bidimensional foi consideravelmente melhorada por O’Farrell e Klose em 1975. Também, a introdução de géis em forma de tiras com gradiente de pH imobilizado durante a primeira dimensão tornou a técnica reproduzível e aplicável para a análise proteômica.⁸²

Apesar de informações como o peso molecular e o pI da proteína obtidas pelo

mapa bidimensional, apenas pela eletroforese não se tem a identificação exata da proteína. Desta maneira, a eletroforese bidimensional pode ser combinada com a identificação da proteína por espectrometria de massas. A maneira mais simples de identificação é através do *peptide mass fingerprinting* (PMF), ou impressão digital da proteína. Nesta, a proteína é digerida com enzima específica, resultando em fragmentos característicos; o peso molecular de cada fragmento é obtido por espectrometria de massas e com o auxílio de banco de dados, é realizada a identificação. Esta técnica depende da disponibilidade de informações como o genoma da espécie ou caracterização prévia da proteína. Uma forma mais precisa de identificação é o seqüenciamento da proteína, que também pode ser realizado por espectrometria de massas (MS/MS).⁸⁰

Apesar dos avanços da eletroforese bidimensional, a alta variação intergéis torna o procedimento de detecção e quantificação de proteínas complicado e limitado, sendo difícil distinguir variações biológicas de variações experimentais. Este problema tem sido superado com a introdução da Eletroforese Bidimensional Diferencial (DIGE: *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*). Nesta técnica, as amostras são previamente marcadas com diferentes corantes fluorescentes e misturadas antes da focalização isoeletrica, sendo que a separação das proteínas de várias amostras é realizada no mesmo gel bidimensional; o que permite a detecção precisa de mudanças na expressão.⁸¹

De forma geral, embora sejam capazes de gerar muitas informações, as técnicas de eletroforese 2-D possuem algumas limitações, uma das mais importantes é são menos eficazes para a detecção de proteínas de baixa abundância, hidrofóbicas e proteínas com pI e pesos moleculares extremos.⁸³

Alternativamente, a técnica *Multidimensional protein identification technology* (MudPIT) é isenta de gel e realiza a separação-purificação de misturas baseada em cromatografia líquida, usando propriedades como solubilidade, tamanho e massa. Nesta técnica, a mistura passa por duas fases, sendo uma estacionária (fixa, que utiliza um material poroso como filtro) e outra móvel (que utiliza um líquido ou um gás para auxiliar a separação da mistura), desta forma, ocorre a interação dos constituintes das misturas com as fases através de forças intermoleculares e iônicas, responsáveis pela separação. As principais vantagens desta técnica são que manuseio das amostras é reduzido, é automatizada e apresenta maior resolução do proteoma, o que facilita a identificação das proteínas menos abundantes

frequentemente perdidas quando géis são utilizados.⁸³

A análise proteômica tem sido bastante aplicada no estudo de doenças cardiovasculares^{80;83-85} e no estudo de biomarcadores protéicos indicativos de exposição a RI.⁸⁶ Entretanto, são poucos os estudos que associam a exposição à RI ao posterior desenvolvimento de doenças cardíacas.

Dentre estes poucos estudos está o de Azimzadeh et al.⁸⁷ realizado em 2011, em que investigaram o proteoma do coração de camundongos 5 e 24h após a exposição de corpo inteiro a 3 Gy de radiação, sendo observadas respostas imediatas tais como inflamação, aumento na produção de enzimas antioxidantes e reorganização de proteínas estruturais. Observaram também que as proteínas mitocondriais representaram a classe mais sensível à RI. E concluíram que as alterações iniciais observadas são indicativas do aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares após a exposição.

Outro estudo, desta vez em proteômica mitocondrial, realizado em 2011 por Barjaktarovic et al.⁷⁷ verificou que houve alteração, principalmente na expressão de proteínas do metabolismo oxidativo, no coração de camundongos analisados 4 semanas após a exposição de corpo inteiro a 2 Gy e a 0,2 Gy de RI.

Em 2013,⁸⁸ o grupo supracitado realizou um novo ensaio para investigar os efeitos da RI sobre a função mitocondrial cardíaca a longo prazo. Utilizaram camundongos irradiados diretamente no coração com dose única de 2 Gy e observaram redução significativa na capacidade respiratória mitocondrial 40 semanas após a exposição. Também foram observados: aumento na carbonilação de proteínas (sugerindo estresse oxidativo), alterações nos níveis de proteínas de mitocôndrias associadas ao citoesqueleto, de proteínas da CR, do transporte de íons e do metabolismo lipídico.

Estes resultados reforçam a idéia de que a análise proteômica pode auxiliar na elucidação dos mecanismos patológicos envolvidos na gênese e evolução das doenças cardíacas radioinduzidas.

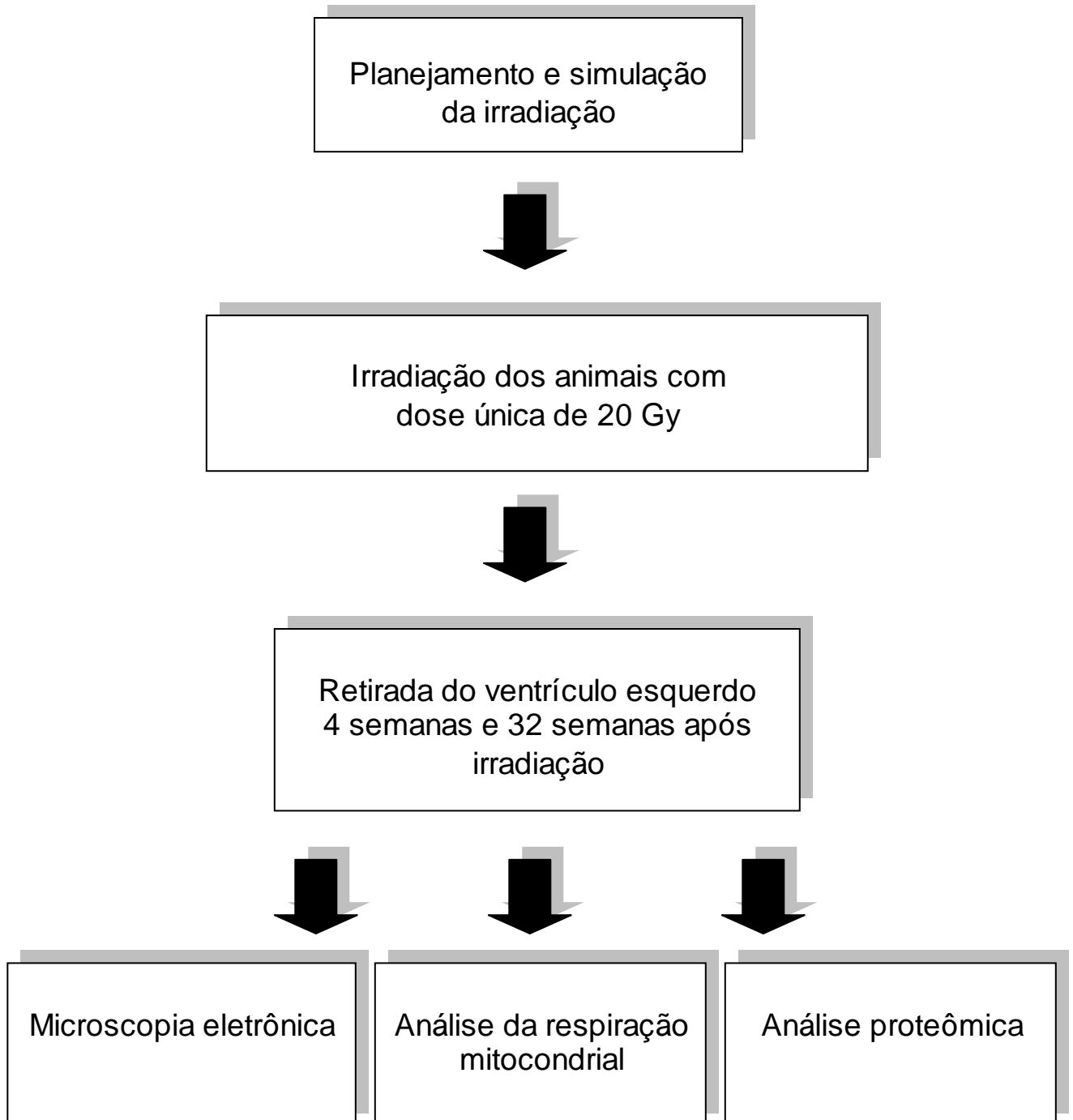
2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo visa contribuir para compreensão das alterações cardíacas radioinduzidas. Para tanto foi proposto um modelo em ratos Wistar irradiados com os objetivos de:

- a) avaliar qualitativamente o aspecto ultraestrutural do tecido cardíaco irradiado;
- b) avaliar a respiração mitocondrial em tecido cardíaco de ratos Wistar irradiados;
- c) identificar as proteínas diferencialmente expressas em respostas tardia a irradiação do tecido cardíaco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Figura - Fluxograma das etapas desenvolvidas.



3.1 Modelo radiobiológico

Para este estudo, foram selecionados aleatoriamente, 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com idade aproximada de três meses, pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes de biotério com temperatura constante e ciclo claro/escuro de 12h. Durante o período experimental estes animais permaneceram em caixas de plástico apropriadas, contendo serragem, e tiveram acesso à ração apropriada e água potável *ad libitum*. Conforme pode ser observado na tabela 1, os animais foram divididos em quatro grupos, sendo eles: grupo controle 4 semanas, grupo controle 32 semanas, grupo irradiado 4 semanas e grupo irradiado 32 semanas, cada um contendo 12 animais. A quantidade de animais utilizados em cada grupo representou um número suficiente para se testar a normalidade dos dados, dentro de cada amostra, e permitiu comparações entre resultados. A distribuição dos animais, nos diferentes grupos experimentais, foi realizada de forma randômica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob número de protocolo CEUA/010/2012.

Tabela 1- Distribuição dos animais, de acordo com a dose de radiação e o tempo de análise após irradiação.

Dose / Tempo	4 semanas	32 semanas
Controles	12 animais	12 animais
20 Gy	12 animais	12 animais

3.2 Simulação e planejamento

Inicialmente, foi realizada a etapa de simulação, cujo objetivo foi determinar a geometria espacial para o posicionamento do animal durante a irradiação. Para isso,

um animal foi anestesiado com Avertin® (tribromoethanol 250 mg/kg; intraperitoneal) e imobilizado em suporte de isopor, em decúbito dorsal. Em seguida, foi submetido à tomografia, em Tomógrafo Helicoidal Computadorizado; Fabricante: General Electric; Modelo: HiSpeed 2246999-3; Série: 8219794M2, do Hospital Clementino Fraga Filho - UFRJ, que forneceu as imagens requeridas para o planejamento da irradiação.

Com as imagens obtidas, durante a simulação, foi possível realizar o planejamento da irradiação do coração do animal (no sistema CadPlan da Varian), determinando-se com isso a geometria espacial e tamanho do campo de irradiação (campo ântero posterior, 2 x 2 cm²).

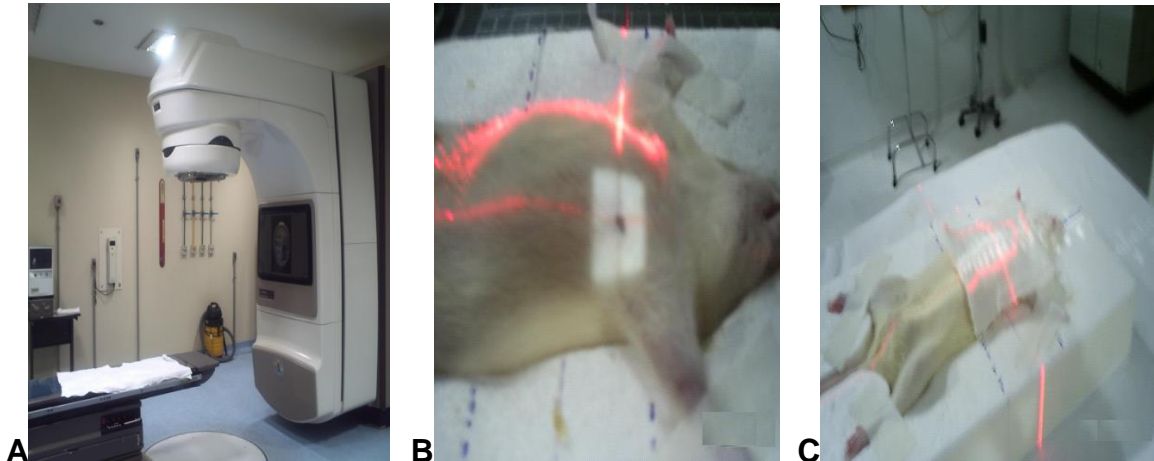
Um aspecto importante a ser ressaltado são as dimensões anatômicas do tórax do animal, onde o coração se encontra muito próximo da parede anterior do tórax (aproximadamente 1 cm abaixo). Com a energia nominal do feixe de raios-X utilizado (6 MV), o máximo de dose é alcançado a 1,5 cm de profundidade. Por esse motivo, um material com densidade equivalente ao tecido, foi utilizado para o deslocamento da curva do máximo de dose em direção à superfície (bólus de 0,5 cm), para que a dose máxima atingisse o centro do coração.

3.3 Irradiação

Para o procedimento de irradiação os animais foram anestesiados com Avertin® (tribromoethanol 250 mg/kg; intraperitoneal) e imobilizados em suporte de isopor em decúbito dorsal. Este procedimento garantiu a permanência do animal em posição fixa, no decorrer do procedimento.

A irradiação foi realizada em dose única de 20 Gy, com a utilização do acelerador linear Varian® (Clinac 2100) do Hospital Clementino Fraga Filho- UFRJ, com feixe de fótons de energia nominal de 6 MV, e taxa de dose de 240 cGy/ min, posicionado no coração do animal, sendo utilizado um bólus de 0,5 cm (Figura 4).

Figura 4 - Procedimento de irradiação dos animais.



Nota: A- equipamento utilizado para a irradiação; B- projeção luminosa do campo de irradiação na superfície do tórax; C-colocação do bólus na superfície do tórax.

Fonte: A autora, 2013.

Após irradiação, os animais foram retornados as caixas de origem e permaneceram sob observação até as datas dos sacrifícios.

3.4 Obtenção das amostras de tecido cardíaco

Passadas respectivamente 4 semanas e 32 semanas após irradiação os animais foram anestesiados com Avertin® (tribromoethanol 250 mg/kg; intraperitoneal) para retirada do ventrículo esquerdo do coração. Os tecidos de 12 animais de cada grupo foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196 °C), onde permaneceram até o momento das análises.

3.5 Microscopia Eletrônica

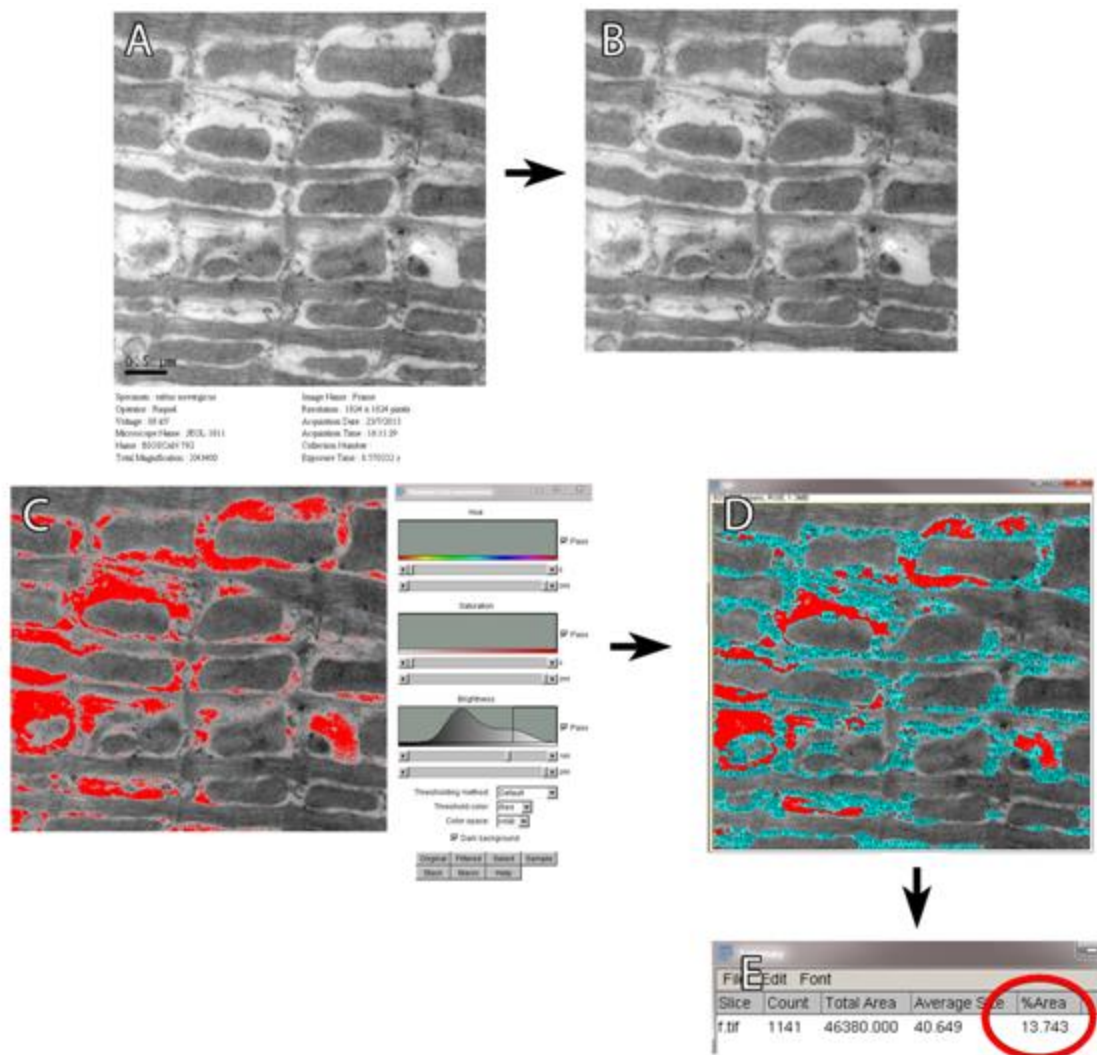
O tecido cardíaco do ventrículo esquerdo dos animais controles e irradiados foi processado e analisado, qualitativamente, com o recurso do microscópio

eletrônico de transmissão Jeol, modelo JEM 1011 da Plataforma de Microscopia eletrônica Rudolf Barth, do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ.

Para a realização de microscopia eletrônica de transmissão os fragmentos de músculo cardíaco foram lavados em PBS e fixados por 1 hora em uma solução, contendo 2,5% de glutaraldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 acrescido de sacarose 3,5%. Em seguida, as amostras foram lavadas por 10 min no mesmo tampão. Essa etapa de lavagem foi repetida 3 vezes. O material foi pós-fixado por 1 hora com solução de 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 acrescido de sacarose 3,5%. Realizou-se uma etapa de desidratação das amostras através de banhos de 30 minutos em concentrações crescentes de acetona P.A. (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%). Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de infiltração da resina EPOXI no material, através de banhos em concentrações crescentes da resina EPOXI e acetona P.A. (1:2; 1:1 e 2:1, respectivamente) por 2 horas cada. Posteriormente foram realizados 2 banhos de resina pura, o primeiro de 6 horas e o segundo 18 horas, então inclui-se o material em formas de silicões com a resina e levou-se à estufa por 48 horas para ocorrer a polimerização da mesma. Cortes semifinos foram realizados para escolha da região a ser analisada, e em seguida foram feitos cortes ultrafinos, esses últimos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para por fim serem visualizados no microscópio eletrônico de transmissão.

Posteriormente, análises quantitativas foram realizadas em software *ImageJ* (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.), com base nas fotomicrografias obtidas, após definição da área eletrólucida por *threshold* seguido de medição da área com máscara de *threshold* em relação a área total. (Figura 5). A porcentagem da área com conteúdo citoplasmático eletrólucido (CCE) foi determinada e comparada entre os grupos. Para o cálculo foram utilizadas 10 fotomicrografias de cada estado (controle e irradiado) e tempo após irradiação. A análise estatística foi realizada através do software *GraphPad Prism 6*, com teste *One-way ANOVA* e pós teste de comparações múltiplas de *Sidak*.

Figura 5 - Análise da área em fotomicrografias com conteúdo citoplasmático eletrólucido.



Nota: A: imagem exemplo para análise. B: área definida para análise (sem barra / menus que possam interferir no resultado). C: Definição do *threshold* (*Menu Image>Adjust>Threshold*). D: Leitura da área (*Menu Analyse>Measure*). E: Leitura do resultado.

Fonte: *Software Image J*. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.)

3.6 Análise da respiração mitocondrial

O consumo de O_2 pelas mitocôndrias foi avaliado em oxígrafo OROBOROS® *Oxygraph-2k* (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). Para tanto, parte do ventrículo esquerdo foi dissecado em fatias finas (5 a 7 mg) seguindo a orientação

das fibras cardíacas. Estas fibras foram parcialmente separadas umas das outras, deixando apenas pequenas áreas de contato entre elas, sendo em seguida transferidas para um recipiente contendo solução A pH 7.1 (CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, Na₂ATP 5,77 mM, MgCl₂.6H₂O 6,56 mM, taurina 20 mM, fosfocreatina 15 mM, imidazol 20 mM, DTT 0,5 mM, K-MES 50 mM) a 4 °C acrescida de 50 µg/mL de saponina e incubadas sob agitação por 30 min para permeabilização do sarcolema.

As fibras permeabilizadas foram lavadas na solução de respiração B pH 7,1 (EGTA 0,5 mM, MgCl₂6H₂O 3 mM, K-MES 60 mM, Taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, Sacarose 110 mM, BSA 1 g/L) a 4 °C por 10 min. Em seguida 3 mg deste tecido foi transferido para as câmaras do oxígrafo contendo 2 mL de solução de respiração a 37°C. As análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O₂.mL⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂.s⁻¹.mg de peso úmido⁻¹. Os substratos utilizados foram glutamato 10 mM, malato 2 mM e succinato 10 mM, para a análise dos complexos I e II da CR. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: taxa respiratória basal, antes da adição de adenosina difosfato (ADP), estado 2; taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), estado 3 e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (2 µg/mL), estado 4.

A razão de controle respiratório (RCR), que determina a funcionalidade de uma preparação mitocondrial por meio do acoplamento, foi calculada ao fim do experimento pela razão entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado respiratório 3) pela velocidade respiratória obtida após o consumo de todo o ADP (estado respiratório 4).

Para examinar a integridade da membrana mitocondrial externa, a respiração foi mensurada em presença de 10 µM de citocromo c.

A análise estatística foi realizada por meio do teste-t de *Student*.

3.7 Padronização da análise proteômica

Para padronização foram utilizados os tecidos cardíacos de dois animais que não faziam parte dos grupos experimentais. Estes animais eram fêmeas,

provenientes de biotério, saudáveis e com 6 meses de vida.

3.7.1 Extração e dosagem de proteínas totais

Para a retirada do ventrículo esquerdo os animais foram anestesiados com Avertin® (tribromoethanol 250 mg/kg; intraperitoneal), e em seguida 200 mg de tecido foi retirado de cada animal e imediatamente pulverizado com nitrogênio líquido e macerados. Estes materiais foram então divididos em duas partes cada, constituindo quatro amostras pesando 100 mg.

