

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Katyana Kaline Silva Ferreira

**SUPEREXPRESSÃO DA *STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1* (STI1) EM
CAMUNDONGOS: um novo alvo molecular com função cardioprotetora**

Belo Horizonte

2022

**SUPEREXPRESSÃO DA *STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1* (STI1) EM
CAMUNDONGOS: um novo alvo molecular com função cardioprotetora**

Versão final

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Guatimosim

043

Ferreira, Katyana Kaline Silva.

Superexpressão da Stress Inducible Protein 1 (STI1) em camundongos: um novo alvo molecular com função cardioprotetora [manuscrito] / Katyana Kaline Silva Ferreira. – 2022.

107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Guatimosim.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Chaperonas Moleculares. 3. Cardiomegalia. 4. Isoproterenol. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 362 DE KATYANA KALINE
SILVA FERREIRA

"Superexpressão da Stress Inducible Protein 1 (sti1) em Camundongos:Um Novo Alvo Molecular Com Função Cardioprotetora"

KATYANA KALINE SILVA FERREIRA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 18 de outubro de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Ivanita Stefanon, CCS/UFES

Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, ICB/UFMG

Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes, ICB/USP

Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau, ICB/UFMG

Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca, ICB/ UFMG – Orientadora

BELO HORIZONTE, 18 DE OUTUBRO DE 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Marilene Hohmuth Lopes, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique de Castro, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 14:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 21/10/2022, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivanita Stefanon, Usuário Externo**, em 25/10/2022, às 23:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1835156 eo código CRC 9C718FDB.

Dedico aos meus pais, Kátia Ferreira e Marcos Ferreira (in memoriam), que sempre me incentivaram nos estudos e fizeram de tudo para que eu chegasse até aqui alcançando novos voos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar coragem para enfrentar todos os desafios enfrentados até aqui, e por me dar uma família que me apoiou e entendeu minhas ausências para esta realização profissional. Sem eles nada faria sentido.

Aos meus pais, Kátia e Marcos (*in memoriam*), que me incentivaram e me deram apoio em todos os momentos. Me fizeram alçar voos que nem eu imaginava e me deram a coragem que até eu mesma duvidava que tivesse. Sem eles eu não chegaria até aqui.

A minha orientadora, Dra. Silvia Guatimosim, por ter me recebido de braços abertos no laboratório para novos aprendizados, experiências e desafios nessa vida acadêmica. Pela orientação, troca de conhecimento e colaboração no meu crescimento profissional.

Aos professores do PPG FisFar UFMG, que contribuíram de forma direta e indireta para a ampliação do meu conhecimento. Aliás, “O professor é aquele que faz duas ideias crescerem onde antes só havia uma”. Meu imenso agradecimento a todos os professores que fizeram parte da minha caminhada e crescimento científico.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Sinalização Cardíaca, pela troca de conhecimento, colaboração nos experimentos, momentos de distração dentro e fora do laboratório. Ciência não se faz sozinho e sem vocês a caminhada até aqui não teria tantas emoções!

Ao meu amigo quase irmão, André Monteiro, por ter compartilhado comigo esses 10 anos de amizade dentro e fora do meio acadêmico nessa longa caminhada. Por todo o incentivo e suporte para que eu pudesse me sentir mais do que acolhida em terras mineiras, onde resolvemos criar laços com essa terra. A todos os momentos de acolhimento, desabafos, conselhos, apoio científico, troca de conhecimento e acima de tudo, pela irmandade.

Aos meus amigos do meio acadêmico que também foram importantes na troca de experiências, colaborações, companhias de *happy hour* e distrações para fazer desse período menos difícil e mais prazeroso.

Aos meus amigos fora do meio acadêmico que se tornaram essenciais nos momentos de desabafos, frustrações, certezas, incertezas e amparo. Por estarem comigo nos momentos que precisei para me reerguer mesmo depois do caos. Por me ouvirem, aconselharem, me ampararem e abrigarem, e se fizerem presentes perto ou longe, senti a presença de cada um nos gestos mais simples. Amo vocês e levo pra vida.

A todas as universidades por onde passei (UFPB, UFPE e UFMG), que me fizeram um fruto da universidade pública e de qualidade. Pela construção do meu conhecimento, pensamento crítico e científico. Que um dia eu possa retribuir a educação que me foi dada, para contribuir no desenvolvimento da sociedade.

Ao apoio financeiro das agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

A *Stress inducible protein 1* (STI1) é uma co-chaperona importante no controle de qualidade de proteínas e homeostase proteica. Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou que a expressão da STI1 está reduzida em corações de pacientes humanos com insuficiência cardíaca. E além disso, ela desempenha um papel relevante na hipertrofia e lesão cardíaca, uma vez que camundongos com redução na expressão da STI1, são mais susceptíveis a lesão cardíaca após estresse hipertrófico. Assim, levantamos a seguinte questão: A superexpressão da STI1 exerce um papel protetor para o coração? Como objetivo principal deste trabalho, nos propomos a investigar as consequências da superexpressão da STI1 para a função e estrutura cardíaca de camundongos no estado basal e após estresse hipertrófico induzido pela hiperativação adrenérgica causada por isoproterenol. Para isso, utilizamos camundongos selvagens (WT) e geneticamente modificados que superexpressam globalmente a STI1 (STI1-TgA), com idade entre 10-12 semanas. Inicialmente, analisamos o desenvolvimento e função cardíaca basal avaliando características estruturais, morfológicas e funcionais do coração por imunofluorescência, morfometria celular e contratilidade de cardiomiócitos (CMs). Além disso, realizamos uma análise do perfil proteômico cardíaco de camundongos STI1-TgA. Por fim, induzimos estresse cardíaco hipertrófico pelo agonista β -adrenérgico isoproterenol (ISO: i. p. 20mg/Kg/dia por 7 dias), e camundongos controle foram tratados com salina (0,9% NaCl). No oitavo dia realizamos experimentos de ecocardiografia e, em seguida, os corações foram coletados para experimentos de imunofluorescência, morfometria celular, western blotting, qPCR e experimentos de contratilidade e transiente de Ca^{2+} (Fluo-4/AM) em CMs. A caracterização basal do modelo transgênico STI1-TgA confirmou a superexpressão da STI1 no coração e mostrou um desenvolvimento cardíaco similar aos animais selvagens (WT), como avaliado pela razão HW/TL e morfometria de CMs. Camundongos STI1-TgA apresentaram função contrátil de CMs aumentada pela fração de encurtamento celular, acompanhada por um aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+} . A análise proteômica identificou alterações na expressão basal de proteínas envolvidas em vias de sinalização hipertrófica, resposta celular ao estresse, metabolismo de RNA, controle de qualidade de proteínas e degradação proteica em animais STI1-TgA, indicando que esses animais possuem um arcabouço de adaptação cardíaca ao estresse. O estresse hipertrófico pelo ISO não induziu uma hipertrofia significativa em camundongos STI1-TgA (~16%), diferente do que ocorreu em camundongos WT/ISO que

apresentaram hipertrofia do coração (~35%) e de CMs, bem como níveis aumentados de RNAm para marcadores de estresse cardíaco, como Myh7 e ANP. Quando avaliamos a contratilidade e amplitude do transiente de Ca^{2+} de CMs, ambas se mostraram aumentadas em camundongos WT/ISO, similar ao observado em camundongos STI1-TgA e STI1-TgA/ISO. Ao avaliarmos a deposição de colágeno e fibrose induzida pelo ISO, apenas o grupo WT/ISO apresentou um aumento nos níveis cardíacos de colágeno III. Quando analisamos a ativação da resposta antioxidante, animais STI1-TgA/ISO expressaram 4x mais o fator de transcrição NRF2, sugerindo uma resposta antioxidante mais efetiva. Em conjunto, nossos dados mostram que a superexpressão da STI1 fornece um arcabouço para a adaptação cardíaca ao estresse, que em resposta a hiperativação adrenérgica protege o coração da hipertrofia e remodelamento cardíaco, melhorando a função contrátil e a resposta antioxidante. Desse modo, concluímos que a superexpressão da STI1 exerce um papel cardioprotetor e pode se tornar um alvo terapêutico relevante no tratamento de doenças cardíacas.

Palavras-chave: STI1. Isoproterenol. Hipertrofia cardíaca. Remodelamento cardíaco.

Abstract

STI1 (Stress inducible protein 1) is an important co-chaperone in protein quality control, and protein homeostasis. Recently, our research group found that STI1 expression is reduced in the hearts of heart failure patients. Furthermore, it plays a relevant role in cardiac hypertrophy and injury in mice with reduced STI1 expression, making them more susceptible to cardiac injury after hypertrophic stress. Could STI1 overexpression play a protective role in the heart? As the main goal of this work, we propose to investigate the consequences of STI1 overexpression for cardiac function in mice at baseline and after hypertrophic stress induced by adrenergic hyperactivation caused by isoproterenol. For this, we used wild-type mice (WT) and transgenic mice with global overexpression of STI1 (STI1-TgA), aged from 10-12 weeks. Initially, we analyzed baseline development and cardiac function by evaluating structural, morphological, and functional characteristics of the heart by immunofluorescence, cellular morphometry, and cardiomyocyte (CMs) contractility. Besides, we performed a cardiac proteomic profile of STI1-TgA mice. Finally, we induced hypertrophic stress by injecting the β -adrenergic agonist isoproterenol (ISO: i.p. 20mg/Kg/day for 7 days). Control mice were treated with saline (0.9% NaCl). On the eighth day, we performed echocardiography experiments and then the hearts were collected for immunofluorescence, cell morphometry, western blotting, qPCR, and contractility and Ca^{2+} transient (Fluo-4/AM) experiments on CMs. The baseline characterization of the STI1-TgA transgenic mice confirmed the elevation of STI1 expression in the heart and cardiac growth similar to control (WT) as assessed by the HW/TL ratio and CM morphometry. Interestingly, STI1-TgA mice showed an increase in contractile function of CMs, which was explained by an increase in the Ca^{2+} transient amplitude. Our proteomic analysis identified that STI1-TgA animals have alterations in the baseline expression of proteins involved in hypertrophic signaling, cellular response to stress, RNA metabolism, protein quality control, and protein degradation, indicating that these animals display cardiac adaptations to stress. Hypertrophic stress caused by ISO did not induce significant hypertrophy in STI1-TgA mice (~16%), different from what occurred in WT/ISO mice which developed cardiac hypertrophy (~35%) and presented enlarged CMs. Besides, WT/ISO also showed increased mRNA levels for cardiac stress markers, such as Myh7 and ANP. When we evaluated the CMs contractility and Ca^{2+} transient amplitude, both were increased in WT/ISO, as well as, the similar to STI1-TgA/ISO. When evaluating the collagen deposition and fibrosis induced by

ISO, only the WT/ISO group showed an increase in collagen III levels in the cardiac tissue. When we evaluated the activation of the antioxidant response, STI1-TgA/ISO mice expressed 4x more the NRF2 transcription factor, suggesting an improved antioxidant response. Taken together, our data show that STI1 overexpression provides a framework for cardiac adaptation to stress, which in response to adrenergic hyperactivation protects the heart from cardiac ISO-induced injury, improving contractile function, and antioxidant response. Thereby, we conclude that STI1 overexpression plays a cardioprotective role and may become a relevant therapeutic target in the treatment of heart diseases.

Keywords: STI1. Isoproterenol. Cardiac hypertrophy. Cardiac remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos e características estruturais da hipertrofia cardíaca: hipertrofia fisiológica e patológica.....	25
Figura 2 - Características celulares e moleculares gerais da hipertrofia fisiológica e patológica.....	26
Figura 3 - Controle de qualidade de proteínas mediado por chaperonas.....	30
Figura 4 - Maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90.	33
Figura 5 - Tipos de degradação proteica via autofagia celular.	35
Figura 6 - Domínios de ligação da estrutura da STI1.	38
Figura 7 - A STI1 exerce papel de citocina por ação extracelular via interação a receptores PrP ^C em neurônios.	39
Figura 8 - A expressão da STI1 está reduzida em amostras de coração de pacientes com insuficiência cardíaca pós infarto do miocárdio.	40
Figura 9 - Camundongos STI1 ^{+/-} apresentam uma resposta patológica exacerbada em resposta ao tratamento com isoproterenol.....	40
Figura 10 - Desenho esquemático do tratamento de camundongos WT e STI1-TgA com salina ou isoproterenol por 7 dias na dose de 20 mg/kg/dia.	46
Figura 11 - Imagens representativas da aquisição dos parâmetros ecocardiográficos nos modos unidimensional e bidimensional.	52
Figura 12 - Validação do modelo de superexpressão da STI1.....	58
Figura 13 - Camundongos STI1-TgA apresentam aumento da expressão da STI1 no coração relativo a camundongos WT.....	59
Figura 14 - STI1 apresenta localização no sarcolema e citoplasma no tecido cardíaco de camundongos.	60
Figura 15 - A expressão da maquinaria HSP70/HSP90 não está alterada em corações de animais STI1-TgA.....	61
Figura 16 - Camundongos STI1-TgA não apresentam alterações no peso do coração na fase adulta.....	62

Figura 17 - Animais STI1-TgA apresentam área da fibra cardíaca semelhante a animais WT.	62
Figura 18 - Animais STI1-TgA apresentam uma melhora na função contrátil de cardiomiócitos a nível basal.....	63
Figura 19 - Cardiomiócitos provenientes de camundongos STI1-TgA apresentam aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+}	64
Figura 20 - A abundância relativa das proteínas é semelhante entre os animais de cada grupo.	65
Figura 21 - A dispersão da abundância relativa das proteínas apresenta distribuição normal entre os animais de cada grupo.....	66
Figura 22 - Volcano Plot.	67
Figura 23 - Vias de sinalização preditas alteradas no coração de camundongos STI1-TgA.	72
Figura 24 - AKT está mais ativada no coração de animais STI1-TgA.	73
Figura 25 - Tratamento com Isoproterenol altera a localização da STI1 no coração.....	75
Figura 26 - Expressão proteica da maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90 em animais tratados com ISO.	76
Figura 27 - Camundongos STI1-TgA não apresentam hipertrofia após tratamento com ISO.	78
Figura 28 - Expressão de marcadores de estresse cardíaco não estão alterados em camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO.	79
Figura 29 - O tratamento com ISO aumenta a expressão do fator de transcrição NFAT em corações hipertrofiados.	80
Figura 30 - Tratamento com ISO não altera a contratilidade de cardiomiócitos em camundongos STI1-TgA.	82
Figura 31 - ISO induz redução no tempo de recaptação de Ca^{2+} em cardiomiócitos de camundongos STI1-TgA.	83
Figura 32 - A expressão da SERCA2a não é alterada entre os grupos WT e STI1-TgA.....	84
Figura 33 - Animais STI1-TgA são protegidos da deposição de colágeno do tipo III e remodelamento cardíaco induzido por ISO.	85

Figura 34 - A expressão do fator de transcrição NRF2 é amplificada em animais STI1-TgA em resposta ao ISO.	86
Figura 35 - A atividade autofágica é melhorada em animais STI1-TgA em resposta ao ISO.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de western blotting.....	56
Tabela 2 - Lista com a sequência de primers utilizados para os experimentos de PCR em tempo real.....	57
Tabela 3 - Proteínas reguladas positivamente no proteoma de animais STI1-TgA vs animais WT.....	69
Tabela 4 - Proteínas reguladas negativamente no proteoma de animais STI1-TgA vs animais WT.	71
Tabela 5 - Ecocardiograma de animais WT e STI1-TgA tratados com ISO, parâmetros morfológicos (SAX M-mode).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	–	Adenilil ciclase
ACTA1	–	α -actina muscular esquelética, respectivamente
AKT	–	Proteína kinase A
AMPc	–	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	–	Adenosina trifosfato
BSA	–	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca²⁺	–	íon cálcio
cDNA	–	DNA complementar
CHIP	–	<i>Carboxy-terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CMA	–	Autofagia mediada por chaperonas
CO	–	<i>Cardiac output</i> (débito cardíaco)
Col III	–	Colágeno III
DAPI	–	4,6-diamidino-2-phenillindole
DB	–	<i>Digestion buffer</i>
DCVs	–	Doenças cardiovasculares
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	–	Óxido nítrico sintase endotelial
EF	–	<i>Ejection fraction</i> (Fração de ejeção)
FS	–	<i>Fractional shortening</i> (fração de encurtamento)
GAPDH	–	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
HC	–	Hipertrofia cardíaca