Para a padronização da obtenção do extrato protéico total de tecido cardíaco foram utilizados dois tampões de lise celular, cujo objetivo foi avaliar perdas quantitativas e qualitativas de proteínas:

- a) Tampão A: uréia 7 M, tiouréia 2 M, Tris 30 mM e CHAPS 4%, pH 8,5.
- b) Tampão B: uréia 8 M, Tris 30 mM e CHAPS 4%, pH 8,5.

Ainda, no momento da extração foram acrescentados a cada tampão inibidores de proteases: PMSF 100 μ M, leupeptina 40 μ M, pepstatina 1 μ M, EDTA 1 mM e 0,1 μ L de endonuclease (Benzonaze® Merck).

Em duas amostras nomeadas A1 e A2 foi acrescentado o “tampão A” e nas outras duas, nomeadas B1 e B2, foi acrescentado o “tampão B”, utilizando a proporção de 1 mL de solução tampão para cada 100 mg de tecido macerado. O microtubo foi mantido em banho de ultrassom com frequência de 40 KHz durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, o material foi agitado por 30 min a 4 °C e centrifugado a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e mantido a -80°C.

3.7.2 Precipitação, rehidratação e dosagem de proteínas totais

Alíquotas de 500 μ L de extratos protéicos de cada uma das quatro amostras foram cuidadosamente acrescidas de 4 mL de acetona 1 mL de ácido tricloroacético

(TCA) por 1 hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o material foi centrifugado a 13000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 5x com 1 mL de acetona. A cada lavagem o material foi centrifugado como descrito anteriormente.

Após a precipitação, as alíquotas das amostras A1 e B1 foram rehidratadas em 250 μL de “tampão A” cada, e nomeadas A1/A e B1/A respectivamente. Seguindo o mesmo princípio, as alíquotas das amostras A2 e B2 foram rehidratadas em 250 μL de “tampão B” cada, e nomeadas A2/B e B2/B, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização das amostras de acordo com os tampões utilizados na lise e rehidratação de proteínas

Amostra	Tampão de lise	Tampão de rehidratação
A1/A	Tiouréia 7 M+ Uréia 2 M	Tiouréia 7 M+ Uréia 2 M
B1/A	Uréia 8 M	Tiouréia 7 M+ Uréia 2 M
A2/B	Tiouréia 7 M+ Uréia 2 M	Uréia 8 M
B2/B	Uréia 8 M	Uréia 8 M

A concentração de proteínas de cada extrato total foi determinada pelo método de Bradford (*kit* Bio Rad), para tanto foi construída uma curva padrão de diluição para cada um dos tampões utilizados, empregando o BSA (albumina de soro bovino) como padrão nas seguintes concentrações: 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 1200 $\mu\text{g/mL}$, 1400 $\mu\text{g/mL}$, 1600 $\mu\text{g/mL}$, 1800 $\mu\text{g/mL}$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$. A dosagem foi realizada a partir de 10 μL de amostra e 1 mL do reagente de Bradford em espectrofotômetro a 595 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As amostras precipitadas e rehidratadas para avaliar a ocorrência de perda quantitativa de proteínas totais antes e após a precipitação. O fator que indica perda protéica foi calculado a partir da razão da concentração da amostra antes da precipitação pela concentração desta após a precipitação-rehidratação, de forma que, menor é a perda quantitativa quanto mais próximo de 1 for o resultado do fator.

3.7.3 Eletroforese 1D em mini gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As proteínas totais foram avaliadas qualitativamente através de eletroforese 1D em mini gel de poliacrilamida SDS-PAGE . Alíquotas de 10 μ L contendo 5 μ g de amostra foram misturadas a 10 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 125 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02%), DTT 0,2 M e desnaturadas a 96 °C por 5 min. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida formado pelo gel de empilhamento (acrilamida 30%, bisacrilamida 2%, Tris-HCl 1 M pH 6,8, SDS 10%, TEMED 1% e PSA 10%) e pelo gel de corrida, na concentração de 12% (acrilamida 30%, bisacrilamida 2%, Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS 10%, TEMED 1% e PSA 10%) em tampão de corrida 1x (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3) a 100 V por 15 min, seguido de 150 V por 50 min.

Após a eletroforese o gel foi corado pelo método da prata amoniacal, que consistiu nas seguintes etapas: a) fixação: o gel foi incubado em uma solução contendo etanol 40%, ácido acético 10% durante 1 hora sob agitação e em seguida foi transferido para outra solução contendo etanol 5%, ácido acético 5% por 2 horas ou *overnight* sob agitação. Ao fim desta etapa o gel foi lavado 2x em água ultrapura durante 5 min, b) sensibilização: nesta etapa o gel foi transferido para uma solução contendo glutaraldeído 1% e acetato de sódio 0,5 M onde permaneceu durante 30 min sob agitação. Ao fim desta etapa o gel foi lavado em água ultrapura durante 5 min por 8x, c) coloração: o gel foi corado por 30 min com nitrato de prata amoniacal fresco sob agitação. Esta solução foi feita a partir de duas outras soluções: 6 mL de nitrato de prata 42 μ M em 2,6 mL de hidróxido de amônio 25% e 0,4 mL de NaOH 10 N em 42,6 mL de água. Em seguida, o gel foi lavado em água ultrapura

durante 4 min por 4x e d) desenvolvimento: o gel foi transferido para uma solução contendo ácido cítrico 0,01% e formaldeído 0,1%, nesta etapa as bandas começaram a ser visualizadas e a parada da reação ocorreu com a adição da solução contendo ácido acético 2% e Tris 5%.

3.7.4 Focalização isoeletrica

Após a feitura e análise dos resultados da eletroforese em mini gel de poliacrilamida SDS-PAGE, foi realizada a padronização da focalização isoeletrica inicialmente aplicando-se 5 μg de amostra em uma *IPG strip (Immobilized pH Gradients, GE Health)* com faixa pH 3-11, não linear, e comprimento de 7 cm.

Uma vez obtidos os resultados utilizando *strips* de 7 cm pH 3-11, passou-se a utilizar *strips (Immobilized pH Gradients, GE Health)* de 18 cm com faixa pH 3-11, não linear, que permitem melhor resolução das proteínas pelo seu ponto isoeletrico. Em *strips* de 18 cm foram aplicados 150 μg de amostra.

Primeiramente as amostras foram diluídas na solução tampão de rehidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, Tris 30 mM, DTT 1 M 1%. Em seguida, foi acrescentado *D-streak 1,2% (GE Healthcare)* e *IPG buffer 1% (GE Healthcare)*. As amostras foram incubadas a 25 °C por 30 min sob agitação.

A rehidratação do gel da strip foi de forma ativa a 30V durante 12 horas. A focalização isoeletrica foi realizada na plataforma *Ettan IPGphor II (GE Healthcare)* a 20 °C, de acordo com os seguintes parâmetros: para *strips* de 7 cm, 200 V/1 hora, 500 V /1 hora, 1000 V/ 1 hora, 5000-15000 V/ 2 horas e 15000 V até ser atingido um máximo de 65000 Vhs e 70 μA . Para *strips* de 18 cm, foram utilizadas três diferentes programações de focalização a 20 °C:

- a) 30 V/12 horas, 100 V /1 hora, 500 V/ 1 hora, 2000-8000 V/ 1 hora e 8000 V até ser atingido um máximo de 40000 Vhs e 50 μA ;
- b) 30 V/12 horas, 100 V /1 hora, 500 V/ 1 hora, 2000-8000 V/ 8 horas e 200 V até ser atingido um máximo de 80000 Vhs e 70 μA ;
- c) 30 V/12 horas, 100 V /1 hora, 500 V/ 1 hora, 2000-8000 V/ 8 horas e 200 V até ser atingido um máximo de 100000 Vhs e 50 μA ;

3.7.5 Equilíbrio das *strips* e eletroforese bidimensional (2D)

Após a focalização cada *strip* foi lavada com água ultrapura e incubada em solução de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl pH 8,8 75 mM, glicerol 29,3% (v/v), SDS 2% (p/v)) contendo primeiramente 150 mg de DTT por 15 min sob agitação, e em seguida solução de equilíbrio contendo 250 mg de IAA durante 20 min sob agitação.

Para a segunda dimensão as *strips* foram lavadas em tampão de corrida 2x (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3), depositadas na parte superior de um gel de poli-acrilamida 12% (acrilamida 30%, bisacrilamida 2%, Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS 10%, TEMED 1% e PSA 10%) e cobertas com uma mistura de agarose 0,5% e azul de bromofenol. A corrida foi realizada em tampão de corrida 2x (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3) a 15 °C sob as seguintes condições: 100 V por 15 min, seguido de 150 V por 50 min para os mini géis e 5mA/gel por 30 min, seguido de 8 mA/gel por 1h e 60 mA/gel por 3 h para os géis maiores onde *strips* de 18 cm foram depositadas. Posteriormente, os géis foram corados pelo método da prata amoniacal como descrito no item 3.7.3.

3.8 **Análise proteômica das amostras experimentais**

3.8.1 Extração, precipitação, rehidratação e dosagem de proteínas totais

De acordo com resultados obtidos na padronização, a extração total de proteínas das amostras experimentais foi realizada com a solução “tampão A”, como descrito no 4.4.1. Estas proteínas foram precipitadas pelo método TCA-acetona e também reidratadas com a solução “tampão A”. Por fim, a dosagem de proteínas totais foi realizada como descrito anteriormente no item 3.7.2.

3.8.2 2D-DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)

A técnica 2D-DIGE (*2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*) foi primeiramente aplicada em amostras de 32 semanas.

As amostras foram agrupadas da seguinte forma: grupos CA, CB, CC e CD foram compostos por duas amostras controles (ou seja, dois animais) cada grupo; os grupos IA, IB, IC e ID foram compostos por duas amostras irradiadas (ou seja, dois animais) cada grupo.

Estes grupos foram marcados com os fluoróforos Cy3, Cy5 e o padrão interno Cy2, como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Relação dos grupos marcados com fluoróforos.

Cy3	Cy5	Cy2
Grupo CA	Grupo IA	Todos os Grupos
Grupo IB	Grupo CB	
Grupo CC	Grupo IC	
Grupo ID	Grupo CD	

As proteínas totais foram marcadas com o fluoróforo *CyDye DIGE Fluor minimal dye (GE Healthcare)*. Para tanto, 50 µg de proteínas, com pH ajustado para 8,8, foram misturados a 0,2 µl de Tris-HCl 1,5M. Em seguida foi adicionado a esta solução 100 pmol de *CyDye*. A mistura foi incubada a 4 °C em frasco de cor âmbar durante 2 horas. A reação foi parada por meio da adição de 0,5 µL de lisina 10 mM e as amostras foram incubadas a 4°C por 10 min.

3.8.3 Eletroforese bidimensional (2D)

O tampão de amostra DIGE (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, Tris 30 mM, DTT 1 M) sfoi adicionado até o volume final de 340 µL e a mistura foi aplicada em

strips (*Immobilized pH Gradients*, GE Health) com faixa pH 3-11, não linear, e comprimento de 18 cm. A focalização isoeétrica foi realizada na plataforma *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare) a 20 °C como descrito a seguir, de acordo com os resultados obtidos na padronização (item 4.4.1): 30 V/12 horas, 100 V /1 hora, 500 V/ 1 hora, 2000-8000 V/ 1 hora e 8000 V até ser atingido um máximo de 40000 Vhs e 50µA.

As *strips* de cada ensaio de DIGE foram focalizadas simultaneamente. Após esta etapa as *strips* foram equilibradas e transferidas para os géis de poliacrilamida de acordo com as instruções dadas no item 3.7.5 utilizando sistema *DALTsix* (GE Healthcare) com placas de vidro de baixa fluorescência, com corrida a 3 mA por gel durante a noite. Após as análises das imagens, o gel preparativo foi corado por *Coomassie* coloidal. Os grupos de amostras que foram misturados e aplicados em cada gel (representativo de uma réplica biológica) são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 - Relação dos grupos de amostras que foram aplicados em cada gel de acordo com suas marcações.

Gel	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 1	Grupo CA	Grupo IA	Todos
Gel 2	Grupo IB	Grupo CB	
Gel 3	Grupo CC	Grupo IC	
Gel 4	Grupo ID	Grupo CD	

3.8.4 Análise dos géis

As imagens dos *spots* foram obtidas através do escâner *Typhoon* (GEHealthcare), com uma resolução final de 100 µm, em comprimentos de excitação de 488 nm, 532 nm e 633 nm e de emissão 520 nm, 580 nm e 670 nm, respectivamente para os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5. A quantificação da expressão proteica foi realizada pelo *software DeCyder 7.0*. Primeiramente, foi realizada a análise intra-gel no módulo *DeCyder DIA (Difference In-Gel Analysis)*, onde foram utilizados como filtro de exclusão uma área 100 e Volume de 50000. Posteriormente,

foi realizada a análise inter-gel no módulo *DeCyder BVA (Biological Variance Analysis)*. A validação dos *spots* diferencialmente expressos foi dada pelo teste *t-student* e foram filtrados os *spots* validados para um valor de $p < 0,05$. Entretanto, seguindo este critério, nenhum *spot* diferencialmente expresso foi encontrado (ver item 4.5.1).

Uma vez que, com a técnica 2D-DIGE não foi possível obter resultados de expressão diferencial das amostras de 32 semanas, para as amostras de 4 semanas, optou-se por uma pré-análise através de eletroforese 2D, corando os géis com prata amoniaca. A partir do resultado, seria decidido pela aplicação ou não da técnica 2D-DIGE. De antemão, este ensaio não revelou a presença de proteínas diferencialmente expressas nas amostras de 4 semanas, portanto, por decisão, teve início outra estratégia de análise de proteínas, desta vez aplicando a técnica *Label-free*, mais sensível e resolutiva.

3.8.5 Análise de proteínas *Label-free* por espectrometria de massas

A análise *Label-free* por espectrometria de massas foi realizada no espectrômetro de massas Synapt G2-S HDMS (Waters).

Amostras de 32 semanas, previamente quantificadas, foram concentradas 39 x e a solução de lise foi trocada por uma solução contendo bicarbonato de amônio 50mM. Este procedimento foi realizado através de uma membrana de ultra-filtração (3-kDa ultra-filtration Amicon).

Duzentos microgramas de proteínas foram desnaturadas com RapiGEST SF (Waters) 0,1 % a 60 °C por 15 min, reduzidas com DTT 10 mM a 60 °C por 30 min, alquiladas com IAA 10 mM a 25 °C por 30 min em ambiente escuro, e digeridas enzimaticamente com tripsina utilizando uma proporção enzima:proteína de 1:50 (w/w). A digestão foi cessada após 16 horas através da adição de 10 μL TFA 5%. Em seguida, foi adicionado ADH (P00330) para que a digestão atingisse 10 fmol μL^{-1} por injeção, como um padrão interno de quantificação absoluta.

Experimentos qualitativos e quantitativos foram realizados em um nanoUPLC tandem nanoESI-HDMS^E, utilizando um gradiente de fase reversa de 7 % a 40 %

(v/v) de acetonitrila (0,1 % v/v de ácido fórmico) por 1h e uma taxa de fluxo de 500 nL min⁻¹ em um sistema nanoACQUITY UPLC 2D Technology.

Uma coluna nanoACQUITY UPLC HSS T3 1,8 µm, 75 µm x 15 cm (pH 3) foi usada em conjunto com outra coluna de nanofluxo de fase reversa XBridge BEH130 C18 5 µm, 300 µm x 50 mm (pH 10). As colunas foram carregadas com 660 ng de proteínas totais digeridas em 10 frações (66 ng/fração/carregamento).

Para todas as medidas, o espectrômetro de massas foi operado em um modo de resolução de pelo menos 35000 FWHM, uma célula de mobilidade iônica preenchida com gás nitrogênio e poder de resolução de seção cruzada de pelo menos 40 Ω/ΔΩ. Todas as análises foram feitas através de ionização por *nano-electrospray* em um modo íon positivo nanoESI (+) e uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters, Manchester, UK)

O bloqueio do canal de massa foi amostrado a cada 30 seg. O espectrômetro de massas foi calibrado com um espectro MS/MS de solução de [Glu¹]-Fibrinopeptídeo B humana 100 fmol.mL⁻¹ através do pulverizador de referência da fonte NanoLockSpray.

O íon duplamente carregado ([M + 2H]²⁺ = 785,8426) foi utilizado para a calibração inicial de um único ponto, e fragmentos ionizados MS / MS de [Glu¹]-Fibrinopeptídeo B humano foram usados para obter a calibração do instrumento final.

A digitalização de dados independentes multiplexados com a especificidade e seletividade de mobilidade iônica não-linear *T-wave* (HDMSE^E) foram realizados em um espectrômetro de massa *Synapt* G2-S HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido), que foi automaticamente programado para alternar entre o padrão MS (3 eV) e elevadas energias de colisão HDMSE^E (19-45 eV) aplicada a transferência *T-wave* de dissociação induzida por colisão com o gás argônio, a armadilha de colisão foi ajustada para 1 eV, usando um tempo de verificação em milissegundos que foi previamente ajustado com base na velocidade linear do pico da cromatografia entregue através do nanoACQUITY para fornecer um mínimo de 20 pontos de verificação para cada pico único, tanto em baixa energia quanto na transmissão de alta energia numa aceleração ortogonal *time-of-flight* HDMSE^E. A faixa de massa foi de *m / z* 50 a 2000. O deslocamento RF (MS perfil) foi ajustado de tal modo que os dados nanoUPLC-HDMS^E foram efetivamente adquiridos de *m / z* 400-2000, o que

assegurou que as massas observadas no espectro de alta energia, com menos do que o m/z 400 surgissem de dissociações de colisão.

3.8.5.1 Pesquisa em banco de dados e quantificação

A identificação de proteínas e a pesquisa de dados quantitativos foram realizadas por meio de algoritmos específicos utilizando banco de dados de *Rattus norvegicus* específico de ratos. As bases de dados utilizadas foram randomizados *on-the fly* durante as consultas e anexadas ao banco de dados original para determinar a taxa de falso-positivo de identificação. Para o processamento espectral adequado e busca no banco de dados, foi utilizado o software ProteinLynx Servidor Global v.2.5.2 (PLGs) com *Expression^E informatics v.2.5.2. UniProtKB / Swiss-Prot* com anotações revisadas manualmente, e as condições de pesquisa foram baseados na taxonomia [*Rattus norvegicus* (rat)], com no máximo, uma clivagem perdida por tripsina, e modificações por carbamidometil, acetil N-terminal e de oxidação. As proteínas identificadas foram organizadas pelo algoritmo *PLGs Expression^E* em uma lista estatisticamente significativa, correspondendo ao aumento e decréscimo de taxas regulação entre os diferentes grupos.

O banco de dados *PHANTER Classification System* (<http://www.pantherdb.org>) foi utilizado para classificar as proteínas diferencialmente expressas em categorias, de acordo com a função molecular que exercem.

3.8.5.2 Análise funcional das proteínas diferencialmente expressas e predição das interações proteína-proteína

Uma análise *in silico* foi inicialmente realizada utilizando a versão do software *Reactome* (<http://www.reactome.org>), do banco de dados *Rattus norvegicus*, para verificar as alterações tardias no tecido cardíaco irradiado.

Para a construção da rede de interações proteína-proteína foi utilizado o software *INGENUITY Pathway Analysis* (IPA Ingenuity System,

<http://www.Ingenuity.com>). Este programa cria representações gráficas a partir de dados de interações de proteínas do banco de dados para *Rattus norvegicus*, após o *uploading* dos números de acesso (*Uniprot*) correspondentes às proteínas de interesse. As informações contidas nesta base de dados são geradas a partir de publicações científicas revisadas que classificam as proteínas de acordo com as funções, vias biológicas e relação com doenças.

4 RESULTADOS

4.1 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia ultraestrutural do miocárdio foi examinada quanto às lesões estruturais induzidas pela RI.

Por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão notou-se a presença de cardiomiócitos ventriculares ricos em mitocôndrias no grupo controle de 4 semanas (Figura 6), assim como feixes de miofibrilas paralelas entre si e com distribuição uniforme, constituídas por sarcômeros preservados. Percebeu-se também, a presença de miofibrilas em alternância com as mitocôndrias, que estão regularmente organizadas entre estas e em estreito contato com os sarcômeros, um aspecto usual em tecido estriado cardíaco. Ainda neste grupo, foram observadas mitocôndrias íntegras, com matriz eletrondensa e membranas externa e interna (cristas mitocondriais) preservadas.

De forma comparativa, no grupo analisado 4 semanas após irradiação, mudanças ultraestruturais do tecido cardíaco já são evidentes, porém modestas. Pode ser notado aumento discreto de CCE entre as mitocôndrias e entre os feixes de miofibrilas, assim como pequeno grau de desorganização, fragmentação e perda das cristas em algumas mitocôndrias (Figura 6).

Apesar de não ter sido irradiado, o grupo controle de 32 semanas mostrou evidências de moderada degeneração tecidual no miocárdio. Alterações foram observadas em algumas mitocôndrias, que exibiram perda de cristas, e nas miofibrilas, que apresentaram alguns trechos descontínuos, com desaparecimento dos feixes (Figura 6). Tais características provavelmente estão associadas ao processo natural de envelhecimento dos animais que possuíam quase 1 ano de vida na época da análise.

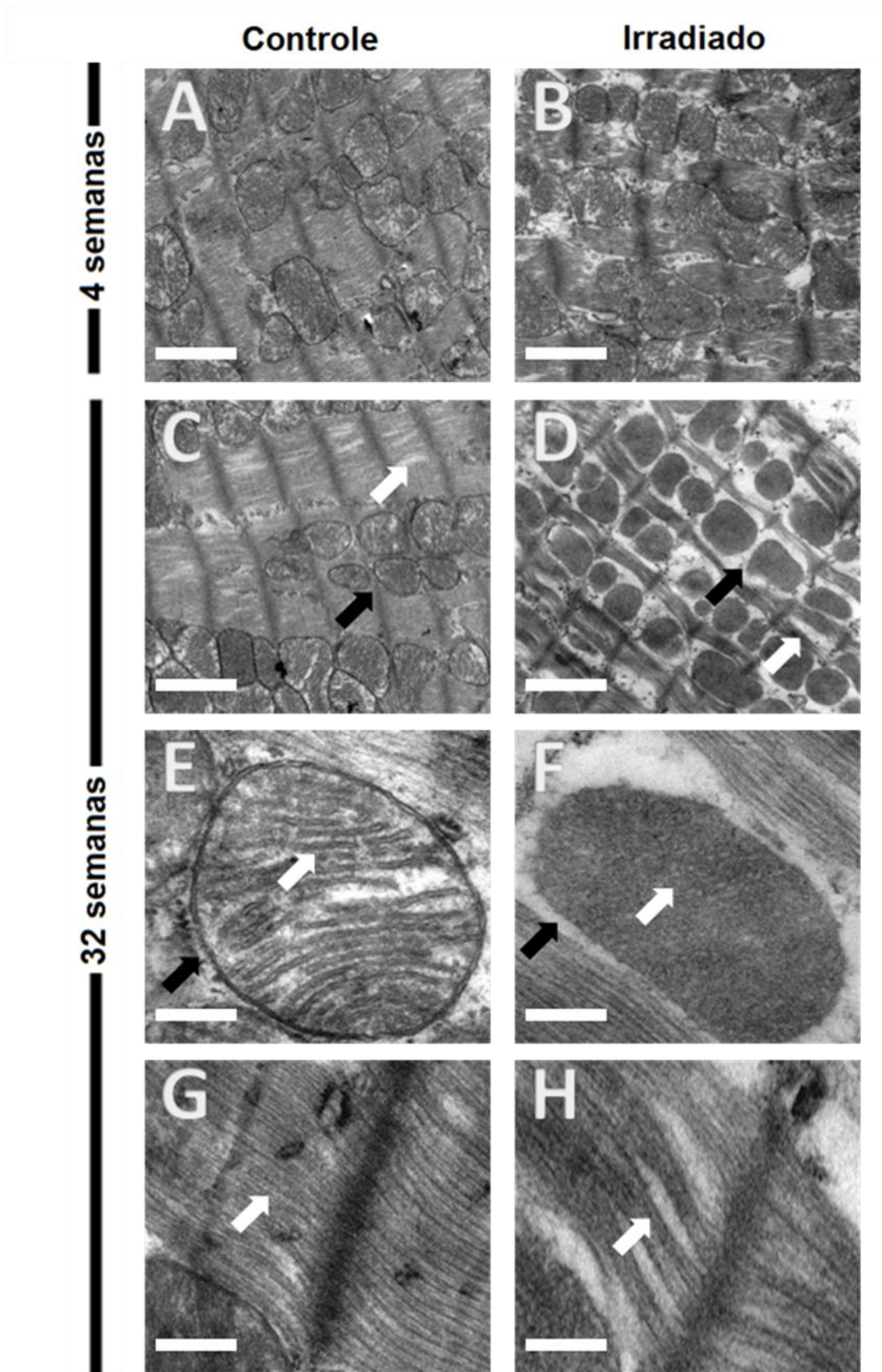
Comparativamente, no grupo analisado 32 semanas após irradiação notou-se grande desestruturação do tecido. De forma específica percebe-se a fragmentação severa das miofibrilas dos cardiomiócitos e a separação e desalinhamento das miofibrilas mais íntegras, com diminuição ou desaparecimento de alguns sarcômeros, conduzindo a um comprometimento estrutural das unidades contrácteis.