HFmrEF – *Heart failure midrange ejection fraction* (Insuficiência cardíaca com fração de ejeção intermediária)

HFpEF – *Heart failure preserved ejection fraction* (Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada)

HFrEF – *Heart failure reduced ejection fraction* (Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida)

HOP – *Hsp70/Hsp90 organising protein*

HSC70 – *Heat shock cognate protein 70*

HSP40/DnAJ – *Heat shock protein 40*

HSP70 – *Heat shock protein 70*

HSP90 – *Heat shock protein 90*

HSPB8 – *Small heat shock protein B8*

HW – *Heart Weight*

H₂S – Sulfeto de hidrogênio

IC – Insuficiência cardíaca

IM – Infarto do miocárdio

ISO – Isoproterenol

LC3B – *Microtubule-associated protein 1B-light chain 3*

LC3II – Forma ligada a membrada da LC3B

LVAW – *Left Ventricle anterior wall*- Parede anterior do ventrículo esquerdo

LVID – *Left Ventricle internal diameter* - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo

LVPW – *Left Ventricle posterior wall*- Parede posterior do ventrículo esquerdo

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MYH7/ β -MHC – *Myosin heavy chain beta*

NAFAT – *Nuclear Factor of Activated T cells*

NCX – Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

NPPA/ANP – *Atrial Natriuretic peptide* / Peptídeo natriurético atrial

NPPB/BNP – *Brain Natriuretic peptide* / Peptídeo natriurético cerebral

NRF2 – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

OCT – *Optimal cutting temperature*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

PKA – Proteína quinase A

PKB – Proteína quina B

PLN – fosfolambam

PP2A – Proteína fosfatase 2

PVDF – Membrana de *polyvinylidene fluoride*

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – *Reactive oxygen species*

RS – Retículo sarcoplasmático

SERCA2A – *Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase*

STI1 – *Stress-inducible protein 1*

STIP1 – *Stress-inducible phosphoprotein 1*

SV – *Stroke volume*

- S26/Rps26** – Ribosomal Protein S26
- RyR** – Receptor de rianodina
- TAC** – do inglês *transverse aortic coarctation*
- TGF β** – Fator de crescimento transformante β
- TL** – *Tibia Length*
- u.a.** – Unidades arbitrárias
- UPS** – Sistema ubiquitina proteassoma

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1. Doenças cardiovasculares e insuficiência cardíaca.....	22
1.2. Hipertrofia cardíaca e remodelamento cardíaco	23
1.3. Sinalização adrenérgica e modelo de estresse cardíaco induzido por isoproterenol.....	27
1.4. Controle de qualidade de proteínas – chaperonas moleculares e degradação proteica no coração.....	28
1.4.1. Chaperonas moleculares no coração	28
1.4.2. Degradação proteica governada por chaperonas e co-chaperonas.....	34
1.5. Co-chaperonas no coração	36
1.5.1. Co-chaperona STI1.....	36
1.5.2. STI1 no coração	39
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. Objetivo geral.....	43
3.2. Objetivos específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. Modelo de superexpressão da STI1	39
4.2. Linhagem STI1-TgA e genotipagem	39
4.3. Modelo de indução de estresse cardíaco por ISO	46
4.4. Análise da morfometria e hipertrofia cardíaca.....	46
4.5. Preparo do tecido cardíaco para histologia	47
4.6. Imunofluorescência	47
4.7. Proteômica do tecido cardíaco	48
4.7.1. Processamento das amostras para espectrometria de massas.....	48
4.7.2. Aquisição de dados de espectrometria de massa.....	49
4.7.3. Identificação de proteínas, quantificação relativa e análise estatística	50
4.8. Ecocardiografia	50

4.9. Isolamento de cardiomiócitos ventriculares	52
4.10. Transiente de Ca^{2+}	53
4.11. Avaliação de contratilidade celular	54
4.12. Western Blotting	54
4.13. Análise da expressão gênica	56
4.14. Análise estatística.....	57
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Caracterização cardíaca do modelo STI1-TgA no estado basal.....	58
5.1.1. A superexpressão da STI1 não altera a expressão da maquinaria das chaperonas e o desenvolvimento hipertrófico fisiológico no coração	58
5.1.2. Análise do proteoma do tecido cardíaco de animais STI1-TgA	64
5.2. Caracterização da resposta cardíaca do camundongo STI1-TgA ao tratamento com isoproterenol	73
6. DISCUSSÃO.....	88
6.1. Camundongos com superexpressão da STI1 apresentam alterações cardíacas que tornam o coração adaptado a possíveis condições de estresse.....	88
6.2. Camundongos com superexpressão da STI1 são protegidos da hipertrofia e remodelamento patológico induzido por isoproterenol.....	91
7. CONCLUSÃO..	97
REFERÊNCIAS.....	92

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Doenças cardiovasculares e insuficiência cardíaca

As doenças cardiovasculares (DCVs) são definidas como doenças que afetam o coração e vasos sanguíneos, como por exemplo a cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e o acidente vascular cerebral. Segundo a organização mundial de saúde, as DCVs acometeram cerca de 17,9 milhões de pessoas no mundo no ano de 2019 (WHO, 2021), fazendo com que as DCVs continuem no pódio das doenças que mais matam no mundo. 80% das mortes por DCVs ocorrem em países de baixa e média renda, tornando-as um grande problema de saúde pública mundial e um grande contribuidor na redução da qualidade de vida (MENSAH *et al.*, 2019; YUSUF *et al.*, 2020; ROTH *et al.*, 2020; WHO, 2021).

Fatores de risco sociais, ambientais e cardiometabólicos são os maiores desencadeadores de DCVs. Dentre estes fatores de risco estão: dieta pobre em nutrientes, obesidade, inatividade física, uso do fumo, uso nocivo de álcool, hipertensão, diabetes, colesterol alto, alta ingestão de sódio, poluição do ar, depressão, baixa escolaridade, entre outros. No entanto, esses fatores de risco cardiovasculares variam ao redor do mundo de acordo com o nível econômico, sendo a dieta pobre em nutrientes, poluição do ar e a baixa escolaridade, os fatores de risco que causam maior mortalidade em países de baixa renda (YUSUF *et al.*, 2020; ROTH *et al.*, 2020).

A insuficiência cardíaca (IC) é uma das consequências comuns à várias DCVs, sendo considerada secundária à várias comorbidades (DUNLAY *et al.*, 2017). A IC é definida como a deficiência na capacidade de bombear sangue de forma adequada em resposta à demanda sistêmica, resultando em um prejuízo funcional ou estrutural do enchimento ventricular ou ejeção do sangue (YANCY *et al.*, 2013). Ela pode ser induzida por estímulos comuns a cardiopatias como hipertensão, infarto do miocárdio, isquemia, malformações congênitas, cardiomiopatia e arritmias (NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018). Além disso, pacientes com IC são acometidos com outras comorbidades em mais de 50% dos casos, aumentando o risco de hospitalização e a piora do quadro clínico (BRAUNSTEIN *et al.* 2003; WONG *et al.*, 2011).

Além de ser classificada como aguda ou crônica, na prática clínica a IC também é classificada de acordo com a medida da fração de ejeção (FE) ventricular. Segundo a *European Society of Cardiology*, são considerados pacientes com IC com FE preservada (do inglês

HFpEF) quando a FE é $\geq 50\%$ e IC com FE reduzida (do inglês HFrEF) quando a FE é $< 40\%$ (PONIKOWSKI et al., 2016). Devido a dificuldade em diagnosticar pacientes com FE entre 40-49%, uma nova categoria foi proposta pela *American College of Cardiology/American Heart Association/European Society of Cardiology*, sendo denominada como IC com FE intermediária (do inglês HFmrEF). Neste contexto, a HFmrEF é considerada na prática clínica como uma forma moderada da HFrEF (YANCY et al., 2013; PONIKOWSKI et al., 2016).

Pacientes com HFpEF representam ~50% dos casos de IC na maioria dos estudos clínicos e, além disso, sendo que na maioria a terapêutica não é exitosa (DUNLAY, ROGER e REDFIELD, 2017). Isso ocorre na maioria das vezes devido a um difícil diagnóstico da HFpEF, que além de ser uma causa primária de IC também é comumente uma causa secundária à diversas comorbidades (DUNLAY et al., 2017; PFEFFER et al., 2019; BORLAUG, 2020). Pacientes com HFpEF podem apresentar anormalidades na função cardíaca de forma grave, enquanto que em outros casos eles apresentam função hemodinâmica normal em repouso, mas que se torna anormal durante o exercício físico. Nesses pacientes, também é observado o desenvolvimento de lesão no miocárdio e função cardíaca prejudicada, desencadeando uma série de sintomas que aumentam o risco de hospitalização por IC e até mesmo o risco de mortalidade (BORLAUG, 2020). Assim, é de grande importância o diagnóstico personalizado de pacientes com IC, bem como, o tratamento adequado para cada causa e tipo específico.

1.2. Hipertrofia cardíaca e remodelamento cardíaco

O coração é considerado uma bomba propulsora que tem como função principal bombear sangue por meio do sistema circulatório para todo o corpo, no intuito de suprir as necessidades metabólicas e realizar as trocas gasosas nos pulmões e tecidos periféricos. Sob estímulos fisiológicos ou patológicos, o coração sofre um processo de crescimento chamado hipertrofia cardíaca (HC), onde o coração se modifica alterando sua forma, massa e volume, no intuito de se adaptar a uma sobrecarga de trabalho hemodinâmica para compensar a função de bombeamento cardíaco e diminuir a tensão na parede do ventrículo (BERNARDO et al., 2010; MAILLET et al., 2013).

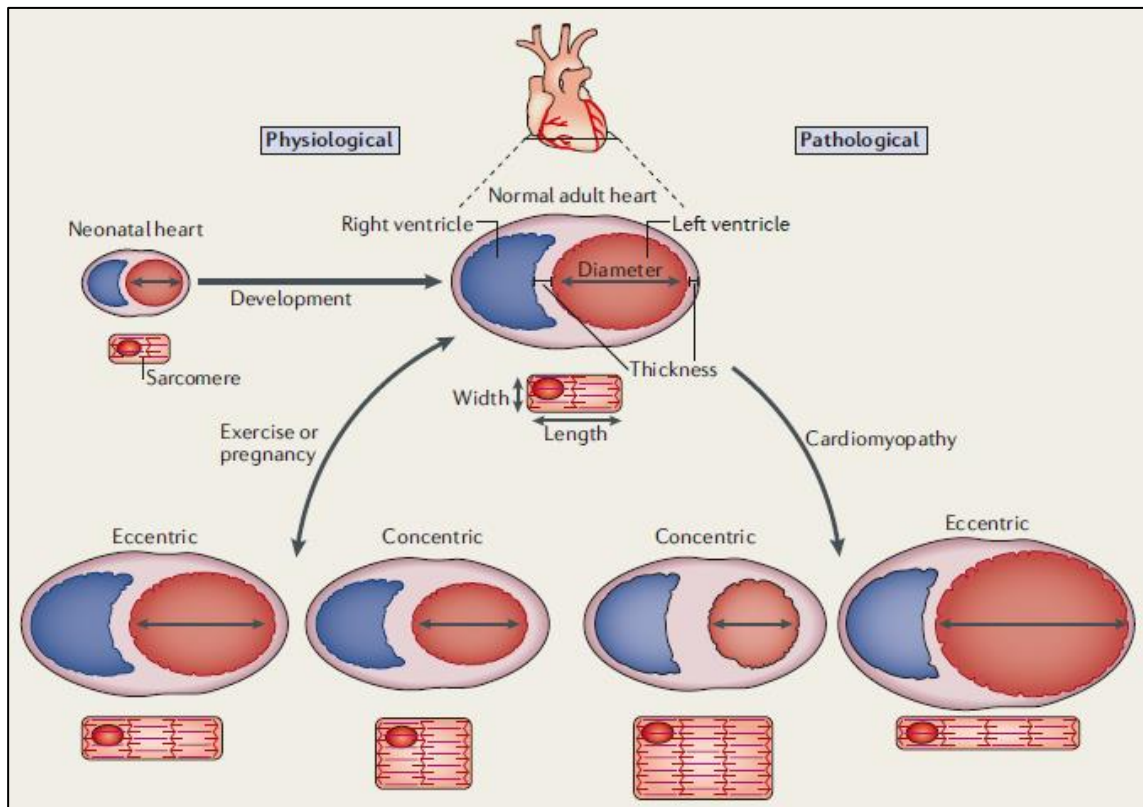
Embora a HC seja um mecanismo adaptativo do coração em resposta a estresses fisiopatológicos, quando sustentada ela pode ser um preditor de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, cardiomiopatia dilatada, doença cardíaca isquêmica e morte súbita

(BERNARDO *et al.*, 2010). A HC pode ocorrer em resposta ao desenvolvimento, causando uma hipertrofia “maturacional” que se inicia no nascimento até a vida adulta. Além disso, ela também pode ser classificada como “fisiológica”, quando associada à estímulos induzidos pelo exercício físico ou gravidez, ou como “patológica”, quando decorre de estímulos indutores de doenças (HEINEKE e MOLKENTIN, 2006; MAILLET *et al.*, 2013).

Os miócitos cardíacos, conhecidos como cardiomiócitos (CMs), representam as unidades funcionais contráteis do coração. Na fase pós-natal do desenvolvimento, os CMs perdem sua capacidade de divisão celular e iniciam-se vários eventos de sinalização intracelular para que ocorra o crescimento do tamanho da célula e, conseqüente, aumento da massa cardíaca, por um processo chamado de hipertrofia maturacional (PASUMARTHI e FIELD, 2002; AHUJA *et al.*, 2007). Essa hipertrofia ocorre devido a uma série de eventos que incluem: aumento na carga funcional, ativação de vias de sinalização, mudanças na expressão gênica, aumento da taxa de síntese proteica e organização das proteínas contráteis em unidades sarcoméricas (BERNARDO *et al.*, 2010).

Embora o coração seja composto por outros tipos celulares além de CMs, como fibroblastos, células endoteliais, células imunes e células progenitoras, a hipertrofia do tecido cardíaco se dá principalmente pelo aumento do tamanho dos CMs. Alterações na geometria do coração e tamanho dos CMs classificam a hipertrofia como concêntrica ou excêntrica. Na HC excêntrica fisiológica, ocorre um aumento no comprimento e largura de CMs que reflete em um aumento moderado do volume ventricular, enquanto que na HC excêntrica patológica, ocorre um aumento no comprimento de CMs que reflete em dilatação ventricular com redução da espessura da parede ventricular. Na HC concêntrica fisiológica, há aumento na largura de CMs, com redução no volume ventricular, aumentando a espessura da parede ventricular e do septo de forma moderada. Já na HC concêntrica patológica, ocorre um aumento significativo na largura de CMs com redução no volume ventricular, devido a um aumento na espessura da parede e do septo ventricular (Figura 1) (MAILLET *et al.*, 2013).

Figura 1 - Tipos e características estruturais da hipertrofia cardíaca: hipertrofia fisiológica e patológica.



Fonte: Adaptado de NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018.