Outra característica observada com freqüência nos cardiomiócitos do grupo irradiado foi a perda da integridade mitocondrial. Essas organelas se apresentaram com membranas desestruturadas e conteúdo eletrondenso. Não foram visualizadas cristas na maioria das organelas (Figura 6).

Os resultados das análises quantitativas confirmaram os achados. A porcentagem da área com CCE foi maior no grupo irradiado de 32 semanas, representando mais de 13% das áreas analisadas do tecido irradiado, em comparação com os demais (Gráfico 1).

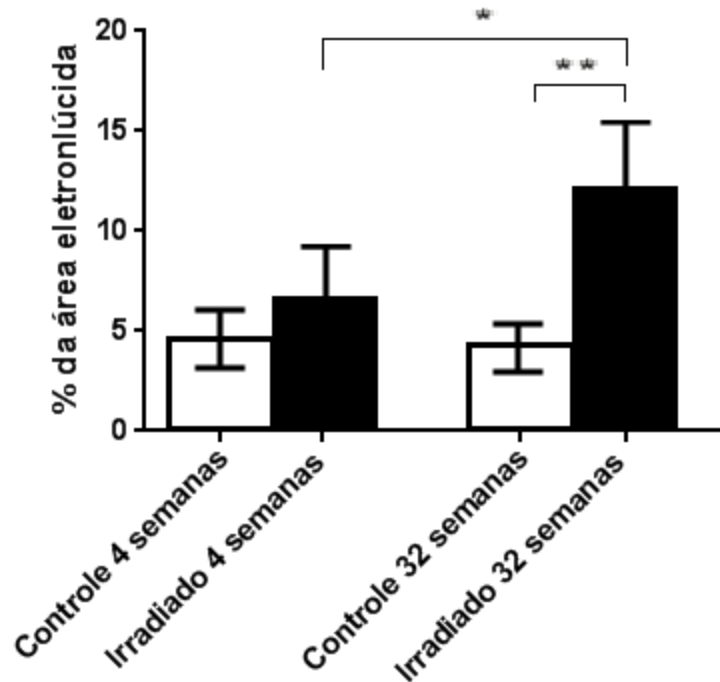
De forma geral, a ultraestrutura do tecido cardíaco apresentou-se marcadamente comprometida entre amostras irradiadas, indicando uma significativa lesão tecidual radioinduzida.

Figura 6 - Fotomicrografias de amostras de tecido cardíaco controles e irradiadas.



Nota: A: grupo controle de 4 semanas exibiu mitocôndrias íntegras alternadas entre feixes de miofibrilas paralelos entre si, constituindo sarcômeros preservados. B: grupo irradiado de 4 semanas com algumas mitocôndrias exibindo perda, desorganização e fragmentação das cristas. C: apesar de o grupo controle de 32 semanas apresentar sarcômeros organizados e membrana externa mitocondrial evidente (seta negra), é possível observar que as miofibrilas apresentam alguns trechos descontínuos, com diminuição da densidade dos feixes (seta branca). D: grupo irradiado de 32 semanas, mostrando redução na densidade das miofibrilas (seta branca), aumento expressivo do CCE entre miofibrilas e mitocôndrias (seta negra) e mitocôndrias extremamente eletrondensas. E: mitocôndria do grupo controle de 32 semanas; notar a integridade da membrana externa (seta negra) e das cristas mitocondriais (seta branca) com padrão normal longitudinal / linear evidente. F: mitocôndria do grupo irradiado de 32 semanas; notar a possível degeneração da membrana externa (seta negra), matriz eletrondensa e cristas não definidas ou ausentes (seta branca), notar ainda, a pouca associação da organela com os miofilamentos. G: organização e preservação nas miofibrilas do grupo controle de 32 semanas (seta branca). H: grupo irradiado de 32 semanas; observar a redução da densidade e espaçamento das miofibrilas (seta branca). Barras: A-D = 1 μ m, E-F = 200nm, G-H = 250nm.

Gráfico 1 - Análise quantitativa da área em fotomicrografia com conteúdo citoplasmático eletrólucido.



Nota: Houve diferença significativa entre o tecido cardíaco de animais controles e irradiados de 32 semanas. Os dados são expressos como média das áreas, sendo N=20. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. (*) = $p \leq 0,05$, (**) = $p \leq 0,01$.

4.2 Respiração mitocondrial 4 semanas após irradiação

No estudo da respiração mitocondrial foram analisados os seguintes parâmetros respiratórios: taxa respiratória basal, antes da adição de adenosina difosfato (ADP) (estado 2), taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (estado 4). Os substratos glutamato, malato e succinato, foram adicionados para a análise dos complexos I e II da CR.

Um exemplo dos gráficos obtidos no oxígrafo em relação aos parâmetros da respiração mitocondrial, estimulados por meio da adição de substratos é apresentado no gráfico 2.

O tratamento estatístico dos grupos analisados 4 semanas após irradiação não mostrou diferença significativa no consumo de O_2 pelas mitocôndrias do tecido

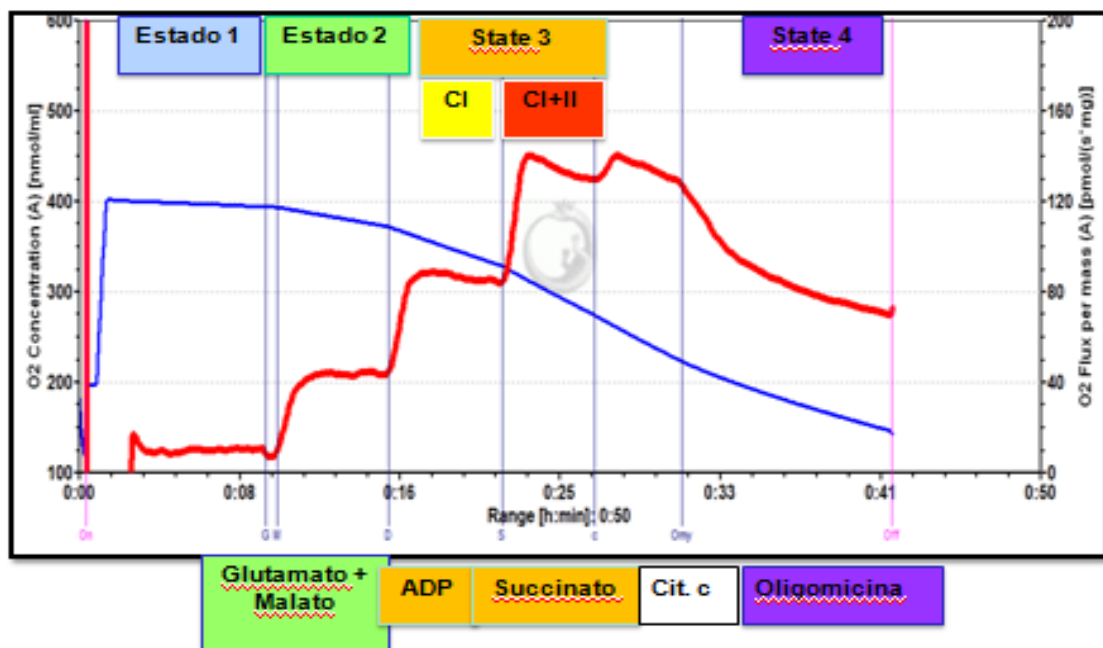
cardíaco, mas foi notada uma tendência na redução deste consumo para todos os estados respiratórios (Gráfico 3).

A falta de um aumento significativo na respiração após a adição de citocromo c indica que a membrana mitocondrial externa ainda se apresenta íntegra.

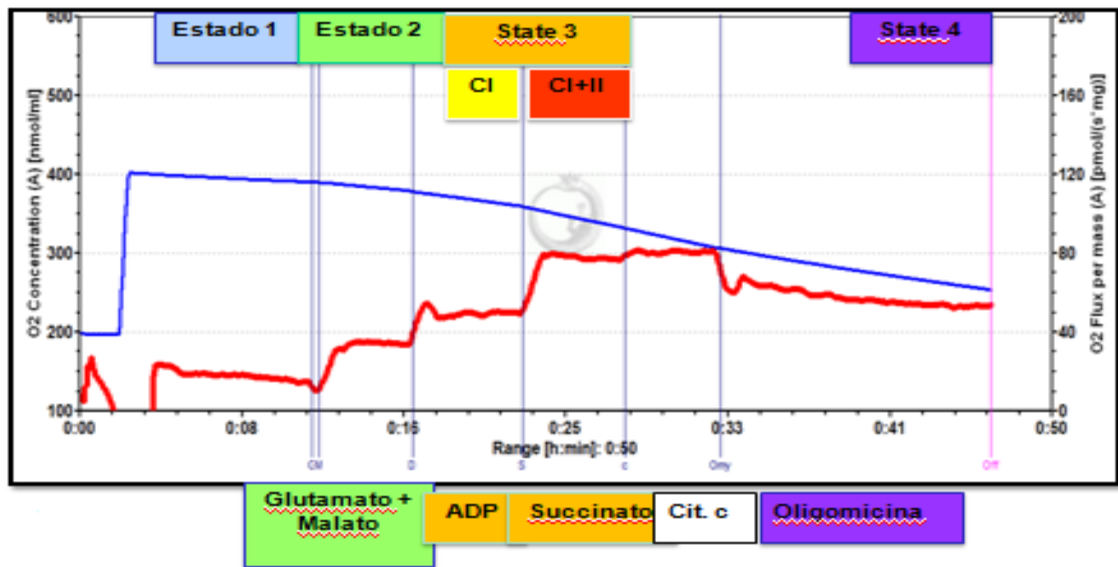
Um mês após irradiação os valores encontrados de RCR foram: 1,80 para o grupo controle e 1,70 para o grupo irradiado, indicando em ambos os casos acoplamento mitocondrial satisfatório. Para este parâmetro não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle (Gráfico 4).

Gráfico 2 - Gráficos originais típicos do oxígrafo dos grupos controle e irradiado.

A

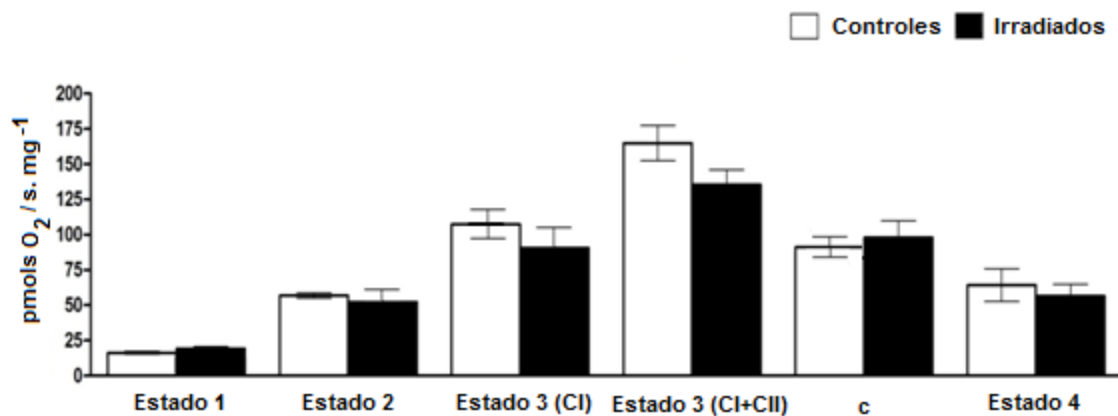


B



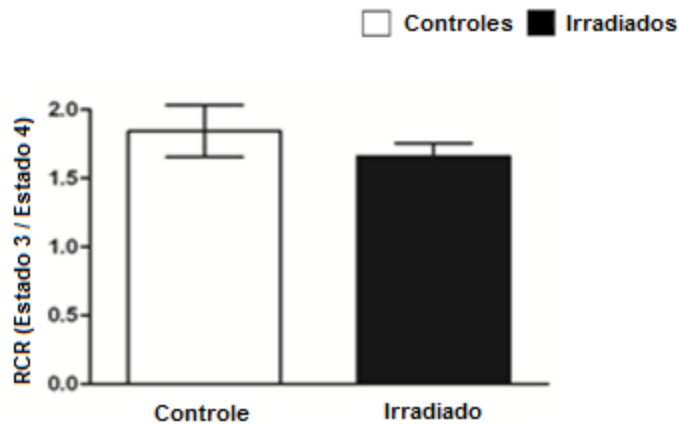
Nota: Eixo Y da esquerda (linha azul): concentração de oxigênio na câmara. Eixo Y da direita (linha vermelha): fluxo de oxigênio. Eixo X: tempo em horas e minutos. Estado 1: ausência de substratos; Estado 2: Glutamato+Malato; Estado 3 (CI): Glutamato+Malato+ADP; 3 (CI+II): Glutamato+Malato+ADP+Succinato; Cit. c: Citocromo c; Estado 4: Oligomicina.

Gráfico 3 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas de animais controles e irradiados (grupo 4 semanas).



Nota: O consumo de oxigênio não apresentou diferença significativa para nenhum estado da respiração mitocondrial no coração dos animais irradiados. c = citocromo c. Os dados são expressos como média e erro padrão da média. N=12. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

Gráfico 4 - Razão do controle respiratório (RCR) de animais controles e irradiados (grupo 4 semanas).



Nota: Não houve diferença significativa entre as RCRs das amostras controles e irradiadas. Os dados são expressos como média e erro padrão da média. N=12. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

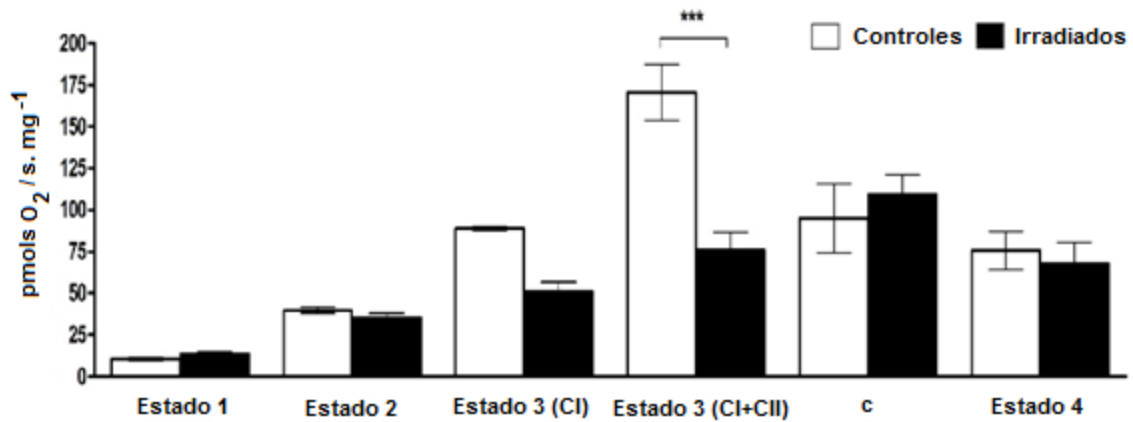
4.3 Respiração mitocondrial 32 semanas após irradiação

O tratamento estatístico dos dados mostrou redução significativa no consumo de O_2 no tecido cardíaco de animais irradiados, para o estado 3 (C1+CII) da respiração mitocondrial, após a adição de succinato, que associado ao ADP estimulou os complexos I e II da CR. Esta redução foi de 42,85% ($p < 0,001$). Para os demais estados da respiração mitocondrial não houve diferença significativa no consumo de O_2 entre amostras irradiadas e controles (Gráfico 5).

Os valores encontrados de RCR foram: 1,75 para o grupo controle e 1,25 para o grupo irradiado. A RCR apresentou diferença significativa entre os grupos, com um melhor acoplamento das mitocôndrias do grupo controle (Gráfico 6).

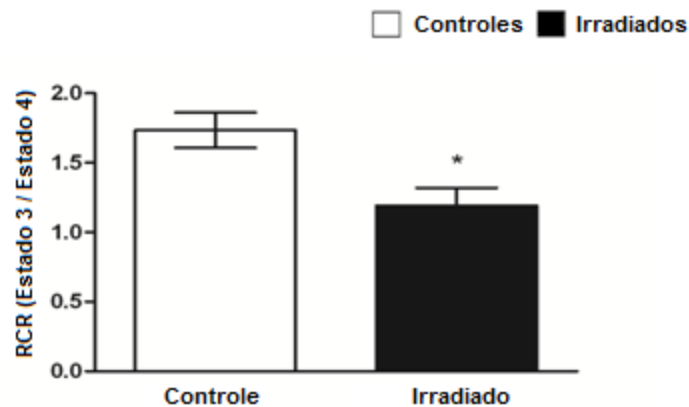
Apesar de ter sido observado o aumento do consumo de oxigênio nas mitocôndrias dos animais irradiados após a adição de citocromo c, o que indicaria comprometimento da integridade da membrana mitocondrial externa, este resultado não apresentou significância estatística.

Gráfico 5 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas de animais controles e irradiados (grupo 32 semanas).



Nota: O consumo de oxigênio diminuiu em 42,85% no estado 3 (CI+CII) da respiração mitocondrial no coração dos animais irradiados. c = citocromo c. Os dados são expressos como média e erro padrão da média. N=12. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. (***) = $p \leq 0,001$.

Gráfico 6 - Razão do controle respiratório (RCR) de animais controles e irradiados (grupo 32 semanas).



Nota: Os valores encontrados foram: 1,75 pra o grupo controle e 1,25 para o grupo irradiado, indicando melhor acoplamento do grupo controle durante a respiração mitocondrial. Os dados são expressos como média e erro padrão da média. N=12. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. (*) = $p \leq 0,05$.

4.4 Padronização da análise proteômica

4.4.1 Quantificação e qualificação de proteínas, perfil de separação em eletroforese bidimensional (2D) e ajustes da focalização isoeétrica

Os resultados retratados a seguir referem-se à padronização do protocolo para análise proteômica de tecido cardíaco de ratos Wistar. As amostras empregadas na padronização foram oriundas de animais não irradiados, saudáveis e que não faziam parte do grupo controle.

Primeiramente, foram realizados ensaios de extração de proteínas totais utilizando dois tampões cujas composições eram: a) uréia 7 M, tiouréia 2 M, Tris 30 mM e CHAPS 4%, pH 8,5 e b) uréia M, Tris 30 mM e CHAPS 4%, pH 8,5. A finalidade desta etapa foi avaliar possíveis perdas quantitativas e qualitativas de proteínas totais.

Para analisar a ocorrência de perdas quantitativas foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (*kit* Bio-Rad) em duas situações distintas: após a extração e após precipitação das proteínas, alternando os tampões, como descrito nos itens 3.7.1 e 3.7.2. Os resultados finais das concentrações de proteínas em cada amostra são exibidos na figura 7.

Figura 7 - Rendimento protéico antes e após a precipitação.

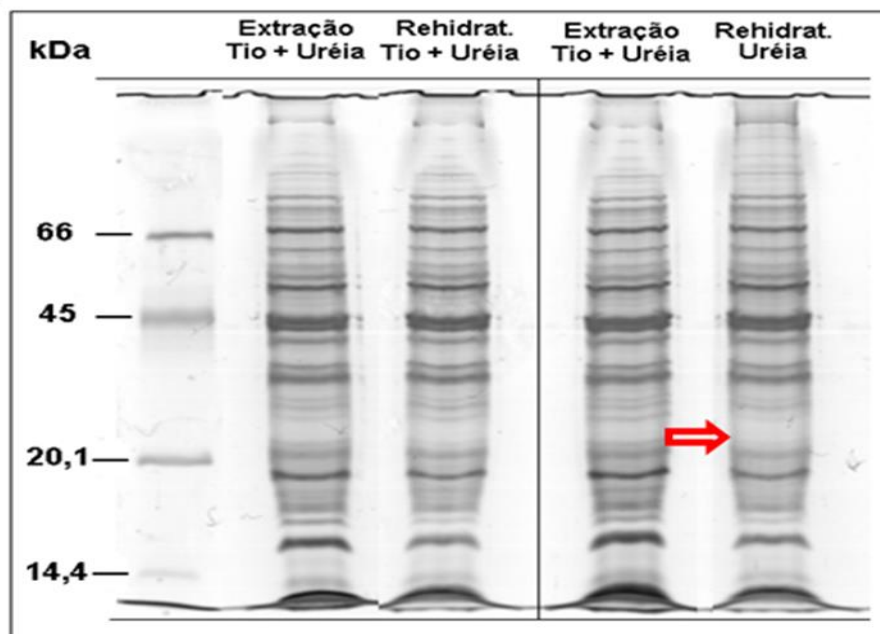
<u>Antes da precipitação</u>			<u>Após a precipitação</u>	
Amostra	mg/ml		Amostra	mg/ml
A1	11,6	⇒	A1/A	9,5
B1	9,0		B1/A	5,8
A2	10,3	⇒	A2/B	7,1
B2	9,0		B2/B	5,4

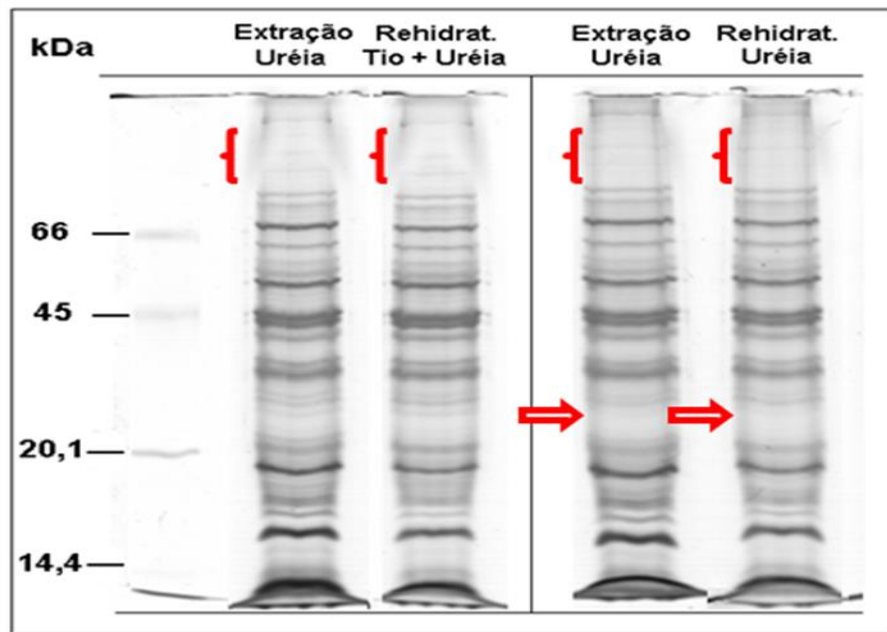
Nota: Em destaque no quadro vermelho, a amostra que obteve menor perda de proteínas após a precipitação.