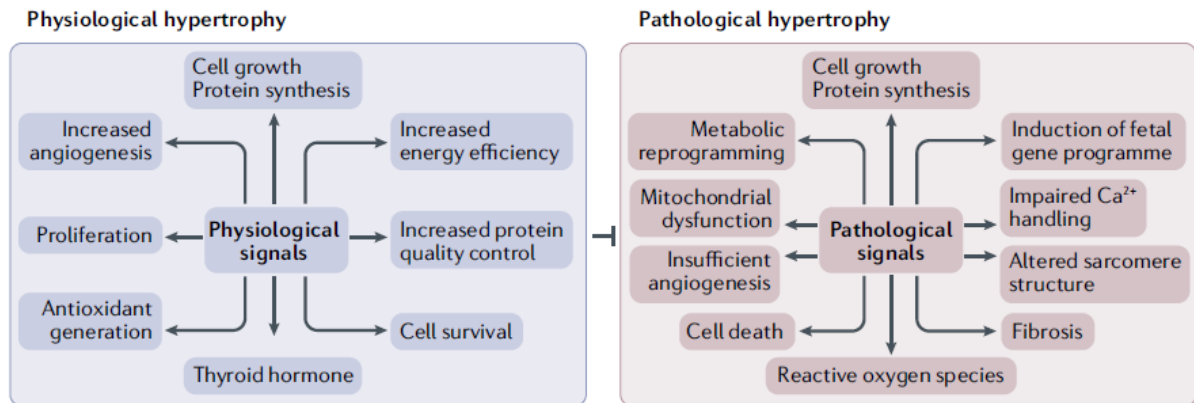
Além da hipertrofia de CMs e da massa cardíaca, um conjunto de alterações caracterizam o processo chamado de remodelamento cardíaco, que pode ser fisiológico ou patológico, de acordo com os estímulos e características presentes em cada tipo. De modo geral, no remodelamento fisiológico além de um moderado aumento na massa cardíaca que varia de 10-20%, também é observada uma função contrátil preservada ou aumentada; sem presença de fibrose tecidual e morte celular; e preservados ou reduzidos níveis de expressão de genes fetais como: *NPPA*, *NPPB*, *MYH7* e *ACTA1* (genes que codificam para: ANP, BNP, β -MHC e α -actina muscular esquelética, respectivamente). Em adição, é importante ressaltar que todas essas características de remodelamento fisiológico são adaptativas e reversíveis (MAILLET *et al.*, 2013; NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018).

No remodelamento patológico é observada a reexpressão e aumento do RNAm que codifica para os genes fetais; fibrose cardíaca, com níveis aumentados de colágeno I e III; morte celular; ativação de miofibroblastos; contratilidade preservada ou diminuída; e alterações na expressão de proteínas que participam do manejo do Ca^{2+} ; características estas que podem progredir para disfunção e IC. Embora inicialmente o remodelamento cardíaco patológico seja adaptativo, em estágios avançados ele se torna mal adaptativo e irreversível, sendo possível

reverter apenas com tratamento adequado (MAILLET *et al.*, 2013; NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018).

Os estímulos que induzem hipertrofia fisiológica desencadeiam uma série de eventos celulares e moleculares que caracterizam uma hipertrofia adaptativa, onde o coração altera sua estrutura e função para aumentar a sua eficiência. Dentre estes eventos, podemos observar um aumento na taxa de síntese proteica, ativação da sinalização de sobrevivência celular, aumento na eficiência e produção de energia, aumento da resposta antioxidante, angiogênese, melhora do controle de qualidade de proteínas, entre outras. Quando os estímulos hipertróficos são sustentados o coração sofre remodelamento mal adaptativo, ocasionando em hipertrofia patológica, que pode ter como consequência a disfunção cardíaca. Além do aumento na síntese proteica é observado morte celular, fibrose, indução da expressão do programa de genes fetais, angiogênese insuficiente, reprogramação metabólica, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e disfunção mitocondrial. Em conjunto, essas características nos trazem uma distinção entre as respostas hipertróficas fisiológica e patológica (Figura 2) (NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018).

Figura 2 - Características celulares e moleculares gerais da hipertrofia fisiológica e patológica.



Fonte: Adaptado de NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018.

1.3. Sinalização adrenérgica e modelo de estresse cardíaco induzido por isoproterenol

Estímulos estressores que induzem hipertrofia e remodelamento cardíaco são constantes desafios fisiopatológicos que precisam ser enfrentados pelo coração para manter seu funcionamento adequado. A ativação do sistema nervoso simpático tem como principal função no coração responder aos estímulos estressores, por meio da liberação das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), aumentando a frequência cardíaca e contratilidade de CMs, bem como, induzindo alterações celulares e moleculares de adaptação ao estresse (BAKER, 2014).

A sinalização adrenérgica é ativada pela ligação das catecolaminas aos receptores adrenérgicos do tipo α (α_1 , α_2) e β (β_1 , β_2 e β_3) acoplados a proteína G que, uma vez ativados desencadeiam vias de sinalização estimulatórias (vias $G\alpha_q$ e $G\alpha_s$) ou inibitória (via $G\alpha_i$) (BRODDE e MICHEL, 1999). Em CMs provenientes de corações saudáveis, a resposta adrenérgica estimulatória se dá principalmente pelos receptores β -adrenérgicos β_1 e β_2 . Os receptores β_1 são predominantes, com maior expressão e a noradrenalina tendo uma maior afinidade por esses receptores, comparados a β_2 , desencadeando uma resposta de aumento da força de contração cardíaca (RICHARDSON, *et al.*, 1967). Os receptores β_2 se tornam mais expressos em corações com insuficiência e a ativação das vias estimulatórias aumentam o efeito inotrópico positivo (BRISTOW *et al.*, 1986). Embora a expressão de receptores β_3 seja reduzida em corações saudáveis, sua expressão é aumentada na IC, levando a ativação da via inibitória e atenuando os efeitos inotrópicos positivos em corações com falência (BALLIGAND, 2013).

A ativação da sinalização β -adrenérgica no coração tem papel importante na resposta fisiopatológica, sendo este mecanismo considerado cardioprotetor à curto prazo. No entanto, quando hiperestimulada a longo prazo, ela se torna cardiotóxica e contribui para a deterioração da função cardíaca em estágios avançados da IC (BAKER, 2014). Agonistas β -adrenérgicos quando se ligam a esses receptores ativam a proteína G, que se desacopla e induz a produção de AMPc, via adenilato ciclase (AC), que por sua vez, desencadeia a ativação da proteína kinase A (PKA). Em CMs, a PKA é responsável por fosforilar uma série de proteínas alvo regulatórias envolvidas com a sinalização de Ca^{2+} intracelular que regulam a contração de CMs. Desse modo, a PKA induz o aumento dos efeitos lusitrópico (velocidade de relaxamento) e inotrópico positivo (contratilidade). Dentre as proteínas alvo fosforiladas pela PKA estão: proteínas dos miofilamentos cardíacos (troponina T, I e C), proteínas do retículo sarcoplasmático (RS)

(fosfolambam (PLN) e receptor de rianodina (RyR)) e canais de Ca^{2+} do tipo L (NAJAFI *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram o aumento dos níveis circulantes das catecolaminas como preditor de risco para o desenvolvimento de hipertrofia e cardiopatias (GREENWOOD *et al.*, 2001; SCHLAICH *et al.*, 2003; SCHLAICH *et al.*, 2005; STRAND *et al.*, 2006). Diversos modelos de estresse cardíaco são utilizados para avaliar o desenvolvimento da hipertrofia e remodelamento cardíaco, com destaque para o modelo de hipertrofia e lesão cardíaca induzida pelo agonista β -adrenérgico não seletivo isoproterenol (ISO) (OSADCHII, 2007).

Em mamíferos, como camundongos e ratos, a hiperativação adrenérgica pelo ISO é bem descrita na literatura induzindo efeitos hipertróficos como: aumento da massa ventricular e do tamanho de CMs, além de aumento na síntese proteica. Também é observado remodelamento cardíaco adaptativo e mal adaptativo, que são tempo e dose-dependentes (NICHTOVA *et al.*, 2012), causando efeitos como: reexpressão de genes fetais, morte celular, fibrose, estresse oxidativo, alteração na expressão e atividade de proteínas do manuseio de Ca^{2+} e contratilidade de CMs alterada, podendo ter como consequência a IC (OSADCHII, 2007). Dessa forma, esse modelo se tornou ideal para o estudo da resposta patológica ao estresse cardíaco.

1.4. Controle de qualidade de proteínas – chaperonas moleculares e degradação proteica no coração

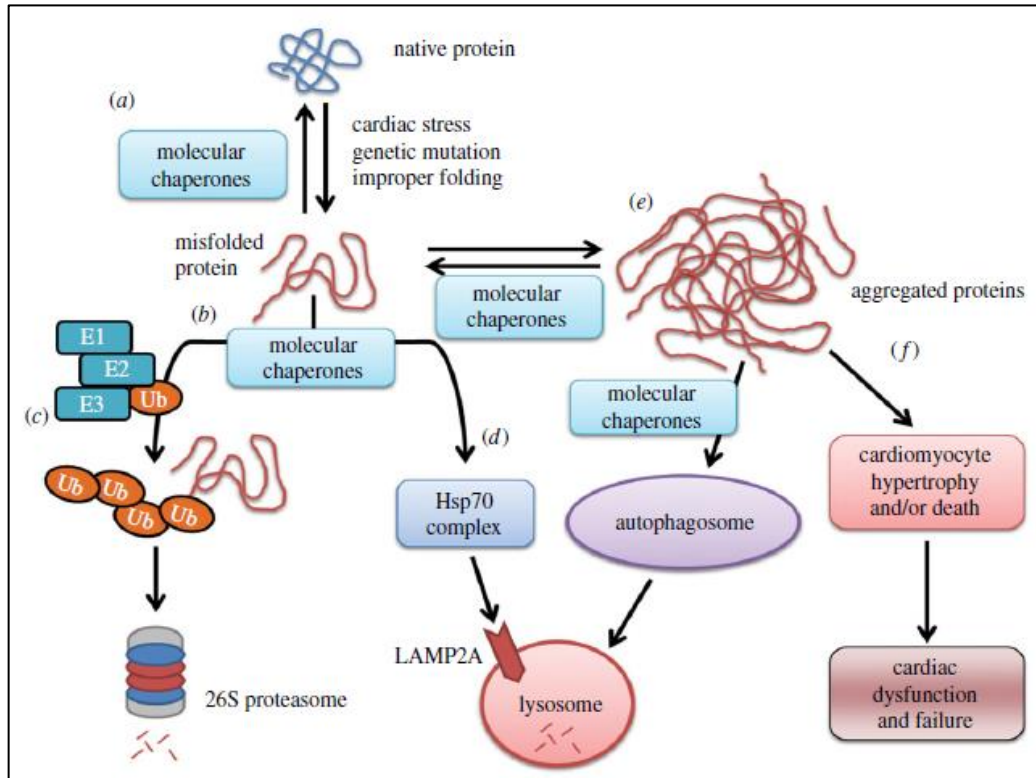
1.4.1. Chaperonas moleculares no coração

Para que as células funcionem adequadamente, a integridade estrutural das proteínas celulares precisa ser mantida de forma rigorosa. Problemas no enovelamento, desnaturação e agregação de proteínas são constantes desafios fisiológicos celulares e aumentam quando as células são submetidas a períodos prolongados de estresse (ODUNUGA *et al.*, 2004). O aumento na demanda contrátil e metabólica do coração sob estresse requer um fino controle de qualidade de proteínas, que inclui os processos de estabilização, reenovelamento, prevenção da agregação e degradação proteica. Em conjunto, esses mecanismos compõem a homeostase proteica e são vitais para a sobrevivência celular (HARTL *et al.*, 2011). Condições patológicas

como estresse oxidativo e mecânico, mudança de pH e temperatura e mutações genéticas são conhecidas por induzirem acúmulo de proteínas mal enoveladas. Esse acúmulo e agregação de proteínas mal enoveladas é tóxico para os CMs podendo levar a doenças cardíacas como cardiomiopatia dilatada, arritmia e IC por meio da hipertrofia e/ou morte de CMs, ou mimetizar proteinopatias no coração de humanos com IC (Figura 3) (WILLIS e PATTERSON, 2013; RANEK *et al.*, 2017).

Neste contexto, uma classe de proteínas chamadas chaperonas moleculares atua para proteger o coração do acúmulo de proteínas mal enoveladas. A maior família de chaperonas é chamada de *heat-shock protein* (HSP), que são proteínas adaptadas a modificações de temperatura, que além de terem sua expressão induzida pelo estresse térmico, também respondem a condições como isquemia, privação de nutrientes e inflamação (LINDQUIST e CRAIG, 1988). As chaperonas têm como função permitir o correto enovelamento proteico sob condições fisiopatológicas, conduzindo a proteína cliente a sua estrutura nativa funcional e regulando o balanço entre maturação e degradação proteica, e assim protegendo o coração da morte celular e IC (Figura 3). Dentre as HSPs, as famílias das HSP70 e HSP90 são as mais expressas em CMs e desempenham papéis importantes em resposta a patologias cardíacas (TARONE e BRANCACCIO, 2014; RANEK *et al.*, 2017).

Figura 3 - Controle de qualidade de proteínas mediado por chaperonas. As chaperonas moleculares permitem o correto enovelamento proteico sob condições fisiopatológicas, conduzindo proteínas mal enoveladas a sua estrutura nativa e funcional, ou até mesmo levando a degradação de proteínas mal enoveladas e agregados proteicos, e assim protegendo o coração da morte celular e disfunção cardíaca.



Fonte: RANEK *et al.*, 2017.

A família das chaperonas HSP70 são proteínas monoméricas, continuamente expressas, encontradas na membrana plasmática, citosol, núcleo e meio extracelular. Em resposta ao estresse, a regulação positiva da chaperona HSP70 tem efeito na promoção da sobrevivência celular. No coração, a HSP70 e sua proteína homóloga HSC70, previnem o desenvolvimento de doenças por meio da proteção de CMs ao estresse. Enquanto a HSP70 responde a estímulos protetores ou de estresse aumentando sua expressão, a HSC70 tem expressão constitutiva (RANEK *et al.*, 2017). Sob condições fisiológicas, a HSP70 tem como funções: corrigir o enovelamento de polipeptídeos recém sintetizados, renovar proteínas mal enoveladas e transportar proteínas no meio intracelular (HARTL, 1996).

Estudos demonstraram o aumento da expressão da HSP70 em condições de estresse cardíaco fisiopatológico, como em corações humanos pós cirurgia de revascularização do miocárdio e pinçamento aórtico, pós isquemia em coelhos e no pré-condicionamento isquêmico em ratos (KNOWLTON *et al.*, 1991; QIAN *et al.*, 1999; DE JONG *et al.*, 2009). Interessantemente, também foi observada uma relação de menor incidência de fibrilação atrial pós-operatório em pacientes com níveis elevados de HSP70, comparado a pacientes com baixos

níveis de HSP70 (RAMMOS *et al.*, 2002; MANDAL *et al.*, 2005). O aumento da expressão da HSP70 por meio de adenovírus protegeu CMs da apoptose induzida por H₂O₂ (GOUSSETIS e MESTRIL, 2006) e, em adição, a superexpressão da HSP70 em animais transgênicos protegeu da isquemia-reperfusão aguda, hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão, cardiomiopatia dilatada e IC (WEEKS *et al.*, 2012; SAPRA *et al.*, 2014). Também foi reportado que o exercício físico induz a expressão da HSP70, no entanto, seu mecanismo cardioprotetor ainda é desconhecido (RANEK *et al.*, 2017).

As chaperonas HSP90 são as chaperonas mais abundantes no citosol, podendo também serem encontradas na matriz mitocondrial, retículo sarcoplasmático e associada a proteínas na membrana plasmática (RANEK *et al.*, 2017). Dentre as isoformas citosólicas, a HSP90 α é uma isoforma induzida por estresse, enquanto que a isoforma HSP90 β é constitutivamente expressa (WEGELE *et al.*, 2004; PEARL E PRODROMOU, 2006). Por meio da interação com proteínas estabilizadoras, a HSP90 tem como principal função ajudar na estabilização de proteínas em resposta ao estresse térmico para diminuir a agregação de proteínas mal enoveladas, bem como, também auxilia na maturação e degradação proteica. Dentre as chaperonas moleculares, a HSP90 parece ser mais seletiva do ponto que ela é capaz de reconhecer proteínas mal enoveladas e direcionar para a degradação via poliubiquitinação e proteassoma 26S (RANEK *et al.*, 2017). A HSP90 possui sítios de ligação para centenas de proteínas clientes e dezenas de co-chaperonas (PICARD, 2017), assim conferindo a ela maior controle na triagem de proteínas.