A ocorrência de perdas qualitativas foi avaliada por eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida 12%, com a visualização do perfil protéico por meio da separação por peso molecular. O objetivo desta etapa foi investigar se a perda quantitativa, devido à precipitação, conduziu a uma perda de proteínas de baixa abundância na célula, fato que pode ser analisado pela ausência de “bandas” no gel (Figura 8).

A análise comparativa dos géis revelou que nas amostras em que o “tampão B” havia sido usado para extração e/ou rehidratação, algumas bandas, originalmente pouco representativas, desapareceram indicando a perda de proteínas que estão em baixa abundância na célula.

Figura 8 - Análise qualitativa de proteínas na etapa de padronização.





Nota: O perfil protéico muda de acordo com o tampão empregado na extração e rehidratação após a precipitação. Os parênteses indicam regiões de perda de proteínas de alto peso molecular pós a utilização do “tampão B” e as setas indicam perdas de bandas específicas.

Além de perdas quantitativas e qualitativas, as amostras extraídas e/ou rehidratadas com os tampões A e B também foram avaliadas quanto ao perfil de separação em eletroforese 2D (Figura 9). *Strips* com faixa pH 3-11, não linear, e comprimento de 7 cm foram utilizadas.

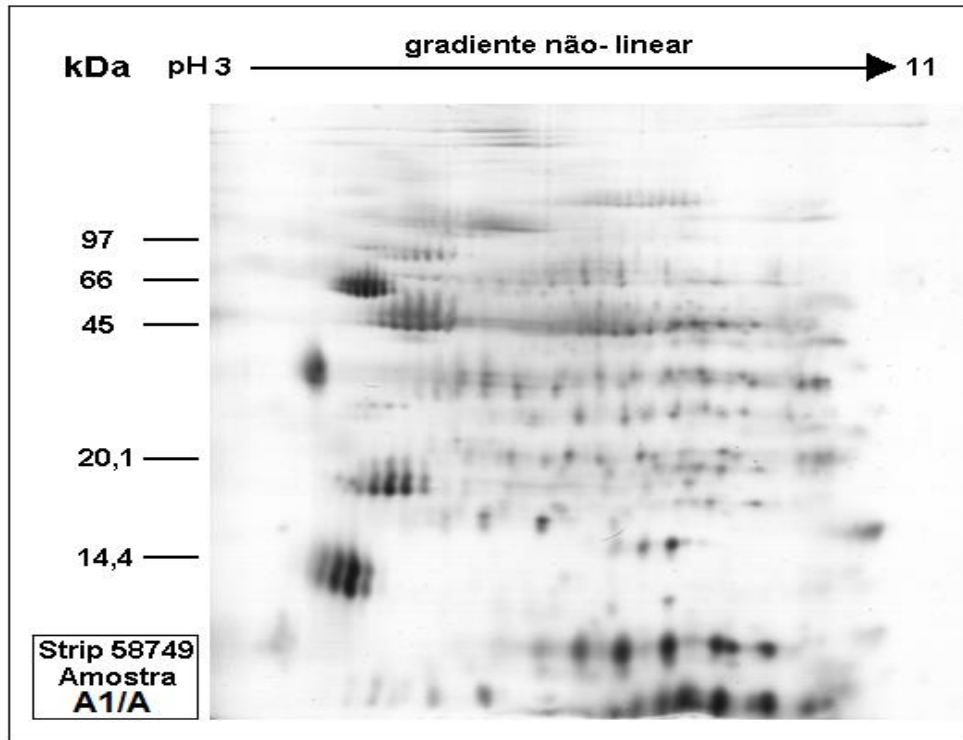
Os seguintes pontos foram observados nos géis 2D em relação aos *spots*: qualidade da resolução, quantidade, duplicação e arrastes horizontais e verticais.

De acordo os parâmetros avaliados, o perfil de separação das amostras A1/A (extraída e rehidratada no tampão A) e A2/B (extraída no “tampão A” e rehidratada no “tampão B”) foram os mais satisfatórios, apesar de não terem atendido a todos os requisitos, uma vez que é possível observar alguns arrastes nos *spots* do gel em que a amostra A1/A foi aplicada e algumas duplicações de *spots* no gel onde a amostra A2/B foi aplicada.

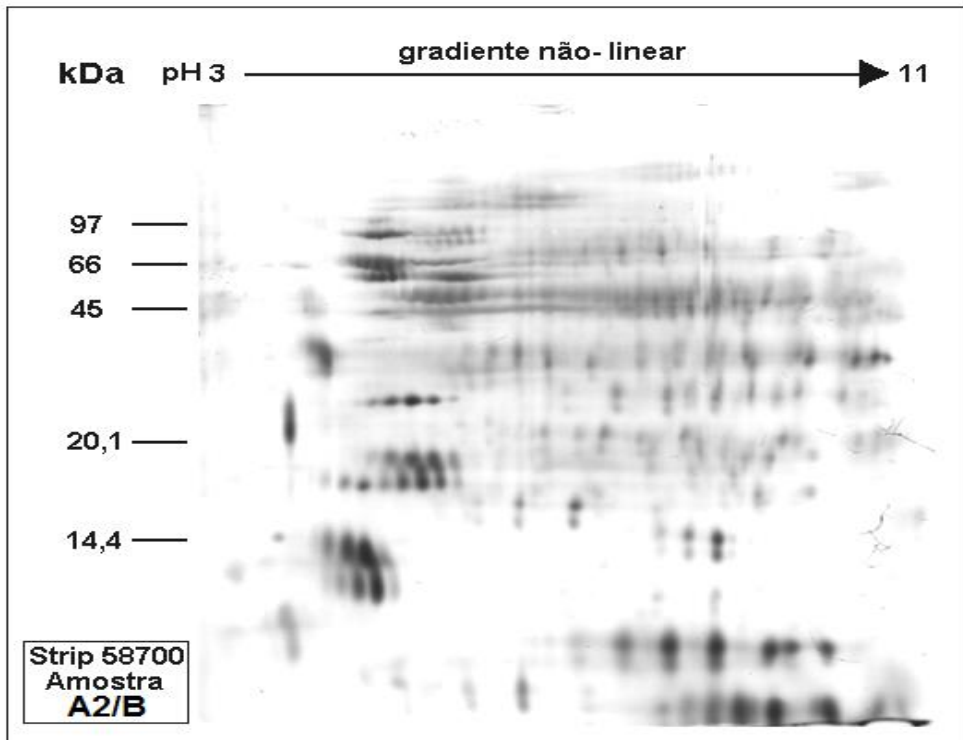
Entretanto, para fins de padronização do protocolo, o “tampão A” foi escolhido tanto para extração quanto para rehidratação das proteínas de tecido cardíaco de ratos Wistar, pois levou-se em conta também os testes de perdas quantitativas e qualitativas em que este tampão mostrou melhores resultados.

Figura 9 - Eletroforese 2D da etapa de padronização.

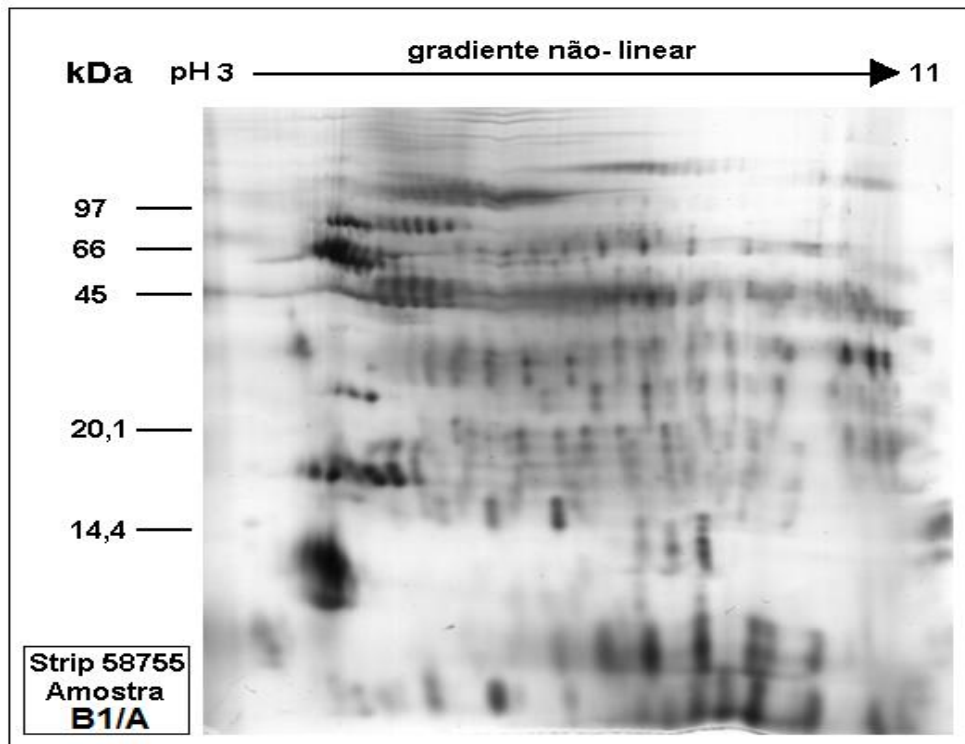
A



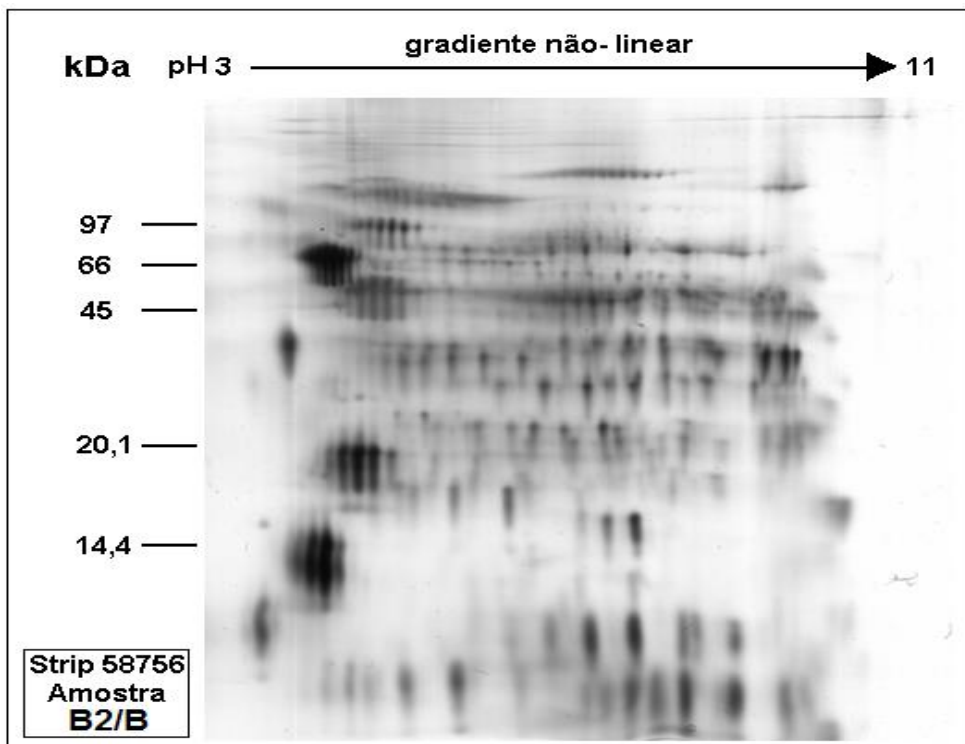
B



C



D



Nota: A: perfil protéico da amostra A1/A. B: perfil protéico da amostra A2/B. C: perfil protéico da amostra B1/A. D: perfil protéico da amostra B2/B.

A última etapa da padronização consistiu em ajustes nos parâmetros da focalização isoeétrica. O objetivo foi encontrar o protocolo que garantisse boa separação das proteínas do tecido cardíaco de acordo com os seus pontos isoeétricos. Para tanto, três testes foram elaborados, cujos parâmetros estão descritos no item 3.7.4.

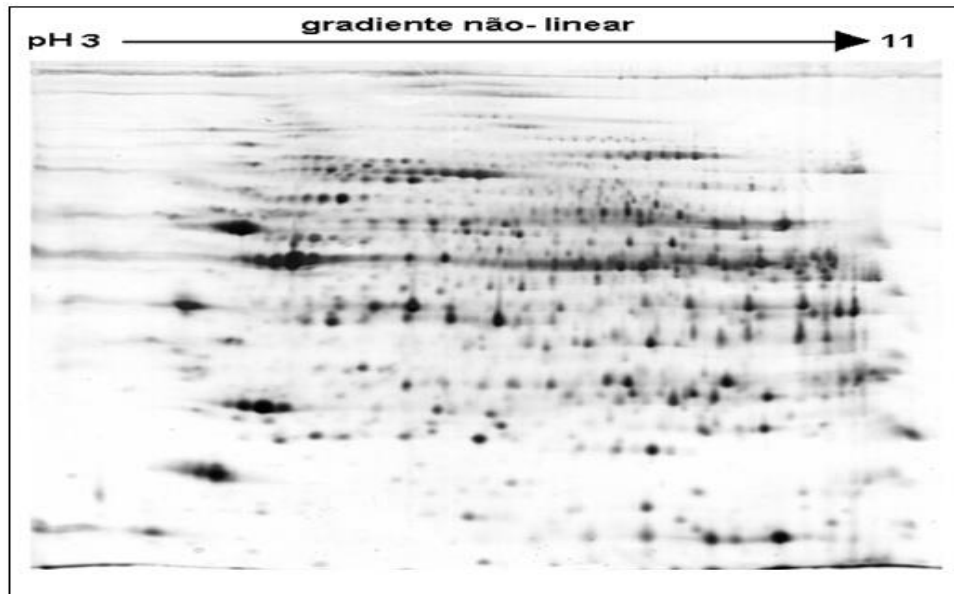
Todos os testes foram realizados com a amostra A1/A, escolhida por apresentar bons resultados quanto à avaliação dos tampões de extração e rehidratação. Esta amostra foi aplicada em *strips* com faixa pH 3-11, não linear, e comprimento de 18 cm que permitem a ampliação da faixa de separação das proteínas.

Novamente, os seguintes pontos foram observados nos géis 2D em relação aos *spots*: qualidade da resolução, quantidade, duplicação e arrastes horizontais e verticais. Os resultados são mostrados na figura 10.

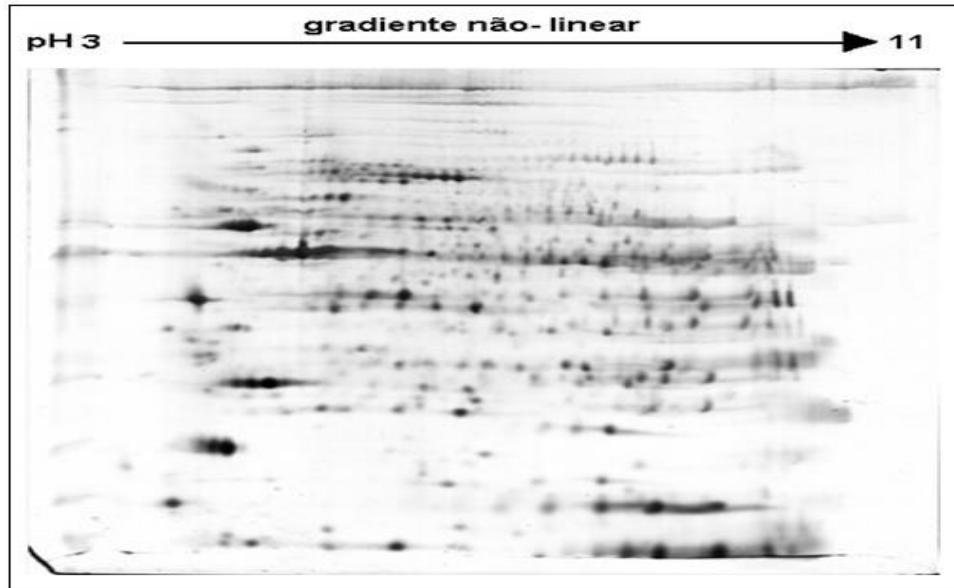
O melhor perfil de separação foi obtido a partir do seguinte protocolo a 20 °C: 30 V/12 horas, 100 V /1 hora, 500 V/ 1 hora, 2000-8000 V/ 1 hora e 8000 V até ser atingido um máximo de 40000 Vhs e 50 μ A. A eletroforese 2D deste ensaio resultou em um gel de poliacrilamida mais informativo em relação aos géis resultantes dos outros dois protocolos testados, e com perfil proteômico satisfatório. Sendo assim, foi estabelecido como protocolo padrão para a focalização isoeétrica de proteínas totais de tecido cardíaco de ratos Wistar.

Figura 10 - Padronização da focalização isoeétrica.

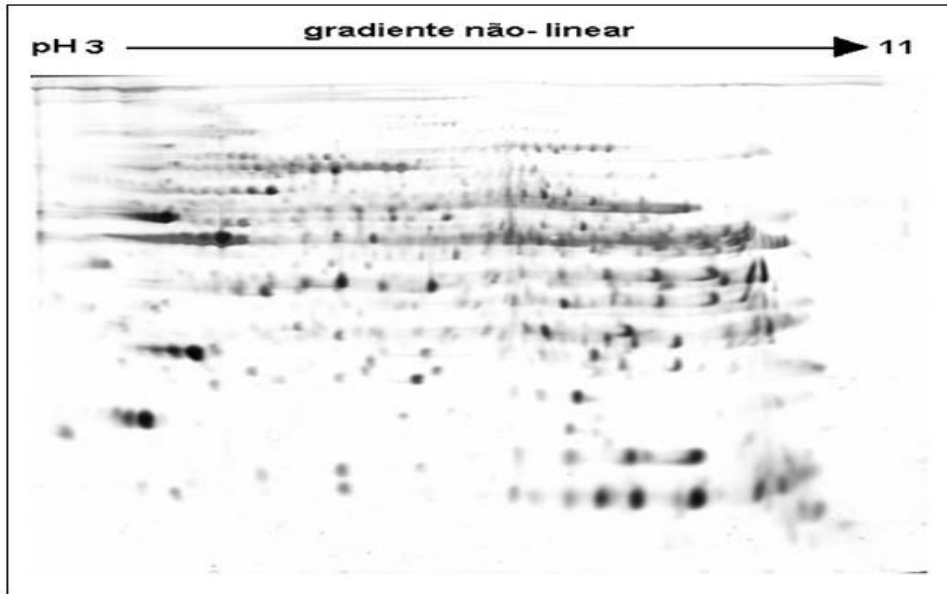
A



B



C



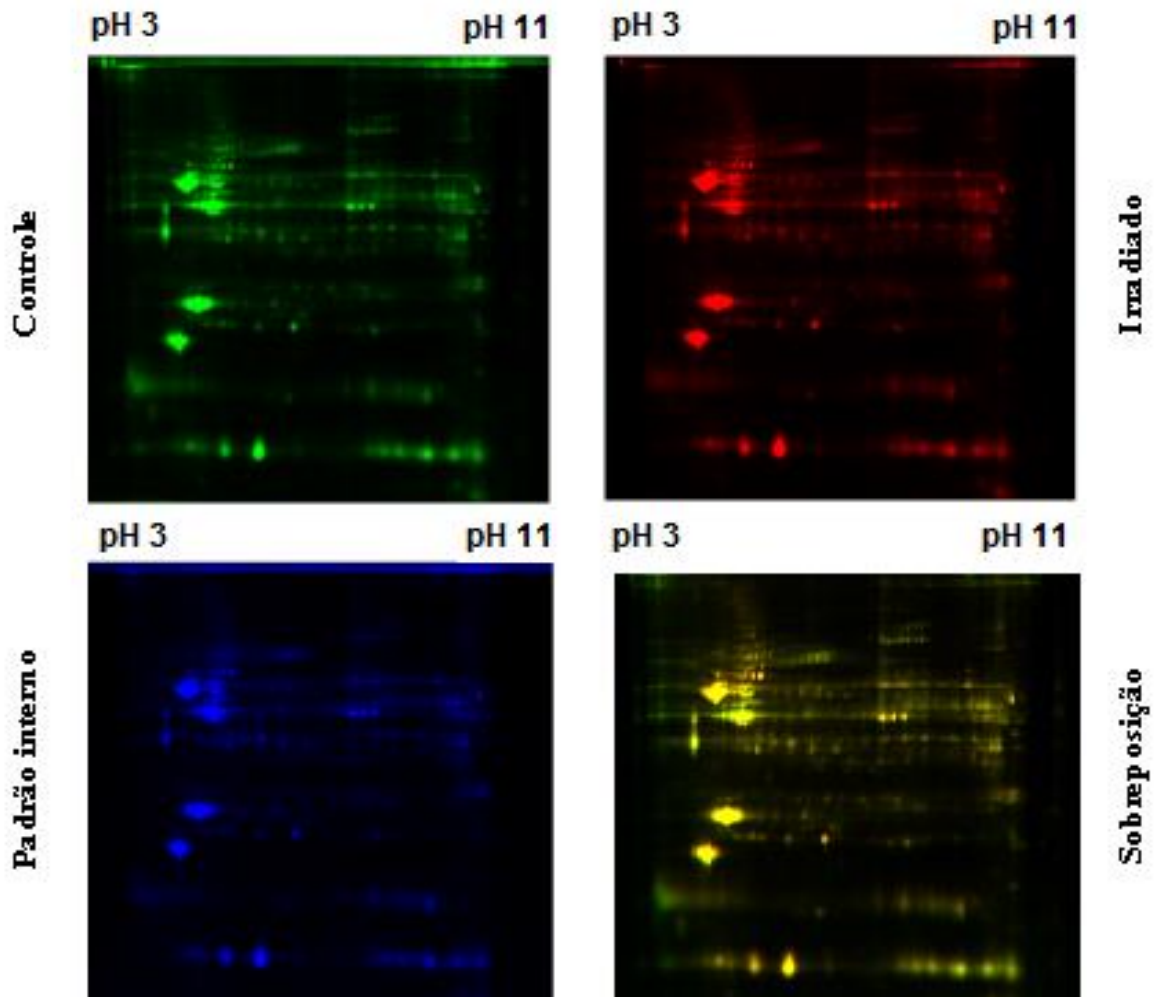
Nota: A, B e C correspondem a diferentes perfis de separação de proteínas que variam de acordo com as condições dadas na focalização isoeétrica, sendo A o perfil representativo do protocolo padrão escolhido na padronização.

4.5 Análise proteômica das amostras experimentais

4.5.1 Análise de proteínas por DIGE

Através do mapa protéico do tecido cardíaco obtido por meio do sistema DIGE (*2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*) não foi possível detectar spots de proteínas diferencialmente expressas entre as réplicas biológicas dos animais controles e irradiados analisados 32 semanas após irradiação. A seguir são mostrados os géis de poliacrilamida representativos do mapa proteômico de tecido cardíaco de ratos Wistar, com as proteínas marcadas com diferentes fluoróforos. Quatro réplicas biológicas foram utilizadas (Figura 11).

Figura 11 - Eletroforese 2D do sistema DIGE com 4 réplicas biológicas.



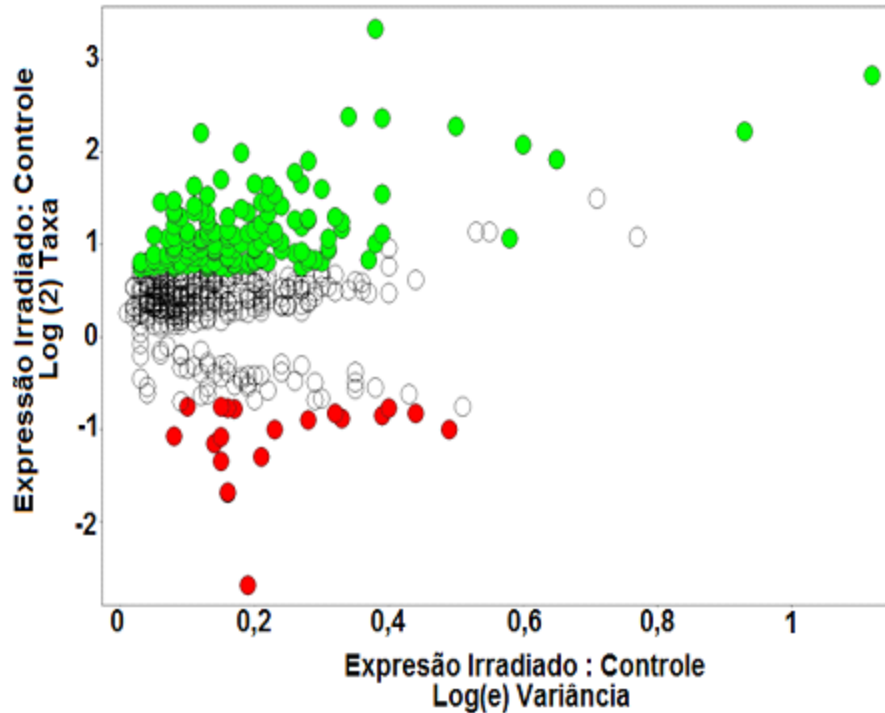
Nota: Neste experimento 50 μg de extrato controle foi marcado com Cy3 (verde) e 50 μg do extrato irradiado com Cy5 (vermelho). A sobreposição foi realizada com as imagens de Cy3 e Cy5. O padrão interno do experimento, que corresponde a um *pool* (50 μg) de todos os extratos utilizados na análise, foi marcado com Cy2 (azul). Quatro réplicas biológicas foram utilizadas, entretanto na figura é mostrada apenas uma das réplicas.

4.5.2 Análise de proteínas *Label-free* por espectrometria de massas

A análise de expressão diferencial de proteínas *Label-free* por espectrometria de massas considerou um total de 161 proteínas diferencialmente expressas (Apêndice A), sendo que destas, 144 apresentaram aumento de expressão (*up regulated*) e 17 tiveram expressão reduzida (*down regulated*) em resposta a RI

(Gráfico 7).

Gráfico 7 - Taxa de proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e irradiado de 32 semanas.



Nota: Um total de 161 proteínas satisfaz este critério, dentre estas, 17 estavam *down regulated* e 144 estavam *up regulated* comparadas aos controles.

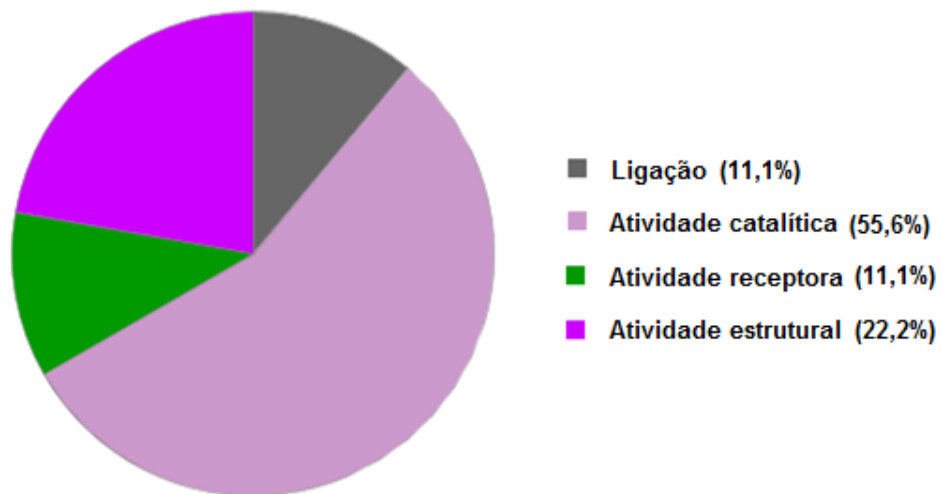
Inicialmente, foi realizada uma análise *in silico* de todas as proteínas diferencialmente expressas, utilizando o software *PHANTER Classification System* para classificá-las em categorias de acordo com a função molecular exercida. Esta análise revelou que proteínas com atividade catalítica representaram a maior categoria, tanto em proteínas *down regulated*, quanto nas *up regulated*. O resultado é mostrado no gráfico 8.

A análise da função molecular mostrou ainda, que as proteínas *down regulated* com atividade catalítica eram igualmente compostas (em 25% cada) de hidrolases, ligases, oxidoredutases e transferases. Por outro lado, as proteínas *up regulated* com atividade catalítica foram compostas principalmente por oxidoredutases (38%), transferases (30%) e hidrolases (18%).

Gráfico 8 - Classificação da função molecular de proteínas diferencialmente expressas em tecido cardíaco irradiado.

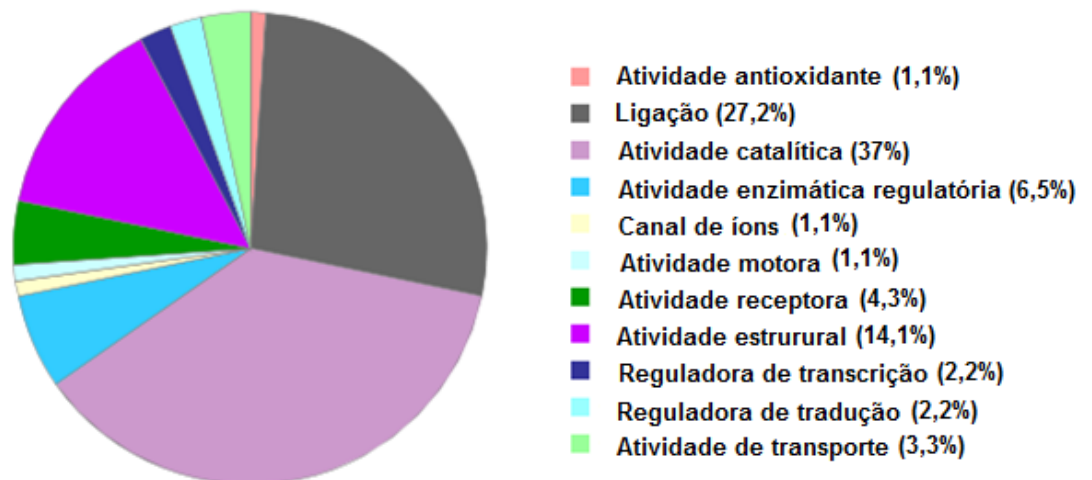
A

Função molecular das proteínas *down regulated* em tecido cardíaco irradiado



B

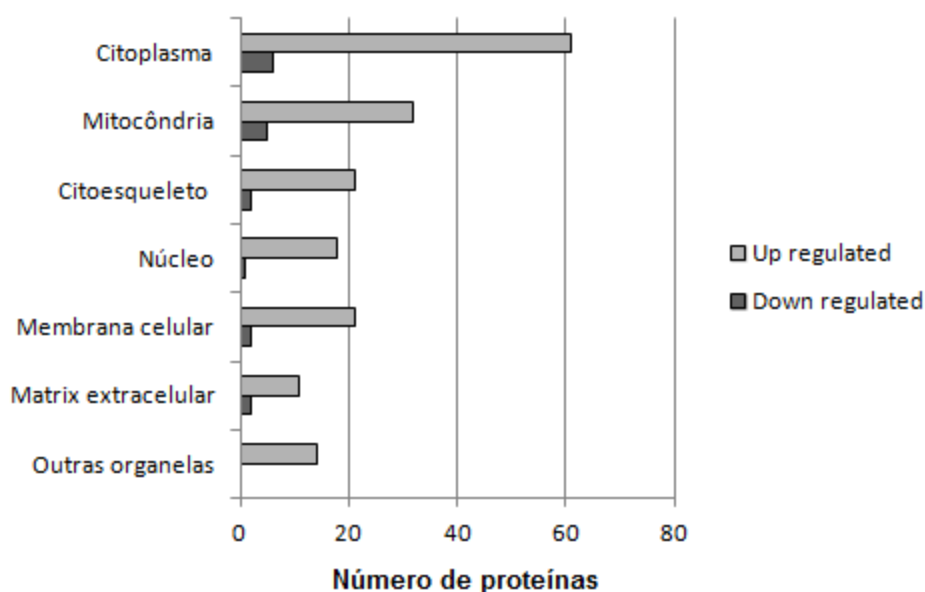
Função molecular das proteínas *up regulated* em tecido cardíaco irradiado



Nota: A: classificação das proteínas *down regulated*. B: classificação das proteínas *up regulated*.

A etapa seguinte consistiu na investigação da localização celular das 161 proteínas diferencialmente expressas no tecido cardíaco irradiado, separando-as em categorias com as informações obtidas para cada uma delas através do banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*. Esta análise informou que as proteínas *up regulated* pertenciam a quatro principais categorias: as que estavam localizadas no citoplasma, nas mitocôndrias, no citoesqueleto e na membrana celular. Ademais, as proteínas *down regulated* seguiram padrão semelhante, pois estavam localizadas, sobretudo, no citoplasma, nas mitocôndrias, no citoesqueleto e igualmente distribuídas na membrana celular e na matriz extracelular (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Localização das proteínas diferencialmente expressas em tecido cardíaco irradiado.



Posteriormente, outra análise *in silico* foi realizada utilizando a versão do software *Reactome* (do banco de dados *Rattus norvegicus*) para verificar as vias/funções biológicas alteradas de forma tardia no tecido cardíaco irradiado, conforme detalhado na seção 3.8.5.1. A partir desta análise, observou-se que as proteínas *up regulated* estavam majoritariamente associadas ao metabolismo energético (Gráfico 10). Algumas proteínas estavam relacionadas com mais de um processo ou mecanismo biológico. Curiosamente, a RI também reduziu os níveis de proteínas associadas ao metabolismo energético, ou seja, este processo biológico

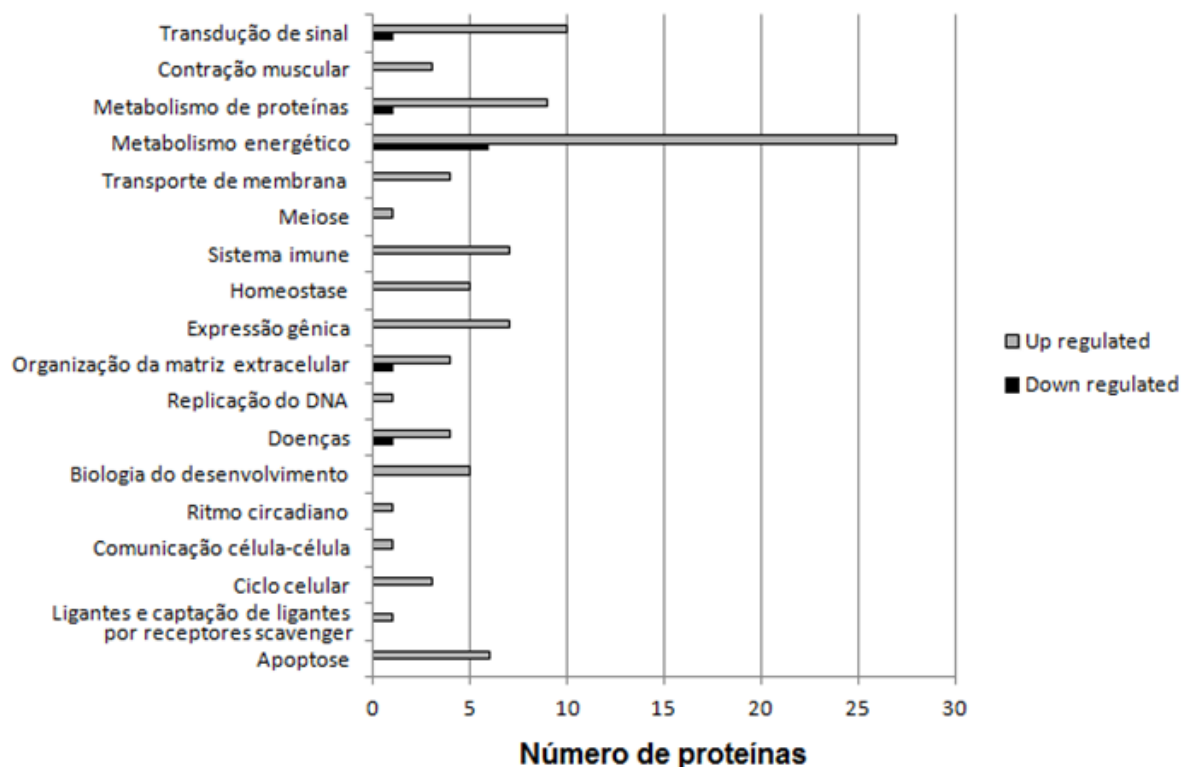
foi duplamente regulado, com proteínas sendo *up regulated* e *down regulated* sob a mesma condição experimental. Neste caso, é importante notar que o algoritmo *Reactome*, semelhante a outros algoritmos, não diferencia as vias específicas ou vias celulares para cada proteína regulada. Assim, esta inconsistência aparente foi devido ao agrupamento de proteínas reguladas nos principais grupos funcionais ou processos biológicos. Portanto, foi necessário observar a função e / ou a via de cada proteína, usando a base de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*.

Para uma análise funcional mais detalhada, apenas o processo “metabolismo energético” foi investigado, levando-se em conta a expressiva quantidade de proteínas diferencialmente expressas envolvidas neste processo. Além da complementação dos resultados obtidos nos ensaios anteriores (análise ultraestrutural e oxigrafia) (Apêndice B).

Alguns exemplos de proteínas *down regulated* em resposta a radiação, relacionadas ao metabolismo energético, são a 17-beta estradiol desidrogenase 8, envolvida na síntese de ácidos graxos na mitocôndria, a carnitina o-acetil transferase, que atua no metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e está envolvida no transporte de acetil CoA para dentro da mitocôndria e a creatina quinase tipo U mitocondrial, que catalisa a formação de fosfocreatina, tendo um importante papel na liberação de energia para tecidos com grande demanda energética, como o tecido cardíaco. Em relação a proteínas *up regulated*, alguns exemplos são a piruvato quinase, que atua na glicólise, a carnitina O-palmitoil transferase 1, que participa do metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa e sua subsequente beta-oxidação, a isocitrato desidrogenase (subunidade beta), que atua no Ciclo de Krebs, as subunidades ATP5I, ATP5E, ATP5H, ATP5L, ATPG, ATPK e ATPO que integram o Complexo V da CR e as subunidades 2 e 3 da NADH desidrogenase (ubiquinona), componentes do Complexo I da CR.

Cabe ressaltar que as três vias do metabolismo energético utilizadas pelo tecido cardíaco (a via do metabolismo de carboidratos, do metabolismo de lipídeos e a via da fosfocreatina) foram reguladas pelo aumento e da redução na expressão de proteínas que integram tais vias.

Gráfico 10 - Processos biológicos associados a proteínas diferencialmente expressas em resposta à RI.



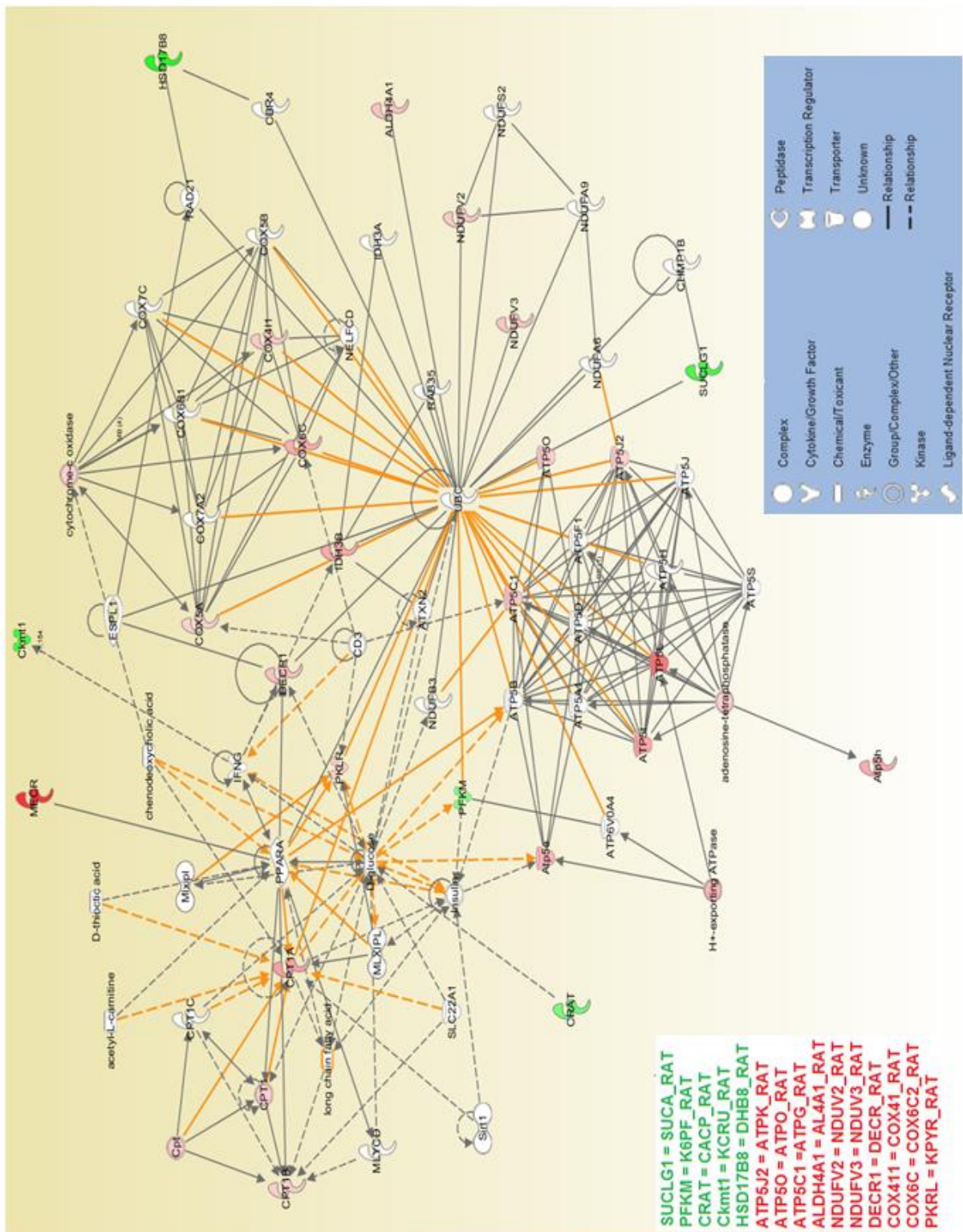
4.5.2.1 Interação proteína-proteína

Com base na análise anterior dos processos biológicos que são regulados após irradiação, foram selecionadas proteínas diferencialmente expressas associadas ao metabolismo energético para avaliação da rede interação. O nome da proteína, os processos / vias e os valores de log (positivos ou negativos), que correspondem à expressão diferencial, estão listados na tabela do apêndice B. Estas proteínas estão envolvidas nas vias do metabolismo de carboidratos, lipídeos e fosfocreatina.

A análise *in silico* foi realizada utilizando-se o software *INGENUITY Pathway Analysis*. A figura 12 ilustra as interações existentes entre as proteínas identificadas. Cada proteína está representada pelo respectivo nome de acesso e nível de expressão (a cor vermelha representa aumento no nível de expressão e a cor verde

redução no nível de expressão). As proteínas destacadas estavam envolvidas, sobretudo, no metabolismo de lipídeos (MERC, DECR, CPT1A, CPT1B e CACP), cadeia respiratória (NDUV2, NDUV3, COX5A, COX41 e CX6C2) e fosforilação oxidativa (ATPK, ATPO, ATPG, ATP5E, ATP5H, ATP5L, ATP5I). Outras interações foram previstas pelo software e integram moléculas, como a glicose e proteínas reguladoras, como a poliubiquitina-c (UBC) e o alfa receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPARA), que é um fator de transcrição ligante-ativado, regulador chave do metabolismo lipídico.

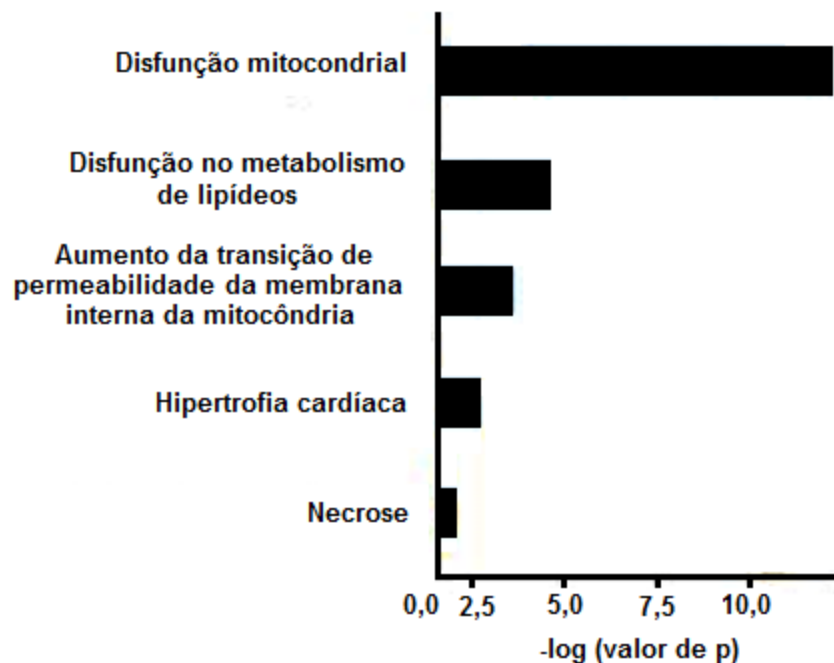
Figura 12 - Rede de interação entre proteínas diferencialmente expressas.



Nota: Todas as proteínas associadas ao processo biológico “metabolismo energético” foram importadas para análise. As proteínas *up regulated* foram marcadas em vermelho e as *down regulated* em verde. Os nós representam proteínas que estão relacionadas com uma ou várias setas. As setas contínuas representam interações diretas e as setas pontilhadas interações indiretas. As interações diretas e previstas foram pesquisadas pelo software.

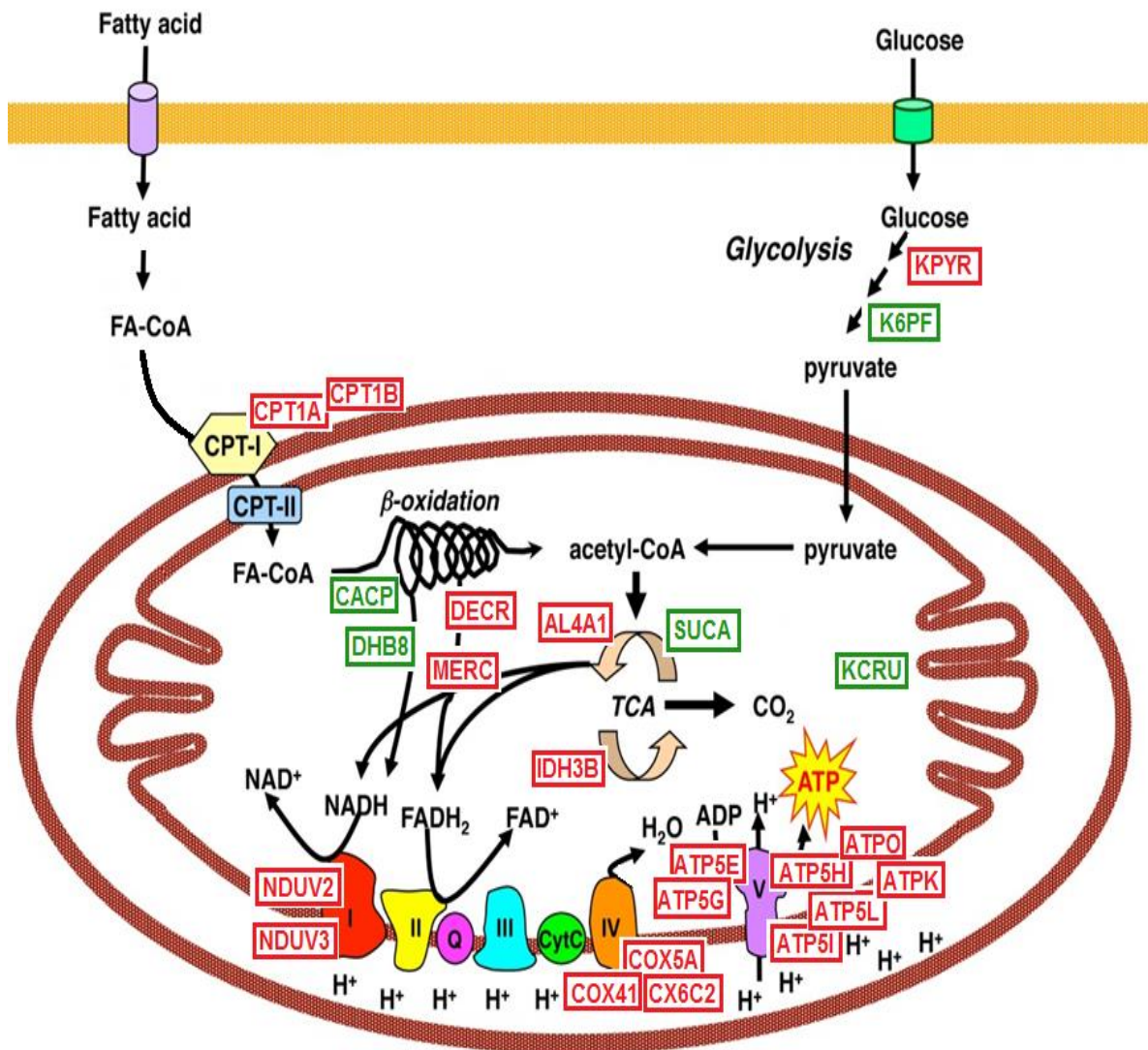
De forma complementar, a opção de análise “TOX IPA” que indica associações de proteínas diferencialmente expressas com vias tóxicas, mostrou que a “disfunção mitocondrial” foi a principal consequência da RI. Outras vias afetadas estão associadas a “disfunção no metabolismo de lipídeos”, “aumento da transição de permeabilidade da membrana interna mitocondrial”, “hipertrofia cardíaca” e “necrose cardíaca” (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Disfunções no tecido cardíaco irradiado, associadas ao processo biológico “metabolismo energético”.



Com o objetivo de melhor compreender a atuação de cada uma das proteínas reguladas em resposta a radiação, assim como as suas localizações dentro das vias do metabolismo energético, foi construído um diagrama representativo da membrana celular, citoplasma e mitocôndria. Percebe-se por meio deste diagrama, que no tecido cardíaco, as três vias do metabolismo energético são reguladas após irradiação, entretanto, a via do metabolismo lipídico é a que apresenta maior número de proteínas diferencialmente expressas, e conseqüentemente sofre maior regulação, o que corrobora com os dados obtidos pelo *software Ingenuity Pathway*.

Figura 13 - Diagrama representativo da membrana celular, citoplasma e mitocôndria, ilustrando a atuação das proteínas diferencialmente expressas.



Nota: As proteínas *down regulated* estão destacadas em verde e as *up regulated* em vermelho. Ver a descrição das proteínas no apêndice B.

Fonte: A autora, 2013.

5 DISCUSSÃO

A cardiotoxicidade é uma das complicações mais relevantes da radioterapia para tumores localizados na região torácica. As disfunções cardíacas são progressivas, e manifestam-se clinicamente vários anos após a exposição do órgão à radiação.²³ O aumento da morbidade é notório, quando se comparam pacientes expostos à radioterapia com pacientes que não receberam esse tratamento. Aproximadamente 25% dos sobreviventes de linfoma de Hodgkin, desenvolvem complicações cardíacas, que podem levar a óbito.⁴⁸ Em pacientes que receberam radioterapia para o câncer de mama, a chance de mortalidade, decorrente de complicações cardíacas é de 27%.¹³

Apesar de haver muitos esforços direcionados para predição do risco de cardiotoxicidade, até o momento não existe consenso sobre as estratégias para prevenir, mitigar e/ou controlar o efeito tardio radioinduzido. A pouca compreensão sobre o desenvolvimento da cardiotoxicidade dificulta ainda mais sua detecção, por isso, os estudos a respeito das complicações cardíacas induzidas pela radioterapia despertam grande interesse dos pesquisadores e é também o foco do presente trabalho.

Para este estudo foi desenvolvido um modelo experimental em ratos Wistar submetidos a uma dose única de RI (20 Gy), direcionada ao coração, sendo analisadas amostras de tecido cardíaco 4 semanas e 32 semanas após irradiação.

A escolha da dose e a forma como foi administrada nos animais deste estudo é justificada nos dados obtidos em trabalhos anteriores. Nestes ensaios, especialmente em ratos, a irradiação é realizada com dose única, geralmente em torno de 20 Gy.⁴⁹ Exposição a doses únicas, não representa a estratégia empregada na clínica com pacientes, na qual é comum aplicar diariamente uma dose terapêutica total em doses fracionadas. No tratamento do câncer de mama, por exemplo, a dose total aplicada é de 45-50 Gy, sendo fracionada em doses de 1,8-2,0 Gy durante 5 a 6 semanas em média. Entretanto, utilizando um modelo linear quadrático, doses únicas de 20 Gy, podem ter seus efeitos biológicos equivalentes a uma dose total de 50 Gy, fracionada em doses de 2 Gy, tanto em pacientes quanto em modelos experimentais.⁸⁹

Em relação aos tempos escolhidos para análise em modelo animal, buscou-

se retratar as modificações iniciais (4 semanas) e tardias (32 semanas), de forma comparativa às que ocorrem em resposta à irradiação em humanos, em função do tempo médio de vida do animal (rato Wistar), que é em torno de 25 meses.^{90;91}

Para compreender os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento das complicações cardíacas, diversos estudos experimentais têm sido feitos. Muitos destes apontam o envolvimento do metabolismo oxidativo mitocondrial na gênese e evolução destas enfermidades.^{77;88} Observou-se que mudanças persistentes no metabolismo mitocondrial podem mediar as respostas à RI, conduzindo ao posterior desenvolvimento de doenças cardiovasculares.⁷⁷ Entretanto, há carência de estudos que avaliem a longo prazo o papel do metabolismo oxidativo mitocondrial no contexto da radioterapia. Com base nesta observação, o presente estudo se propôs a acompanhar *in vivo*, os seguintes parâmetros: (a) a ultraestrutura do tecido cardíaco, especialmente das mitocôndrias, (b) a taxa respiratória mitocondrial, que determina a sua funcionalidade desta organela, uma vez que exercem papel fundamental no metabolismo oxidativo, e por fim, (c) o proteoma do tecido cardíaco irradiado, com o intuito de investigar as vias biológicas acionadas após irradiação e fornecer informações mais amplas a respeito dos efeitos da RI no tecido cardíaco.

De fato, com os resultados obtidos a partir dos ensaios supracitados, observou-se que a radioterapia, induz efeitos adversos, sobretudo a nível mitocondrial. Os primeiros indícios foram revelados pela análise ultraestrutural do tecido cardíaco.

As mudanças iniciais (4 semanas após irradiação) foram caracterizadas por um pequeno grau de desorganização, fragmentação e perda das cristas de algumas mitocôndrias, além de um aumento discreto de CCE entre mitocôndrias e entre feixes de miofibrilas. Dando seguimento às análises, observou-se que como efeito tardio, a radiação desencadeia lesões muito mais pronunciadas, com grande desestruturação tecidual e comprometimento das mitocôndrias, o que caracteriza tais lesões como de caráter progressivo. Trinta e duas semanas após a irradiação notou-se a perda da integridade mitocondrial. As organelas apresentaram membranas desestruturadas, conteúdo extremamente eletrondenso e não foram visualizadas cristas na maioria delas. Ademais, o tecido possuía fragmentação severa das miofibrilas, com diminuição ou desaparecimento de alguns sarcômeros e grandes áreas preenchidas por CCE. Estas áreas foram quantificadas, representando mais de 13% das áreas analisadas do tecido cardíaco, em

comparação com os controles do mesmo período. Os resultados estatísticos mostraram ainda, que com o passar do tempo as áreas de CCE aumentaram entre amostras irradiadas, indicando o progresso contínuo das lesões.

É provável que o aumento das áreas com CCE seja devido à degeneração das miofibrilas, que outrora ocuparam estas áreas. Uma grave consequência da degeneração das miofibrilas é o comprometimento estrutural das unidades contrácteis do tecido. Estes componentes do citoesqueleto podem ser afetados por ROS provenientes da interação da RI com o meio biológico, tanto que a associação entre remodelação de proteínas do citoesqueleto e estresse oxidativo, tem sido bem documentada. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são conhecidas por causarem modificações pós-traducionais em proteínas, incluindo carbonilação, que pode ocorrer diretamente por meio da oxidação das cadeias laterais de aminoácidos ou indiretamente por meio da adição de produtos da oxidação de lipídeos, tais como o malonaldeído (MDA).⁹² Ainda, tem sido mostrado que a carbonilação precede a degradação de proteínas,⁹³ ou alterações funcionais nestas.⁹⁴ Já foi revelado, por exemplo, que a oxidação de actina resulta em uma forte inibição da polimerização desta proteína, conduzindo a desorganização de miofilamentos e rompimento dos mesmos.⁹⁵ Modificações pós-traducionais de algumas proteínas estruturais têm sido consideradas características de diversas doenças cardíacas, tais como falha cardíaca,⁹⁶ cardiopatia hipertrófica⁹⁷ e distrofia⁹⁸

A associação do citoesqueleto com as mitocôndrias também é conhecida há muitos anos e numerosos estudos sugerem que o citoesqueleto esteja envolvido na manutenção da morfologia destas organelas, movimento, localização, transdução de sinal, além de auxiliar na função.⁹⁹⁻¹⁰² Um trabalho experimental mostrou que a inativação do gene da desmina, em tecido cardíaco de camundongos, resultou em mitocôndrias com anormalidades morfológicas, distribuição irregular e função alterada.¹⁰³

Neste estudo, com relação ao aspecto ultraestrutural das mitocôndrias, é importante ressaltar que a falta de delimitação das membranas e das cristas, observadas como efeito tardio da radiação, sugere um processo degenerativo. Sabe-se que no espaço intermembranoso encontram-se muitas moléculas capazes de deflagrar a apoptose e que na membrana interna estão ancoradas enzimas que participam do processo de fosforilação oxidativa, no qual, a energia para a síntese de ATP é gerada por reações de oxidação na cadeia transportadora de elétrons,⁶⁷

portanto, alterações nas membranas podem tanto conduzir a morte celular, como a um déficit energético na célula (sendo este último evento observado no ensaio de respiração mitocondrial, discutido mais adiante). Outra característica que deve ser ressaltada é a extrema eletrondensidade das mitocôndrias do tecido irradiado. Este aspecto foi descrito por Kitami et al.¹⁰⁴, em 2012, como sugestivo de aumento na densidade de proteínas no interior das mitocôndrias. De forma interessante, como efeito tardio radioinduzido, observou-se o aumento na expressão de proteínas mitocondriais (evento que também será discutido mais adiante).

Após o estudo do aspecto ultraestrutural do tecido cardíaco, foi avaliada a respiração mitocondrial, pela adição de substratos que integram diferentes estágios das vias metabólicas. Esta metodologia permitiu inferir sobre a integridade da mitocôndria, determinar a eficiência do consumo de oxigênio e conseqüentemente, da síntese de ATP.

O glutamato e o malato foram utilizados no experimento como substratos oxidáveis, caracterizando o estado 2 da respiração mitocondrial. Para este estado, não foi observada diferença estatística significativa no consumo de oxigênio entre amostras controles e irradiadas, tanto para análise inicial, quanto tardia (4 semanas e 32 semanas após irradiação, respectivamente). A adição de ADP serviu de estímulo para o complexo I da CR, definindo o estado 3 CI, fase ativa da fosforilação oxidativa com consumo de oxigênio e formação de ATP. Entretanto, neste estado, como resposta à adição de ADP, também não foi observada diferença estatística significativa no consumo de oxigênio entre amostras controles e irradiadas, para ambos os tempos de análise.

Na dinâmica da respiração mitocondrial o succinato atua como substrato direto da CR, alimentando diretamente o complexo II pela da doação de elétrons e, além disso, é utilizado para determinar a funcionalidade da cadeia. Os resultados do estudo mostraram que o consumo de oxigênio estimulado por succinato (após a adição de ADP, estado 3, CI + CII) não apresentou diferença estatística significativa quando os efeitos iniciais da radiação foram analisados (4 semanas), no entanto, o consumo de oxigênio foi inibido consideravelmente em 42,85% ($p < 0,001$) nas mitocôndrias do tecido cardíaco de animais analisados 32 semanas após irradiação, indicando disfunções que ocorrem a longo prazo no complexo II da CR. A avaliação da fisiologia mitocondrial também foi realizada pelo grupo de Barjaktarovic et al.⁷⁷, em 2011. Estes pesquisadores estudaram o metabolismo oxidativo mitocondrial do

coração de camundongos 4 semanas após terem recebido uma dose de 2 Gy direcionada ao coração e observaram uma desativação parcial na atividade do complexo I (32%, $p < 0,05$), do complexo III (11%, $p < 0,05$). Presume-se desta forma que a RI é capaz de induzir alterações adversas nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

Outra etapa do ensaio consistiu na avaliação do consumo de oxigênio após a adição de citocromo c. Os resultados mostraram apenas uma tendência ao comprometimento da integridade da membrana mitocondrial externa em ambos os tempos de análise. O discreto aumento (mas não significativo) do consumo de oxigênio por parte das mitocôndrias sugere escassez de citocromo c na CR, provavelmente devido a danos na membrana externa da organela e liberação destas moléculas para o citoplasma.

O nível de acoplamento mitocondrial foi calculado utilizando-se resultados da RCR para cada grupo analisado. Mitocôndrias são consideradas desacopladas quando o seu gradiente de prótons deixa de induzir a síntese de ATP para retornar a matriz produzindo calor (termogênese), fenômeno conhecido como *proton leak*.¹⁰⁵ Desta forma, a produção de energia fica prejudicada. O resultado do estudo mostrou novamente que em curto prazo não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e irradiado. Contrariamente, a longo prazo houve diferença estatística, com o valor da RCR menor no grupo irradiado (1,25), o que denota maior desacoplamento mitocondrial, enquanto o grupo controle exibiu melhor acoplamento (1,75). Valores de RCR próximos ou igual a 2, como o exibido pelo grupo controle, indicam a presença de mitocôndrias funcionais, isto é, em bom estado bioenergético.

De forma geral, os resultados encontrados neste trabalho corroboram com o fato de que a redução significativa do consumo de O_2 no estado 3 CI + CII, além de indicar uma disfunção no complexo II, representa uma limitação na produção de ATP, ou seja, a radioterapia prejudica a bioenergética mitocondrial do tecido cardíaco como efeito tardio. Como o coração necessita de ATP tanto para se contrair como para relaxar, pode ocorrer um declínio da função do cardiomiócito e por conseqüência um déficit no funcionamento do órgão.³⁷ Ainda, o fato de a mitocôndria não ser capaz de desencadear seu processo energético quando exposta ao ADP mostra que há comprometimento morfológico da organela, resultado que corrobora com os achados em microscopia eletrônica de transmissão para amostras analisadas 32 semanas após exposição à radiação. Dados da literatura, que

suportam os achados deste trabalho, mostram que os mecanismos propostos para explicar as disfunções mitocondriais incluem: danos aos complexos da CR e estresse oxidativo.⁷⁹ Em ambos os casos ocorrem perda do controle dos processos de redução e oxidação no interior das organelas, alteração do metabolismo homeostático e aumento da produção de ROS. Ainda, o estresse oxidativo induzido pela RI ao interferir de forma adversa no *status* mitocondrial, compromete o metabolismo energético cardíaco, levando a uma diminuição de energia e disfunção mecânica do coração, estes eventos por sua vez desempenham um importante papel na etiologia da doença cardiovascular radioinduzida.⁷⁷

Uma observação interessante é que em células de mamíferos, incluindo cardiomiócitos, a CR é a principal fonte endógena de ROS,¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ sendo estes metabólitos normalmente produzidos a partir de um fluxo inverso de elétrons do complexo II. Mostrou-se aqui que a atividade deste complexo é significativamente diminuída 32 semanas após irradiação. Logo, é sugerido que disfunções na CR, como a observada, elevam os níveis de ROS no meio biológico devido ao escape de elétrons. Estudos indicam que baixos níveis endógenos de ROS desempenham um papel importante modulando as vias de sinalização das células, mas níveis aumentados são conhecidos por induzirem alterações na estrutura de biomoléculas e morte celular.^{108;109} Ademais, pesquisas confirmam que o comprometimento da CR é rigidamente relacionado ao aumento dos níveis de ROS no coração.⁸⁸

Para dar continuidade ao estudo dos impactos da radioterapia sobre o tecido cardíaco, foi proposta a análise proteômica. A partir do estudo do proteoma foi possível identificar as proteínas diferencialmente expressas em resposta à radiação, assim como as estruturas, processos e vias associadas a elas, além de estudo de interações protéicas.

A análise de perfis protéicos é de extrema importância, uma vez que alterações no genoma nem sempre resultam em alterações nos níveis das proteínas expressas e conseqüentemente, da atividade biológica. Apesar de ser muito informativo o estudo do proteoma tem alto custo, o que limita o número de amostras analisadas, e exige muito trabalho e tempo, já que existem variações das técnicas em função do tipo de amostra, tornando necessária a padronização da metodologia.

É possível encontrar na literatura diferentes protocolos para análise proteômica de tecido cardíaco.^{80;84;85} A maior parte deles utiliza a abordagem 2-D para detectar a expressão diferencial de proteínas e alterações de isoformas e / ou

modificações pós-traducionais. Tendo em vista tais conhecimentos, optamos inicialmente, pela aplicação da técnica 2-D DIGE por ser mais sensível e evitar as variações intergéis. No entanto, a padronização exigiu o uso de diferentes variações de protocolos até serem alcançados resultados satisfatórios.

Dentre os parâmetros que sofrem variações nas técnicas 2D estão: a extração de proteínas totais (etapa que envolve a escolha do tampão de solubilização e do tampão de rehidratação das proteínas) e a focalização isoeletrica (primeira etapa da eletroforese bidimensional).

No presente estudo dois tampões foram testados quanto à solubilização das proteínas totais, levando-se em conta a existência de perdas quantitativas e qualitativas que pudessem interferir no resultado do experimento. O primeiro tampão, cujos principais componentes caotrópicos são a tiouréia e a uréia, apresentou melhores resultados em relação ao segundo, composto unicamente de uréia. Este resultado mostrou que a utilização do primeiro tampão minimiza a perda de proteínas de baixa abundância na célula, e conseqüentemente a perda de informação.

Na continuidade da busca pelo aperfeiçoamento da técnica 2D foram realizados ajustes na focalização isoeletrica. Esta etapa objetivou separar as proteínas de forma eficaz (de acordo com os seus pontos isoeletricos) e aumentar a resolução dos géis bidimensionais, visando conseqüentemente o aumento da capacidade de detecção dos *spots*. Os resultados mostraram que a melhor separação protéica foi obtida quando a focalização isoeletrica foi realizada a 30 V durante 12 horas, seguida de 100 V durante 1 hora, 500 V por 1 hora, 2000 V durante 1 hora e 8000 V por 1 hora, totalizando aproximadamente 40.000 V/hora com uma corrente que não ultrapassou 50 μ A. Por conseqüente, a separação por peso molecular, resultou em um gel representativo do mapa proteômico de tecido cardíaco, com boa resolução, grande quantidade de *spots* e minimização dos efeitos de duplicação e arraste de *spots*, itens necessários para marcação de proteínas através do sistema 2-D DIGE.

Apesar do sucesso obtido na etapa de padronização, após a aplicação da técnica 2-D DIGE não foram detectadas proteínas diferencialmente expressas. Este evento pode ter ocorrido devido a limitada capacidade de detecção da técnica 2D, principalmente em relação à amostras muito complexas, como o tecido cardíaco.⁸³

Alternativamente, realizamos a análise proteômica do tecido cardíaco através de uma abordagem *label-free*, que abrange ampla cobertura do proteoma. Entretanto, foi possível apenas o estudo da expressão diferencial de proteínas presentes nas amostras de 32 semanas.

De antemão, é importante salientar que este estudo é o primeiro a utilizar de forma abrangente a análise proteômica para caracterizar os efeitos biológicos tardios da radioterapia no tecido cardíaco. Uma das técnicas mais sensíveis foi utilizada, capaz de detectar mudanças sutis no proteoma, combinada com estatísticas precisas para gerar um conjunto de dados proteômicos detalhados.

Os resultados mostraram que 161 proteínas foram diferencialmente expressas 32 semanas após irradiação do coração. Destas, 144 foram *up regulated* e apenas 17 estavam *down regulated*, revelando que, como efeito tardio da radiação, ocorre majoritariamente um aumento da expressão de proteínas. É provável que este aumento majoritário seja uma resposta às lesões de caráter progressivo iniciadas pela RI. Neste caso, o aumento de expressão representaria a “reposição” de proteínas afetadas e a tentativa de restituir as funções exercidas por estas proteínas.

A análise da função molecular mostrou que maioria das proteínas diferencialmente expressas exerce atividade catalítica. De fato, as análises subseqüentes mostraram que a maior parte das proteínas reguladas em resposta à RI, são oxidoredutases (como desidrogenases e oxidases), transferases, hidrolases e ligases (como sintetases), sobretudo, envolvidas em reações metabólicas. Acrescentamos que dentre as proteínas *down regulated* também foram encontradas de forma representativa, proteínas estruturais. Estes achados reforçam os resultados da análise ultraestrutural, onde foi observado aumento das áreas com CCE, como conseqüência da degeneração de proteínas estruturais, mostrando, juntamente com outros trabalhos da literatura, que o estresse oxidativo proveniente da RI afeta de forma significativa o citoesqueleto. Por outro lado, dentre as *up regulated*, as proteínas de ligação formaram o segundo maior grupo encontrado. Este evento pode estar relacionado à formação de complexos protéicos funcionais, como os envolvidos na composição da CR.

Quanto à localização, mostramos que a maior parte das 161 proteínas com expressões alteradas encontrava-se no citoplasma. De forma interessante, o processo biológico “metabolismo energético” foi o que sofreu maior regulação como

resposta tardia à radiação, integrando tanto proteínas do citoplasma quanto de mitocôndrias.

A investigação do metabolismo energético mostrou que dentre as vias mais importantes afetadas pela radiação está a mitocondrial. Este resultado é consistente com os as análises da ultraestrutura e respiração mitocondrial e com os resultados relatados em outros estudos, que apontam o comprometimento da estrutura e função mitocondrial após irradiação.^{87;111} Ademais, observou-se que os complexos da CR foram os componentes mais afetados, verificando-se principalmente o aumento na expressão de proteínas. De forma específica, houve aumento significativo na expressão de subunidades dos complexos I, IV e V da CR após a exposição à radiação. Tem sido sugerido que aumento na expressão de subunidades protéicas mitocondriais envolvidas CR e fosforilação oxidativa visa restaurar os complexos prejudicados anteriormente.¹¹⁰ De acordo com este conceito, o aumento significativo no nível de expressão das proteínas mitocondriais pode ser o reflexo de respostas compensatórias. Cabe ressaltar a ausência de regulação diferenciada de subunidades do complexo II da CR, cujo prejuízo funcional foi confirmado pela análise de respiração mitocondrial.

Nove proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e no ciclo de Krebs foram diferencialmente reguladas, sendo a maior parte destas, previamente associadas disfunções no metabolismo de lipídeos e hipertrofia cardíaca (CPT1A_RAT). Um estudo mostrou que o estresse oxidativo reduz a capacidade de oxidação de lipídeos em um modelo de hipertrofia¹¹². Ainda, foi descrito na literatura que diferentes disfunções cardíacas, incluindo insuficiência cardíaca^{113;114} e lesão de isquemia- reperusão,¹¹⁵ exibem aumento na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos.

Na via glicolítica duas importantes proteínas associadas ao metabolismo do piruvato foram reguladas após irradiação. A piruvato quinase PKLR, é uma transferase que foi *up regulated* e tem papel chave na glicólise, pois realiza a transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP na última etapa da via, liberando assim, piruvato juntamente com ATP. A enzima 6-fosfofrutoquinase foi *down regulated* e catalisa a terceira etapa da via glicolítica, por meio da transferência de um grupo fosfato do ATP para a frutose-6-fosfato, liberando a frutose-1,6-difosfato.

A rede de interações entre as diferentes vias do metabolismo energético

destacou outras interações previstas pelo software de análise, integrando moléculas alvo, como a glicose e proteínas reguladoras como a poliubiquitina-c (UBC), cuja função é “marcar” proteínas que devem ser degradadas pelo proteossoma, e o alfa receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPARA), um fator de transcrição ligante-ativado, regulador chave do metabolismo lipídico, que recentemente tem recebido grande atenção quanto ao seu papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A atuação da proteína PPARA também vem sendo investigada em trabalhos experimentais que tratam dos efeitos radioinduzidos no coração. Um estudo do proteoma desenvolvido por Bakshi et al.¹¹⁶, em 2013, cujo objetivo foi elucidar os efeitos a longo prazo de baixas doses de RI, mostrou a proteína PPARA como um regulador comum de várias proteínas diferencialmente expressas. Outra pesquisa, cuja finalidade foi investigar o papel específico de PPARA em lesões tardias induzidas por altas doses de radiação, revelou que a RI marcadamente mudou o estado de fosforilação e ubiquitinação de PPAR.¹¹⁷

Por fim, outro importante resultado deste estudo, a respeito da análise funcional das proteínas diferencialmente expressas, mostrou que o comprometimento do metabolismo energético tem clara associação com diversas categorias de cardiotoxicidade, principalmente com a disfunção mitocondrial e disfunção do metabolismo de lipídeos (além de aumento da transição de permeabilidade da membrana interna mitocondrial, hipertrofia cardíaca e necrose cardíaca), mostrando mais uma vez que a irradiação do coração induz efeitos adversos no metabolismo oxidativo mitocondrial, conduzindo ao posterior desenvolvimento de complicações cardíacas.

Em linhas gerais, os resultados deste estudo sugerem que os efeitos secundários da radioterapia são capazes de induzir alterações nas expressões de proteínas, comprometimento da estrutura cardíaca e disfunções em longo prazo, sendo representativas do desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O conhecimento obtido sobre as vias acionadas como resposta tardia a radiação é de grande importância, pois auxilia na compreensão a respeito da gênese e evolução das complicações cardíacas radioinduzidas, e poderá contribuir na elaboração de futuras estratégias de diagnóstico e tratamento.

CONCLUSÕES

- Os danos causados no tecido cardíaco exposto à radiação ionizante puderam ser mensurados pelo do estudo do aspecto ultraestrutural do tecido cardíaco, da análise de funcionalidade das mitocôndrias e do estudo do proteoma do tecido cardíaco.

- Como efeito tardio da RI ocorre o comprometimento morfológico e estrutural do tecido cardíaco, especialmente em relação às miofibrilas e mitocôndrias.

- A longo prazo, o tratamento radioterápico pode alterar a bioenergética mitocondrial do tecido cardíaco, afetando conseqüentemente a síntese de ATP.

- Observou-se, em resposta tardia à irradiação do coração, a expressão diferencial de proteínas envolvidas no metabolismo energético.

- O conjunto de resultados sugere o envolvimento do metabolismo energético mitocondrial no desenvolvimento de complicações cardíacas, como conseqüência tardia da exposição do coração durante o tratamento radioterápico.

REFERÊNCIAS

1. Milian FM. Estudo *in vitro* dos efeitos radiobiológicos no DNA plasmidial com radiação ionizante de baixo LET. Tese de Doutorado em Física - Universidade de São Paulo. 2006.
2. Nouailhetas Y. [Internet]. Apostila educativa - CNEN - Radiações ionizantes e a vida. [acesso em 2013 jan 15]. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br>.
3. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, et al. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(24):13761-6.
4. Steel GG. *Basic Clinical Radiobiology*, Arnold, London. 2002.
5. IAEA - International Atomic Energy Agency. *Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students*. Editor E. B. Podgorsak. Vienna, 2005.
6. Little MP, Tawn EJ, Tzoulaki I, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, et al. A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. *Radiat Res*. 2008;169(1):99-109.
7. Willers H, Held KD. Introduction to clinical radiation biology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2006; 20(1):1-24.
8. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):737-47.
9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2013;63(1):11-30.
10. Barboza CB, Oliveira ARL. Planejamento do tratamento por radioterapia através de métodos de pontos interiores. *Pesq Operac*. 2006;26(1):1-24.
11. INCA. [Internet]. Radioterapia. [acesso em 2013 jan 18]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=100.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino - serviço. 2 ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2002.
13. Senkus-Konefka E, Jassem J. Complications of breast-cancer radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2006;18(3):229-35.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Curso para técnicos em radioterapia. Rio de Janeiro: INCA, 2000.
15. Varga Z, Cserhádi A, Rárosi F, Boda K, Gulyás G, et al. Individualized positioning for maximum heart protection during breast irradiation. *Acta Oncol*. 2013.
16. Berberich W, Schnabel K, Berg D, Lamprecht E. Boost irradiation of breast carcinoma: teletherapy vs. brachytherapy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2001;94(2):276-82.
17. Gaya AM, Ashford RFU. Cardiac complications of radiation therapy. *Clin.Oncol*. 2005;17(3):153-9.
18. Veas H, Bigler R, Bieri S, Gruber G. Assessment of cardiac exposure in left-tangential breast irradiation. *Cancer Radiother*. 2011;15(8):670-4.
19. Dogan I, Sezen O, Sonmez B, Zengin AY, Yenilmez E, Yulug E, et al . Myocardial perfusion alterations observed months after radiotherapy are related to the cellular damage. *Nuklearmedizin*. 2010;49(6):209-15.
20. Cunha SS, Sarmiento VA, Ramalho LMP, Freitas AC, Almeida D, Tavares ME, et al. Efeitos da radioterapia no tecido ósseo. *Radiol. Brás*. 2007;40(3):189-92.
21. Sawada NO, Dias AM, Zago MMF. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol*. 2006;52 (4): 323-9.
22. Hilbers FS, Boekel NB, Van den Broek AJ, Van Hien R, Cornelissen S, Aleman BM, et al. Genetic variants in TGF β -1 and PAI-1 as possible risk factors for cardiovascular disease after radiotherapy for breast cancer. *Radiot Oncol*. 2012;102 (1):115-21.

23. Jaworski C, Mariani JA, Wheeler G, Kaye DM. Cardiac complications of thoracic irradiation. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(23):2319-28.
24. Tzonevska A, Tzvetkov K, Atanasova M, Chakarova A, Piperkova E. Myocardial scintigraphy, echocardiography and proBNP for early detection of myocardial cardiotoxicity in breast cancer patients after chemo-radiotherapy. *Hell J Nucl Med.* 2011;14(3):269-73.
25. Mège A, Ziouèche A, Pourel N, Chauvet B. Radiation-related heart toxicity. *Cancer Radiother.* 2011;15(6-7):495-503.
26. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician.* 2010 Jun 1;81(11):1339-46.
27. Ng AK. Review of the cardiac long-term effects of therapy for Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2011;154(1):23-31.
28. Mancuso L, Mancuso A, Scordato F, Pieri M, Valerio MC. Malignancy and Radiation-Induced Cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2011.
29. Van Luijk P, Novakova-Jiresova A, Faber H, Schippers JM, Kanpinga HH, Meertens H, et al. Radiation damage to the heart enhances early radiation-induced lung function loss. *Cancer Res.* 2005;65(15):6509-11.
30. Kishikawa T, Imadachi H, Hirano K, Nakashima S, Sasaki E, Kinoshita A. Occurrence of organizing pneumonia after radiation therapy for postoperative breast cancer. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 2011;49(6):458-64.
31. Gupta D, Shukla P, Munshi A, Aggarwal JP. Cardioprotective radiotherapy: The circadian way. *Med Hypotheses.* 2012;78(3):353-5.
32. Raj KA, Marks LB, Prosnitz RG. Late effects of breast radiotherapy in young women. *Breast Dis.* 2005-2006;23:53-65.
33. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Jan 6;102(1):14-25.

34. INCA. [Internet]. Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil. [acesso em 2012 jan 15]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>.
35. Haydout V, Vozenin-Brotans MC. Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features. *World J. Gastroenterol.* 2007;13(19): 2675-83.
36. Ana Paula Roque da Silva CPN, Jéssica Luna de Oliveira Silva, Juliana Moreira de Oliveira Ferreira, Julio Fernando Pinto Oliveira, Marceli de Oliveira Santos, Marise Souto Rebelo, Rejane de Souza Reis, Suelen Rosales Vitorino da Silva. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. CEDC, editor: INCA; 2011.
37. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target pharmacological reviews. *Pharmacol Rev.* 2002;54(1):101-27.
38. Kirova YM. Recent advances in breast cancer radiotherapy: Evolution or revolution, or how to decrease cardiac toxicity? *World J Radiol.* 2010;2(3):103-8.
39. Maraldo MV, Brodin NP, Aznar MC, Vogelius IR, Munck Af Rosenschöld P, Petersen PM, et al. Estimated risk of cardiovascular disease and secondary cancers with modern highly conformal radiotherapy for early-stage mediastinal Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol.* 2013.
40. Stewart FA, Hoving S, Russell NS. Vascular damage as an underlying mechanism of cardiac and cerebral toxicity in irradiated cancer patients. *Radiat Res.* 2010;174(6):865-9.
41. Eriksson F, Gagliardi G, Liedberg A, Lax I, Lee C, Levitt S, et al. Long-term cardiac mortality following radiation therapy for Hodgkin's disease: analysis with the relative seriality model. *Radiother Oncol.* 2000 May;55(2):153-62.
42. Giovanna Gagliardi IL, Lars Erik Rutqvist. Partial Irradiation of the Heart. *Seminars in Radiation Oncology.* 2001;11(3):10.
43. Senkus-Konefka E, Jassem J. Cardiovascular effects of breast cancer radiotherapy. *Cancer Treatment Reviews.* 2007;33(6):578-93.

44. Doyen J, Giraud P, Belkacemi Y. Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: cardiac structures. *Cancer Radiother.* 2010;14(4-5):319-26.
45. Schultz-Hector, Trott KR. Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 67(1):10-8.
46. Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Brønnum D, et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(11):987-98.
47. Apter S, Shemesh J, Raanani P, Portnoy O, Thaler M, Zissin R, et al. Cardiovascular calcifications after radiation therapy for Hodgkin lymphoma: computed tomography detection and clinical correlation. *Coron. Artery Dis.* 2006; 17(2):145-51.
48. Rijswijk S, Huijbregts MAJM, Lust E, Strack van Schijndel RJM. Mini-review on cardiac complications after mediastinal irradiation for Hodgkin lymphoma. *Neth J the Med.* 2008;66(6)234:7.
49. Dogan SM, Bilici HM, Bakkal H, Aydin M, Karabag T, Sayin MR, et al. The effect of radiotherapy on cardiac function. *Coron Artery Dis.* 2012;23(3):146-54.
50. Bramkamp M, Rock T, Schneemann M, Binggeli C, Kucher N. Radiotherapy and the heart. *Lancet.* 2007;369(9574):1762.
51. Stamler J, Neaton JD, Garside DB, Daviglus ML. Current status: six established major risk factors-and low risk. In *Coronary Heart Disease Epidemiology: From Aetiology to Public Health*, 2 ed. Ed.M. Marmot and P. Elliott. Oxford University Press, Oxford. 2005;32-70.
52. Prosnitz RG, Chen YH, Marks LB. Cardiac toxicity following thoracic radiation. *Semin Oncol.* 2005;32(3):71-80.
53. Ferreira-Machado SC, Rocha NN, Mencialha AL, De Melo LD, Salata C, Ribeiro AF, et al. Up-regulation of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in irradiated rats. *Int J Radiat Biol.* 2010;86(10):880-7.

54. Evans ES, Prosnitz RG, Yu X, Zhou Su-Min, Hollis DR, Wong TZ, et al. Impact of patient-specific factors, irradiated left ventricular volume, and treatment set-up errors on the development of myocardial perfusion defects after radiation therapy for left-sided breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66(4):1125-34.
55. McGale P, Darby SC, Hall P, Adolfsson J, Bengtsson NO, Bennet AM, et al. Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden. *Radiother Oncol.* 2011;100(2):167-75.
56. Taylor CW, McGale P, Darby SC. Cardiac risks of breast-cancer radiotherapy: a contemporary view. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2006;18 (3):236-46.
57. Marks LB, Yu X, Prosnitz RG, Zhou SM, Hardenbergh PH, Blazing M, et al. The incidence and functional consequences of RT-associated cardiac perfusion defects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(1):214-23.
58. Martinou M, Gaya A. Cardiac complications after radical radiotherapy. *Semin Oncol.* 2013;40(2):178-85.
59. Aleman BMP, Van den Belt-Dusebout AW, Klokman WJ, Van't MBV, Bartelink H, Van FEL. Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21(18):3431-9.
60. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2000;355(9217):1757-70.
61. Crestanello JA, McGregor CG, Danielson GK, Daly RC, Dearani JA, Orszulak TA, et al. Mitral and tricuspid valve repair in patients with previous mediastinal radiation therapy. *Ann. Thorac. Surg.* 2004;78(3):826-31.
62. Miltényi Z, Keresztes K, Garai I, Edes I, Galajda Z, Tóth L, et al. Radiation-induced coronary artery disease in Hodgkin's disease. *Cardiovasc. Radiat. Med.* 2004;5(1):38-43.
63. Hajjar LA, Fukushima JT, Galas FRBG, Almeida JP, Bacal F, Hoff PJ, et al. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96(2 supl.1):1-52.

64. Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation. *Exp Biol Med* (Maywood). 2002;32(7):866-80
65. Bennett PM, Maggs AM, Baines AJ, Pinder JC. The transitional junction: a new functional subcellular domain at the intercalated disc. *Mol Biol Cell*. 2006; 17(4):2091-100.
66. Vahebi S, Solaro RJ. Cardiac sarcomeric function, small G-protein signaling, and heart failure. *Panminerva Med*. 2005;47(3):133-42.
67. Alberts B. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Ed. Artmed. 2004.
68. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000;80(2):853-924.
69. Cingolani, HE. *Fisiologia Humana de Houssay*. 7 ed. Artmed. 2004.
70. Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bernocchi P, DiLisa F, et al. Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 1993;88(5):495-512.
71. Cooper GM. *The Cell - A Molecular Approach*. 2 ed, ASM Press, Washington. 2000.
72. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4 ed, W. H. Freeman and Company, New York. 1999.
73. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia*. Ed. Guanabara Koogan. 1997.
74. Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal Mitochondrial Respiration in Failed Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(12): 2361-7.
75. Russell LK, Finck BN, Kelly DP. Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(1):81-91.

76. Neubauer S. The failing heart – an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 2007;356 (11):1140-51.
77. Barjaktarovic Z, Schmaltz D, Shyla A, Azimzadeh O, Schulz S, Haagen J, et al. Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays. *PLoS One.* 2011;6(12):1-15.
78. Carvajal L, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Ar Med Res.* 2003;34(2):89-9.
79. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010;85(2):376-84.
80. Robichaud S, Lalub M, Udenberg T, Schulz R, Sawicki G. Proteomics analysis of changes in myocardial proteins during endotoxemia. *J Proteomics.* 2009; 72(4):648-55.
81. Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV, Paes NS, Silva MCM, Grossi-de-Sá MF. Comunicado técnico - Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Empraba CENARGEN, Brasília, DF, outubro de 2005.
82. Suresh S, Mohan SS, Mishra G, Hanumanthu GR, Suresh M, Reddy R, et al. Proteomic resources: integrating biomedical information in humans. *Gene.* 2005; 364:13-18.
83. Chugh S, Suen C, Gramolini A. Proteomics and mass spectrometry: what have we learned about the heart? *Curr Cardiol Rev.* 2010; 6(2):124-33.
84. Junhong W, JingY , Jizheng M, Shushu Z, Xiangjian C, Hengfang W, et al. Proteomic analysis of left ventricular diastolic dysfunction hearts in renovascular hypertensive rats. *Int J Cardiol.* 2008; 127(2):198-207.
85. Burniston J G. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics.* 2009;9(1):106-15.
86. Ménard C, Johann D, Lowenthal M, Muanza T, Sproull M, Ross S, et al . Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. *Cancer Res.* 2006;66 (3):1844-50.

87. Azimzadeh O, Scherthan H, Sarioglu H, Barjaktarovic Z, Conrad M, Vogt A, et al. Rapid proteomic remodeling of cardiac tissue caused by total body ionizing radiation. *Proteomics*. 2011;11(16):3299-311.
88. Barjaktarovic Z, Shyla A, Azimzadeh O, Schulz S, Haagen J, Dörr W, et al. Ionising radiation induces persistent alterations in the cardiac mitochondrial function of C57BL/6 mice 40 weeks after local heart exposure. *Radiother Oncol*. 2013;106 (3):404-10.
89. Boerma M, Zurcher C, Esveldt I, Schutte-Bart CI, Wondergem J. Histopathology of ventricles, coronary arteries and mast cell accumulation in transverse and longitudinal sections of the rat heart after irradiation. *Oncol Rep*. 2004;12(2):213-9.
90. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775-7.
91. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação?. *Arq. bras. cir. dig.* 2012.; 25.
92. Madian A G, Regnier FE. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J. Proteome Res*. 2010; 9:3766-80.
93. Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000; 97:5746-49.
94. Tai Y, Inoue H, Sakurai T, Yamada H. Protective effect of lecithinized SOD on reactive oxygen species induced xerostomia. *Radiat. Res*. 2009;172:331-38.
95. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic. Biol. Med*. 2001;31:1075-1083.
96. Van der Velden J, Papp Z, Boontje N M, Zaremba R. The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca²⁺-sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc. Res*. 2003;57,505-14.

97. Szczesna D. Regulatory light chains of striated muscle myosin. Structure, function and malfunction. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 2003;3,187-97.
98. Lewis C, Jockusch H, Ohlendieck K. Proteomic profiling of the dystrophin-deficient MDX heart reveals drastically altered levels of key metabolic and contractile proteins. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010;501-648.
99. Boldogh IR, Pon LA. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 450-62.
100. Boldogh IR, Pon LA. Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* 2007; 17: 502-10.
101. Tang HL, Lung HL, Wu KC, Le AH, Tang HM. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. *Biochem J.* 2008;410:141-6.
102. Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:339-48.
103. Linden M, Li Z, Paulin D, Gotow T, Letierrier JF. Effects of desmin gene knockout on mice heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33:333-41.
104. Kitami T, Logan DJ, Negri J, Hasaka T, Tolliday NJ, et al. A Chemical Screen Probing the Relationship between Mitochondrial Content and Cell Size. *PLoS ONE.* 2012;7(3):337-55.
105. Voet, D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry.* 2006; 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc. p. 547.
106. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003;278: 36027-31.
107. Drose S, Brandt U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem.* 2008; 283: 21649-54.
108. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev.* 2007;39: 443-55.

109. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12: 913-22.
110. Li, N., Brun, T., Cnop, M., Cunha, D. A. et al., Transient oxidative stress damages mitochondrial machinery inducing persistent beta-cell dysfunction. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 23602-12.
111. Azimzadeh O, Scherthan H, Yentrapalli R, Barjaktarovic Z, Ueffing M, et al. Label-free protein profiling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) heart tissue reveals immediate mitochondrial impairment after ionizing radiation. *J Proteomics*. 2012;75(8):2384-95.
112. Purushothaman S, Renuka Nair R, Harikrishnan VS, Fernandez AC. Temporal relation of cardiac hypertrophy, oxidative stress, and fatty acid metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Mol Cell Biochem* 2011;351:59-64.
113. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 2010;85:376-84.
114. Doenst T, Pytel G, Schrepper A, Amorim P, Farber G, Shingu Y, et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res* 2010;86:461-70.
115. Akki A, Smith K, Seymour AM. Compensated cardiac hypertrophy is characterised by a decline in palmitate oxidation. *Mol Cell Biochem* 2008;311:21524.
116. Bakshi MV, Barjaktarovic Z, Azimzadeh O, Kempf SJ, Merl J, et al. Long-term effects of acute low-dose ionizing radiation on the neonatal mouse heart: a proteomic study. *Radiat Environ Biophys*. 2013 Jul 24. [Epub ahead of print].
117. Azimzadeh O, Sievert W, Sarioglu H, Yentrapalli R, Barjaktarovic Z, et al. PPAR alpha: a novel radiation target in locally exposed *Mus musculus* heart revealed by quantitative proteomics. *J Proteome Res*. 2013;12(6):2700-14.

118. Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*. 2009; 9:1696-1719.

APÊNDICE A - Proteínas diferencialmente expressas identificadas no tecido cardíaco 32 semanas após irradiação

	Número de acesso ^a	Nome da proteína	Score ^b	I:C_Log(2) ratio
1	P20762 (IGG2C_RAT)	<i>Ig gamma-2C chain C region</i>	719,22	-2,6834128
2	Q6IG01 (K2C1B_RAT)	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1b</i>	3162,03	-1,68795314
3	Q6IMF3 (K2C1_RAT)	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	3470,08	-1,6735262
4	P68370 (TBA1A_RAT)	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	3037,39	-1,3417064
5	Q6MGB5 (DHB8_RAT)	<i>Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8</i>	595,92	-1,2984255
6	P25809 (KCRU_RAT)	<i>Creatine kinase U-type, mitochondrial</i>	1295,66	-1,15415605
7	P48004 (PSA7_RAT)	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	1681,02	-1,08202128
8	P13086 (SUCA_RAT)	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial</i>	5850,23	-1,06759434
9	Q68FQ8 (DLEC1_RAT)	<i>Deleted in lung and esophageal cancer protein 1 homolog</i>	107,88	-0,89447093
10	Q04462 (SYVC_RAT)	<i>Valine--tRNA ligase</i>	313,21	-0,880044
11	P08460 (NID1_RAT)	<i>Nidogen-1 (Fragment)</i>	796,11	-0,82233616
12	P20651 (PP2BB_RAT)	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform</i>	387,15	-0,82233616
13	Q01129 (PGS2_RAT)	<i>Decorin</i>	997,06	-0,77905535
14	Q704S8 (CACP_RAT)	<i>Carnitine O-acetyltransferase</i>	1091,06	-0,76462833
15	Q5I0P2 (GCSH_RAT)	<i>Glycine cleavage system H protein, mitochondrial</i>	3830,1	-0,76462833
16	P47858 (K6PF_RAT)	<i>6-phosphofructokinase, muscle type</i>	711,58	-0,75020139
17	A0JQP4 (TRI72_RAT)	<i>Tripartite motif-containing protein 72</i>	1727,07	-0,75020139
18	D3ZAF6 (ATPK_RAT)	<i>ATP synthase subunit f, mitochondrial</i>	1426,32	0,750201394
19	P08733 (MLRV_RAT)	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	73872,39	0,750201394
20	P26453 (BASI_RAT)	<i>Basigin</i>	1829,4	0,750201394
21	P11240 (COX5A_RAT)	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</i>	14415,09	0,750201394
22	P30427 (PLEC_RAT)	<i>Plectin</i>	941,04	0,76462833
23	P18292 (THRB_RAT)	<i>Prothrombin</i>	349	0,76462833
24	Q68FP1 (GELS_RAT)	<i>Gelsolin</i>	350,54	0,76462833

25	P28480 (TCPA_RAT)	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	420,91	0,76462833
26	F1LMY4 (RZR1_RAT)	<i>Ryanodine receptor 1</i>	285	0,76462833
27	Q03626 (MUG1_RAT)	<i>Murinoglobulin-1</i>	3695,86	0,76462833
28	P07150 (ANXA1_RAT)	<i>Annexin A1</i>	949,53	0,779055353
29	Q63704 (CPT1B_RAT)	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform</i>	2390,1	0,779055353
30	Q03346 (MPPB_RAT)	<i>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta</i>	356,93	0,779055353
31	Q63638 (SPEG_RAT)	<i>Striated muscle-specific serine/threonine-protein kinase</i>	506,21	0,779055353
32	P97834 (CSN1_RAT)	<i>COP9 signalosome complex subunit 1</i>	191,1	0,779055353
33	P28023 (DCTN1_RAT)	<i>Dynactin subunit 1</i>	244,51	0,779055353
34	F1MA98 (TPR_RAT)	<i>Nucleoprotein TPR</i>	310,33	0,779055353
35	Q9ESS6 (BCAM_RAT)	<i>Basal cell adhesion molecule</i>	620,24	0,779055353
36	P08009 (GSTM4_RAT)	<i>Glutathione S-transferase Yb-3</i>	8561,64	0,79348229
37	P18418 (CALR_RAT)	<i>Calreticulin</i>	1612,62	0,79348229
38	O35567 (PUR9_RAT)	<i>Bifunctional purine biosynthesis protein PURH</i>	1531,34	0,79348229
39	P63259 (ACTG_RAT)	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	30767,41	0,79348229
40	P21807 (PERI_RAT)	<i>Peripherin</i>	210,9	0,807909226
41	P35565 (CALX_RAT)	<i>Calnexin</i>	232,23	0,807909226
42	P60711 (ACTB_RAT)	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	30783,4	0,807909226
43	P97584 (PTGR1_RAT)	<i>Prostaglandin reductase 1</i>	937,41	0,807909226
44	P23358 (RL12_RAT)	<i>60S ribosomal protein L12</i>	1508,61	0,807909226
45	P48675 (DESM_RAT)	<i>Desmin</i>	37940,73	0,807909226
46	Q641Z6 (EHD1_RAT)	<i>EH domain-containing protein 1</i>	780,56	0,807909226
47	O35878 (HSPB2_RAT)	<i>Heat shock protein beta-2</i>	835,66	0,807909226
48	P49134 (ITB1_RAT)	<i>Integrin beta-1</i>	1231,34	0,807909226
49	Q06647 (ATPO_RAT)	<i>ATP synthase subunit O, mitochondrial</i>	20093,53	0,822336163
50	Q61E52 (MUG2_RAT)	<i>Murinoglobulin-2</i>	2884,36	0,8367631
51	Q5M7W5 (MAP4_RAT)	<i>Microtubule-associated protein 4</i>	519,03	0,8367631
52	Q07803 (EFGM_RAT)	<i>Elongation factor G, mitochondrial</i>	389,5	0,8367631
53	Q5EB94 (MYZAP_RAT)	<i>Myocardial zonula adherens protein</i>	176,34	0,8367631
54	P70615 (LMNB1_RAT)	<i>Lamin-B1</i>	603,96	0,851190036

55	P12928 (KPYR_RAT)	<i>Pyruvate kinase isozymes R/L</i>	251,47	0,851190036
56	P07943 (ALDR_RAT)	<i>Aldose reductase</i>	5973,54	0,851190036
57	Q6IG04 (K2C72_RAT)	<i>Keratin, type II cytoskeletal 72</i>	165,61	0,851190036
58	Q5U3Z6 (CCD67_RAT)	<i>Coiled-coil domain-containing protein 67</i>	275,77	0,851190036
59	Q4V8F9 (HSDL2_RAT)	<i>Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2</i>	1313,56	0,865617059
60	P85125 (PTRF_RAT)	<i>Polymerase I and transcript release factor</i>	5351,02	0,865617059
61	P02401 (RLA2_RAT)	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	4470,07	0,865617059
62	Q60587 (ECHB_RAT)	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial</i>	7223,63	0,880043996
63	P19234 (NDUV2_RAT)	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial</i>	21850,99	0,894470932
64	P10888 (COX41_RAT)	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial</i>	9108,66	0,894470932
65	P35435 (ATPG_RAT)	<i>ATP synthase subunit gamma, mitochondrial</i>	5324,68	0,908897869
66	P04785 (PDIA1_RAT)	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	3295,04	0,908897869
67	O88600 (HSP74_RAT)	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	714,32	0,923324806
68	P63155 (CRNL1_RAT)	<i>Crooked neck-like protein 1</i>	186,89	0,923324806
69	Q5XHZ0 (TRAP1_RAT)	<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	419,22	0,923324806
70	Q66HD0 (ENPL_RAT)	<i>Endoplasmic reticulum protein</i>	533,05	0,937751742
71	Q9JJ54 (HNRPD_RAT)	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</i>	144,62	0,937751742
72	Q6PCU8 (NDUV3_RAT)	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial</i>	3703,69	0,937751742
73	D4A666 (UBN2_RAT)	<i>Ubiquitin-2</i>	357,44	0,952178765
74	P62804 (H4_RAT)	<i>Histone H4</i>	12039,66	0,952178765
75	P0C2X9 (AL4A1_RAT)	<i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial</i>	2446,61	0,952178765
76	P14669 (ANXA3_RAT)	<i>Annexin A3</i>	3637,81	0,952178765
77	O35115 (FHL2_RAT)	<i>Four and a half LIM domains protein 2</i>	7781,28	0,952178765
78	P24090 (FETUA_RAT)	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	8026,6	0,952178765
79	P11915 (NLTP_RAT)	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	283,86	0,952178765
80	Q63416 (ITIH3_RAT)	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>	306,89	0,966605701
81	P27274 (CD59_RAT)	<i>CD59 glycoprotein</i>	1239,28	0,966605701
82	Q497B0 (NIT2_RAT)	<i>Omega-amidase NIT2</i>	3576,42	0,966605701

83	P62260 (1433E_RAT)	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	20466,99	0,981032638
84	Q62658 (FKBP1A_RAT)	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A</i>	7791,64	0,995459575
85	P63102 (1433Z_RAT)	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	17379,44	1,009886511
86	B2RYG6 (OTUB1_RAT)	<i>Ubiquitin thioesterase OTUB1</i>	588,72	1,009886511
87	Q63797 (PSME1_RAT)	<i>Proteasome activator complex subunit 1</i>	551,16	1,009886511
88	P04937 (FINC_RAT)	<i>Fibronectin</i>	128,71	1,024313448
89	Q62925 (M3K1_RAT)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	204,85	1,024313448
90	Q64591 (DECR_RAT)	<i>2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial</i>	2890,8	1,024313448
91	P04905 (GSTM1_RAT)	<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>	1024,83	1,053167407
92	Q9Z2J4 (NEXN_RAT)	<i>Nexilin</i>	400,3	1,067594344
93	Q99PS8 (HRG_RAT)	<i>Histidine-rich glycoprotein</i>	610,2	1,067594344
94	Q63258 (ITA7_RAT)	<i>Integrin alpha-7</i>	340,93	1,067594344
95	Q6AY97 (CCD91_RAT)	<i>Coiled-coil domain-containing protein 91</i>	346,17	1,067594344
96	B1PRL5 (MURC_RAT)	<i>Muscle-related coiled-coil protein</i>	744	1,067594344
97	P48679 (LMNA_RAT)	<i>Prelamin-A/C</i>	3091	1,067594344
98	P01836 (KACA_RAT)	<i>Ig kappa chain C region, A allele</i>	11789,37	1,067594344
99	P68511 (1433F_RAT)	<i>14-3-3 protein eta</i>	10783,54	1,082021281
100	P62859 (RS28_RAT)	<i>40S ribosomal protein S28</i>	3863,23	1,096448217
101	A1A5R9 (STPG2_RAT)	<i>Sperm-tail PG-rich repeat-containing protein 2</i>	208,23	1,096448217
102	P0C0S7 (H2AZ_RAT)	<i>Histone H2A.Z</i>	3538,99	1,096448217
103	Q63639 (AL1A2_RAT)	<i>Retinal dehydrogenase 2</i>	572,85	1,096448217
104	P01835 (KACB_RAT)	<i>Ig kappa chain C region, B allele</i>	29464,17	1,096448217
105	P38650 (DYHC1_RAT)	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	554,5	1,096448217
106	P05545 (SPA3K_RAT)	<i>Serine protease inhibitor A3K</i>	5260,06	1,110875154
107	P13832 (MRLCA_RAT)	<i>Myosin regulatory light chain RLC-A</i>	938,84	1,110875154
108	Q5BK81 (PTGR2_RAT)	<i>Prostaglandin reductase 2</i>	1629,4	1,125302091
109	Q35854 (BCAT2_RAT)	<i>Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial</i>	4969,14	1,139729113
110	P35213 (1433B_RAT)	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>	3902,56	1,139729113
111	P15178 (SYDC_RAT)	<i>Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	365,28	1,139729113
112	Q9EQG6 (KDIS_RAT)	<i>Kinase D-interacting substrate of 220 kDa</i>	334,96	1,139729113
113	P45592 (COF1_RAT)	<i>Cofilin-1</i>	1513,59	1,139729113

114	P81377 (KAP1_RAT)	<i>cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit</i>	194,29	1,15415605
115	P29418 (ATP5E_RAT)	<i>ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial</i>	11778,78	1,15415605
116	Q5RK11 (IF4A2_RAT)	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-II</i>	2268,89	1,168582987
117	Q1JU68 (EIF3A_RAT)	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</i>	146,12	1,19743686
118	Q63716 (PRDX1_RAT)	<i>Peroxiredoxin-1</i>	4824,79	1,211863797
119	P29147 (BDH_RAT)	<i>D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial</i>	1105,27	1,226290819
120	P62909 (RS3_RAT)	<i>40S ribosomal protein S3</i>	200,79	1,240717756
121	Q9EPH1 (A1BG_RAT)	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	832,76	1,255144692
122	Q2PQA9 (KINH_RAT)	<i>Kinesin-1 heavy chain</i>	430,35	1,269571629
123	P13852 (PRIO_RAT)	<i>Major prion protein</i>	782,34	1,283998566
124	B5DEH2 (ERLN2_RAT)	<i>Erlin-2</i>	546,77	1,298425502
125	Q7TPB1 (TCPD_RAT)	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	410,29	1,298425502
126	P31399 (ATP5H_RAT)	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	28425,16	1,298425502
127	P61980 (HNRPK_RAT)	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	1006,13	1,327279462
128	P11951 (CX6C2_RAT)	<i>Cytochrome c oxidase subunit 6C-2</i>	4071,87	1,327279462
129	Q5XI73 (GDIR1_RAT)	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	6195,28	1,327279462
130	Q8R491 (EHD3_RAT)	<i>EH domain-containing protein 3</i>	617,14	1,341706398
131	P84245 (H33_RAT)	<i>Histone H3.3</i>	1981,6	1,356133335
132	Q68FX0 (IDH3B_RAT)	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial</i>	4406,25	1,356133335
133	Q62868 (ROCK2_RAT)	<i>Rho-associated protein kinase 2</i>	229,48	1,356133335
134	Q4FZU2 (K2C6A_RAT)	<i>Keratin, type II cytoskeletal 6A</i>	784,78	1,384987208
135	P29419 (ATP5I_RAT)	<i>ATP synthase subunit e, mitochondrial</i>	7082,58	1,413841168
136	P21396 (AOFA_RAT)	<i>Amine oxidase [flavin-containing] A</i>	2672,84	1,413841168
137	P20759 (IGHG1_RAT)	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>	8018,05	1,457121978
138	P97576 (GRPE1_RAT)	<i>GrpE protein homolog 1, mitochondrial</i>	2599,24	1,457121978
139	P24329 (THTR_RAT)	<i>Thiosulfate sulfurtransferase</i>	559,55	1,457121978
140	P50753 (TNNT2_RAT)	<i>Troponin T, cardiac muscle</i>	11119,12	1,471548914
141	Q64057 (AL7A1_RAT)	<i>Alpha-amino adipic semialdehyde dehydrogenase</i>	1808,85	1,529256661
142	Q4KM73 (KCY_RAT)	<i>UMP-CMP kinase</i>	506,06	1,543683769

143	P32198 (CPT1A_RAT)	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform</i>	130,73	1,543683769
144	Q62920 (PDLI5_RAT)	<i>PDZ and LIM domain protein 5</i>	2102,77	1,601391516
145	Q5U2Z3 (NP1L4_RAT)	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 4</i>	848,39	1,630245389
146	P05544 (SPA3L_RAT)	<i>Serine protease inhibitor A3L</i>	6091,33	1,630245389
147	D4A631 (BIG1_RAT)	<i>Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1</i>	195,01	1,659099263
148	P52481 (CAP2_RAT)	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 2</i>	597,1	1,659099263
149	P09005 (SPI21_RAT)	<i>Serine protease inhibitor 2.1 (Fragment)</i>	5582,48	1,702380073
150	P25235 (RPN2_RAT)	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2</i>	350,08	1,774514928
151	Q7TSN4 (PIGW_RAT)	<i>Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class W protein</i>	101,92	1,90435753
152	Q6LED0 (H31_RAT)	<i>Histone H3.1</i>	502,9	1,918784466
153	P60892 (PRPS1_RAT)	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1</i>	1492,84	1,99091915
154	P62961 (YBOX1_RAT)	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>	1700,73	2,077480941
155	Q6PDU7 (ATP5L_RAT)	<i>ATP synthase subunit g, mitochondrial</i>	1532,8	2,207323371
156	P28075 (PSB5_RAT)	<i>Proteasome subunit beta type-5</i>	357,9	2,221750308
157	P09650 (MCPT1_RAT)	<i>Mast cell protease 1</i>	436,37	2,279458227
158	Q63644 (ROCK1_RAT)	<i>Rho-associated protein kinase 1</i>	254,38	2,366019846
159	P30009 (MARCS_RAT)	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>	283,81	2,380446783
160	Q6IG05 (K2C75_RAT)	<i>Keratin, type II cytoskeletal 75</i>	545,94	2,827682335
161	Q9Z311 (MECR_RAT)	<i>Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial</i>	373,92	3,332625462

a - O número de acesso/nome no banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot* é mostrado em parênteses.

b - PLGS score foi calculado como descrito por Li *et al.*¹¹⁸, em 2009.

APÊNDICE B - Proteínas diferencialmente expressas em tecido cardíaco associadas ao metabolismo energético, de acordo com a base de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*.

A

Número de acesso ^a	Nome da proteína	I:C_Log(2) Ratio	Via associada ao metabolismo
Q704S8 (CACP_RAT)	Carnitine O-acetyltransferase	-0,76462833	Carnitine acetylase is specific for short chain fatty acids. Carnitine acetylase seems to affect the flux through the pyruvate dehydrogenase complex. It may be involved as well in the transport of acetyl-CoA into mitochondria
P47858 (K6PF_RAT)	6-phosphofructokinase, muscle type	-0,750201394	Catalyzes the third step of glycolysis, the phosphorylation of fructose-6-phosphate (F6P) by ATP to generate fructose-1,6-bisphosphate (FBP) and ADP
P25809 (KCRU_RAT)	Creatine kinase U-type, mitochondrial	-1,15415605	Reversibly catalyzes the transfer of phosphate between ATP and various phosphogens (e.g. creatine phosphate). Creatine kinase isoenzymes play a central role in energy transduction in tissues with large, fluctuating energy demands, such as skeletal muscle, heart, brain and spermatozoa.
P13086 (SUCA_RAT)	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	-1,067594344	Catalyzes the ATP- or GTP-dependent ligation of succinate and CoA to form succinyl-CoA.
Q6MGB5 (DHB8_RAT)	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	-1,298425502	NAD-dependent 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase with highest activity towards estradiol. May play a role in biosynthesis of fatty acids in mitochondria

B

Número de acesso ^a	Nome da proteína	I:C_Log(2) Ratio	Via associada ao metabolismo
P0C2X9 (AL4A1_RAT)	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	0,952178765	Irreversible conversion of delta-1-pyrroline-5-carboxylate (P5C), derived either from proline or ornithine, to glutamate. This is a necessary step in the pathway interconnecting the urea and tricarboxylic acid cycles. The preferred substrate is glutamic gamma-semialdehyde, other substrates include succinic, glutaric and adipic semialdehydes
P29418 (ATP5E_RAT)	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	1,15415605	Mitochondrial membrane ATP synthase (F ₁ F ₀ ATP synthase or Complex V) produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain. F-type ATPases consist of two structural domains, F ₁ - containing the extramembraneous catalytic core, and F ₀ - containing the membrane proton channel, linked together by a central stalk and a peripheral stalk. During catalysis, ATP synthesis in the catalytic domain of F ₁ is coupled via a rotary mechanism of the central stalk subunits to proton translocation. Part of
P35435 (ATPG_RAT)	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0,908897869	

			the complex F_1 domain and of the central stalk which is part of the complex rotary element. Rotation of the central stalk against the surrounding $\alpha_3\beta_3$ subunits leads to hydrolysis of ATP in three separate catalytic sites on the beta subunits.
P29419 (ATP5I_RAT)	ATP synthase subunit e, mitochondrial	1,413841168	Mitochondrial membrane ATP synthase (F_1F_0 ATP synthase or Complex V) produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain. F-type ATPases consist of two structural domains, F_1 -containing the extramembraneous catalytic core, and F_0 -containing the membrane proton channel, linked together by a central stalk and a peripheral stalk. During catalysis, ATP synthesis in the catalytic domain of F_1 is coupled via a rotary mechanism of the central stalk subunits to proton translocation. Part of the complex F_0 domain. Minor subunit located with subunit a in the membrane.
D3ZAF6 (ATPK_RAT)	ATP synthase subunit f, mitochondrial	0,750201394	
Q6PDU7 (ATP5L_RAT)	ATP synthase subunit g, mitochondrial	2,207323371	
Q06647 (ATPO_RAT)	ATP synthase subunit O, mitochondrial	0,822336163	Mitochondrial membrane ATP synthase (F_1F_0 ATP synthase or Complex V) produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain. F-type ATPases consist of two structural domains, F_1 -containing the extramembraneous catalytic core and F_0 -containing the membrane proton channel, linked together by a central stalk and a peripheral stalk. During catalysis, ATP synthesis in the catalytic domain of F_1 is coupled via a rotary mechanism of the central stalk subunits to proton translocation. Part of the complex F_0 domain and the peripheric stalk, which acts as a stator to hold the catalytic $\alpha_3\beta_3$ subcomplex and subunit a/ATP6 static relative to the rotary elements.
P31399 (ATP5H_RAT)	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1,298425502	
P32198 (CPT1A_RAT)	Carnitine O- palmitoyltransferase 1, liver isoform	1,543683769	Catalyzes the transfer of the acyl group of long-chain fatty acid-CoA conjugates onto carnitine, an essential step for the mitochondrial uptake of long-chain fatty acids and their subsequent beta-oxidation in the mitochondrion. Plays an important role in triglyceride metabolism.
Q68FX0 (IDH3B_RAT)	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	1,356133335	Catalytic activity: Isocitrate + NAD^+ = 2-oxoglutarate + CO_2 + NADH.
P12928 (KPYR_RAT)	Pyruvate kinase PKLR	0,851190036	Plays a key role in glycolysis
P19234 (NDUV2_ RAT)	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	0,894470932	Core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I) that is believed to belong to the minimal assembly required for catalysis. Complex I functions in the transfer of electrons from NADH to the respiratory chain. The immediate electron acceptor for the enzyme is believed to be ubiquinone
Q6PCU8 (NDUV3_ RAT)	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3,	0,937751742	Accessory subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I), that is believed

	<i>mitochondrial</i>		<i>not to be involved in catalysis. Complex I functions in the transfer of electrons from NADH to the respiratory chain. The immediate electron acceptor for the enzyme is believed to be ubiquinone</i>
Q63704 (CPT1B_RAT)	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform</i>	0,779055353	<i>Catalytic activity: Palmitoyl-CoA + L-carnitine = CoA + L-palmitoylcarnitine.</i>
P11240 (COX5A_RAT)	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</i>	0,750201394	<i>This is the heme A-containing chain of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport.</i>
P10888 (COX41_RAT)	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial</i>	0,894470932	<i>This protein is one of the nuclear-coded polypeptide chains of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport.</i>
P11951 (CX6C2_RAT)	<i>Cytochrome c oxidase subunit 6C-2</i>	1,327279462	
Q64591 (DECR_RAT)	<i>2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial</i>	1,024313448	<i>Auxiliary enzyme of beta-oxidation. It participates in the metabolism of unsaturated fatty enoyl-CoA esters having double bonds in both even- and odd-numbered positions. Catalyzes the NADP-dependent reduction of 2,4-dienoyl-CoA to yield trans-3-enoyl-CoA.</i>
Q9Z311 (MECR_RAT)	<i>Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial</i>	3,332625462	<i>Catalyzes the reduction of trans-2-enoyl-CoA to acyl-CoA with chain length from C6 to C16 in an NADPH-dependent manner with preference to medium chain length substrate. May have a role in the mitochondrial synthesis of fatty acids</i>

a - O número de acesso/nome no banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot* é mostrado em parênteses.