No coração, foi reportado que a isquemia cardíaca induz a expressão da HSP90 regulada pela HSF1 (*heat shock factor 1*), que responde ao aumento na produção de ROS na isquemia reperfusion ou concentração de ATP (NISHIZAWA *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2001). A superexpressão da HSP90, em um modelo animal de infarto do miocárdio em porco, causou a redução no tamanho do infarto e preveniu o aumento da pressão diastólica final após isquemia-reperfusion, mostrando um efeito cardioprotetor da HSP90 (KUPATT *et al.*, 2004). Entretanto, em condições experimentais *in vitro* e *in vivo* em ratos foi demonstrada uma provável relação da HSP90 na ativação da via de sinalização Raf/MAPK/ERK, uma via conhecida por induzir hipertrofia cardíaca após infarto do miocárdio. Nesse estudo, foi observado que o uso do inibidor da HSP90, dimetoxi-geldanamicina (17-AAG), atenuou os efeitos hipertróficos induzidos por endotelina-1 (ET), bem como, também atenuou a fosforilação e ativação da via Raf/MAPK/ERK. Desse modo, mostrando também uma relação da HSP90 com o desenvolvimento da HC após IM (TAMURA *et al.*, 2018). Em adição, também foi demonstrado o envolvimento da HSP90 no efeito cardioprotetor do pós-condicionamento isquêmico (IPC),

onde a inibição da HSP90 pelo 17-AAG aboliu os efeitos protetores do IPC (WANG *et al.*, 2020), desse modo, mostrando um efeito dual da HSP90 no coração.

Estudos reportaram a interação da HSP90 com a proteína quinase B (AKT), proteína importante na sinalização de sobrevivência celular quando ativada em resposta ao crescimento cardíaco hipertrófico fisiológico induzido pelo exercício, mas também, ativada em resposta a hipertrofia patológica induzida por sobrecarga de pressão (FREY e OLSON, 2003; BERNARDO *et al.*, 2010). A associação da AKT com a HSP90 foi mostrada por Sato *et al.* (2000), os quais mostraram que a interação da AKT ativa (fosforilada) à HSP90 previne a desfosforilação da AKT pela proteína fosfatase 2 (PP2A). Em outros estudos, a interação entre HSP90 e AKT, fosforila e ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em cavéolas. Além disso, outro estudo demonstrou que essa interação desempenha um papel anti-apoptótico em CMs, após dano mediado por hipóxia, por meio da ativação da via de sinalização da PI3K/AKT (BROUET *et al.*, 2001; FONTANA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2007). O sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi demonstrado desempenhar um papel protetor na lesão cardíaca induzida por alta glicose. Esse efeito é mediado por alterações nos níveis de HSP90 e fosforilação da AKT, ativando a via da AKT e desencadeando efeitos como aumento da viabilidade celular, redução da apoptose, ROS e do potencial de membrana mitocondrial (KE *et al.*, 2017).

A HSP90 também desempenha um importante papel no remodelamento cardíaco causado pela hipertrofia e IC. No remodelamento patológico, os fibroblastos cardíacos são responsáveis pela produção de colágeno que compõe a matriz extracelular. Estudos demonstraram que a HSP90 extracelular está envolvida na produção de colágeno por fibroblastos por meio da interação da HSP90 com receptores do fator de crescimento transformante beta (TGF β) presentes nos fibroblastos (GARCIA *et al.*, 2016). Uma vez que o receptor TGF β é ativado, a sinalização do TGF β ativa fibroblastos adjacentes para depositar matriz extracelular. Garcia *et al.* (2016) também mostraram que a inibição da HSP90 prejudicou a produção de colágeno e a sinalização do TGF β . Outro estudo mostrou que a HSP90 de CMs modula a produção de colágeno via ativação de STAT-3 em fibroblastos, onde ratos *knockdown* para HSP90 exibiram uma redução na produção de colágeno após sobrecarga de pressão induzida por ligadura da artéria renal, mostrando o papel essencial da HSP90 na modulação da deposição de colágeno no remodelamento patológico (DATTA *et al.*, 2017).

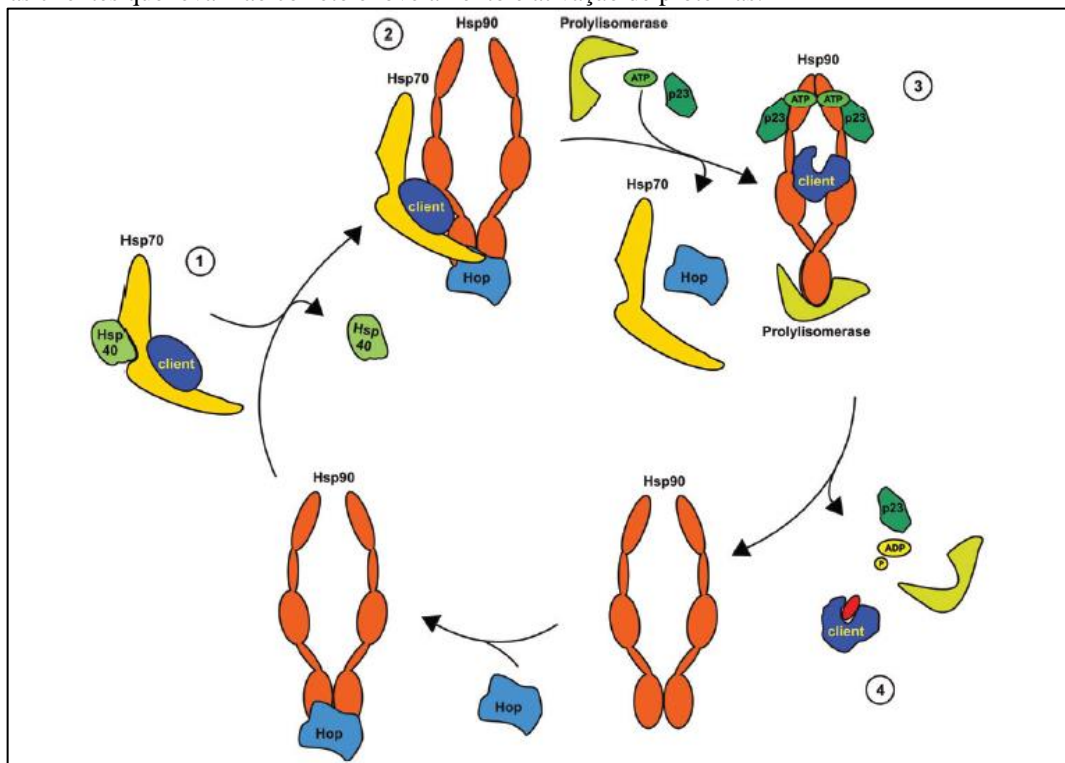
Embora as HSP70 e HSP90 desempenhem suas funções de chaperonas de forma independente uma da outra, elas também interagem entre si formando uma maquinaria que desempenha papéis no remodelamento e triagem de diversas proteínas, chamada de maquinaria HSP70/HSP90. Esta maquinaria é formada além das HSPs, por proteínas adaptadoras chamadas

de co-chaperonas. As co-chaperonas são necessárias para mediar a regulação da especificidade dessa maquinaria por proteínas alvo, a dinâmica de hidrólise e ligação ao ATP pelas HSPs, em particular das HSP70 e HSP90, além de participarem no direcionamento de proteínas mal enoveladas aos processos de degradação via proteassoma ou autofagossoma (CAPLAN, 2003; ODUNUGA *et al.*, 2004).

Brevemente como revisado e esquematizado por Tarone e Brancaccio (2014, p.349) a maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90, juntamente com co-chaperonas acessórias funciona da seguinte maneira:

“primeiramente, a HSP70 se liga a um substrato, conhecido como proteína “cliente”, assistida por sua co-chaperona HSP40. Uma co-chaperona adicional, Hop, então promove a transferência da proteína cliente para a HSP90, que por subsequentes ciclos de hidrólise de ATP facilita mudanças conformacionais na proteína cliente. Este mecanismo envolve co-chaperonas adicionais, como p23 e proilisolomerase, capazes de regular a atividade ATPase da HSP90 e o enovelamento proteico (YOUNG *et al.*, 2001)” (Figura 4).

Figura 4 - Maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90. A maquinaria HSP70/HSP90 funciona em conjunto com proteínas acessórias, que por consecutivos ciclos de hidrólise de ATP permitem mudanças conformacionais em proteínas clientes que levam ao correto enovelamento e ativação de proteínas.



Fonte: TARONE e BRANCACCIO, 2014.

A maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90 atua em conjunto com o sistema ubiquitina proteassoma (UPS), bem como, com os processos de autofagia, com o intuito de direcionar proteínas mal enoveladas que não alcançaram sua forma nativa ou agregados proteicos para a

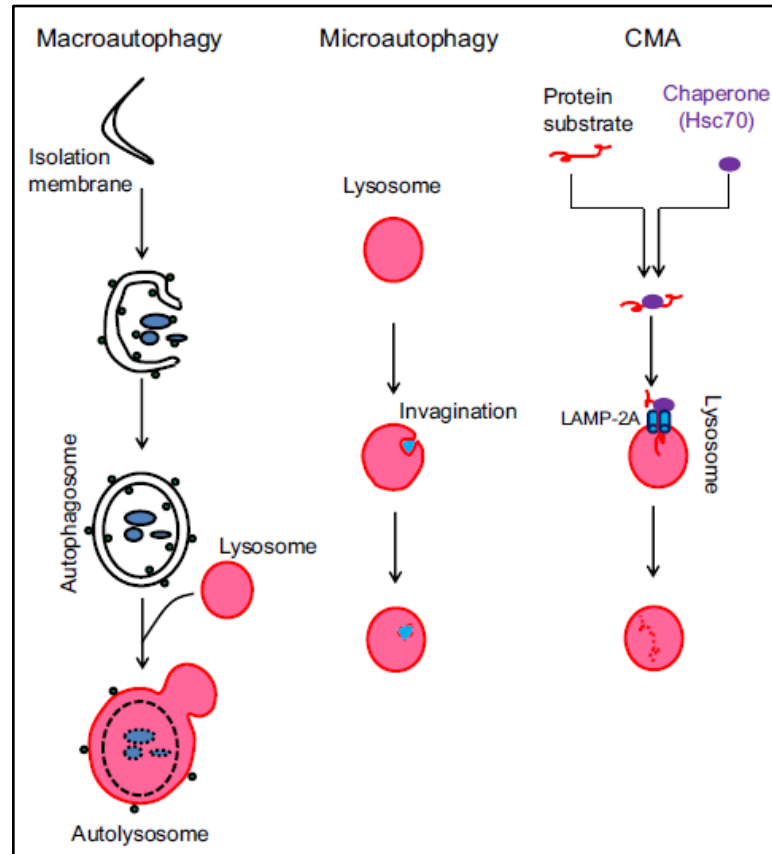
degradação. Enquanto a HSP70 se liga à polipeptídeos recém sintetizados, a interação com a HSP90 se dá de forma tardia no processo de enovelamento/reenovelamento da proteína cliente.

1.4.2. Degradação proteica governada por chaperonas e co-chaperonas

A degradação de proteínas mal enoveladas e agregados proteicos é de extrema importância na regulação da homeostase proteica e reciclagem de proteínas sarcoméricas, que são necessárias para a função contrátil adequada e regulação da hipertrofia cardíaca (LI *et al.*, 2012). Dois processos de degradação proteica são governados pelas chaperonas, sendo eles a degradação via UPS e a autofagia. Para que proteínas mal enoveladas sejam direcionadas ao UPS, chaperonas atuam por interação direta com enzimas ubiquitina ligases, que são responsáveis por marcarem proteínas mal enoveladas com moléculas de ubiquitina para serem reconhecidas pelo UPS e sofrerem degradação. No coração, essa via é ativada pela interação da HSP70 com a co-chaperona Bag1 e a ubiquitina ligase CHIP, controlando a degradação da miosina e outras proteínas sarcoméricas. Na via autofágica, agregados de proteínas mal enoveladas e até mesmo organelas celulares danificadas são envolvidas por vacúolos autofágicos, que se fundem aos lisossomos e permitem a degradação por hidrolases lisossomais (TARONE e BRANCACCIO, 2014).

A autofagia é classificada em três tipos principais de acordo com o tipo de direcionamento ao lisossomo para degradação, sendo eles a macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Figura 5). Na macroautofagia, uma vesícula é formada por uma dupla membrana, chamada de autofagossomo, envolvendo uma porção do citoplasma contendo proteínas mal enoveladas, proteínas agregadas ou organelas citoplasmáticas direcionadas para degradação. Essa vesícula se funde com o lisossomo e degrada o conteúdo por meio de hidrolases lisossomais. A microautofagia ocorre por engolfamento de material citosólico que é internalizado por meio da invaginação da membrana do lisossomo (WANG e CUI, 2017). Na CMA, proteínas alvo são seletivamente reconhecidas e se ligam a um complexo chaperona-chaperona que as entregam para a membrana lisossomal, ligando-as a proteína receptora LAMP-2A (*lysosomal-associated membrane protein type 2A*) e após desenovelamento, elas são translocadas para dentro do lisossomo com o auxílio de chaperonas residentes do lisossomo, e por fim degradadas no lúmen lisossomal (KAUSHIK e CUERVO, 2006) (Figura 5).

Figura 5 - Tipos de degradação proteica via autofagia celular. Na macroautofagia, uma vesícula de dupla membrana é formada (autofagossomo), envolvendo uma porção do citoplasma contendo proteínas mal enoveladas, proteínas agregadas ou organelas citoplasmáticas direcionadas para degradação. Por fim, essa vesícula se funde ao lisossomo e degrada o conteúdo por meio de hidrolases lisossomais. A microautofagia ocorre por engolfamento de material citosólico que é internalizado por invaginação da membrana do lisossomo e consequente degradação lisossomal. Na CMA, proteínas alvo são seletivamente reconhecidas por um complexo chaperona-chaperona que as entregam para a membrana lisossomal, ligando-as a proteína receptora LAMP-2, translocando-as para o lisossomo e por fim ocorre a degradação lisossomal



Fonte: WANG e CUI, 2017.

No coração, a macroautofagia e a CMA participam no controle de qualidade de proteínas e homeostase proteica, sendo a macroautofagia o processo mais estudado na fisiopatologia cardíaca. A nível basal, a autofagia ocorre como um mecanismo para sobrevivência celular e suprimento de nutrientes. No coração o nível de autofagia é alterado em resposta ao estresse como isquemia-reperfusão, hipertrofia cardíaca e IC. Em CMs, os vacúolos autofágicos são encontrados em corações isquêmicos e já foram reportados na insuficiência cardiomiopática em humanos (DECKER e WILDENTHAL, 1980; YAN *et al.*, 2005; SHIMOMURA *et al.*, 2006). Em adição, ela também desempenha um papel importante na morte celular por preceder os processos de apoptose e necrose, realizando um *crossstalk* entre estes eventos (BAEHRECKE,

2005; KROEMER *et al.*, 2010). Logo, se faz importante a análise da autofagia no contexto da fisiopatologia cardíaca.

No coração, a ativação da autofagia foi reportada pela ação da co-chaperona Bag3 e da pequena HSPB8, atuando no processo chamado autofagia seletiva assistida por chaperona (ARNDT *et al.*, 2010), enquanto a co-chaperona Bag-1 foi mostrada ativar a macroautofagia (TOWNSEND *et al.*, 2004). Com relação a co-chaperona STI1, ainda não há conhecimento sobre o seu envolvimento em vias autofágicas.

1.5. Co-chaperonas no coração

Chaperonas e co-chaperonas são consideradas moléculas mediadoras da proteção cardíaca em diversos estudos, onde demonstraram que sua expressão é induzida em modelos de estresse cardíaco patológico e desempenham papéis críticos na manutenção da integridade cardíaca. Mutações nas co-chaperonas BAG-3 e BAG-5, foram reportadas na cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca (FANG *et al.*, 2017; HAKUI *et al.*, 2022). A co-chaperona BAG-1 atua na cardioproteção pela capacidade de inibir a apoptose e induzir a autofagia, protegendo cardiomiócitos da lesão por isquemia-reperfusão cardíaca, e além disso, desempenhando esse papel por meio da interação com as chaperonas HSP70 e HSC70 (TOWNSEND *et al.*, 2004). A co-chaperona pDJA1 (semelhante a co-chaperona DnaJ) foi mostrada aumentar sua expressão durante a isquemia e proteger CMs da apoptose induzida por estaurosporina (DEPRE *et al.*, 2003). Embora a STI1 tenha sua expressão presente no coração, seu papel ainda precisa ser melhor elucidado na fisiopatologia cardíaca.

1.5.1. Co-chaperona STI1

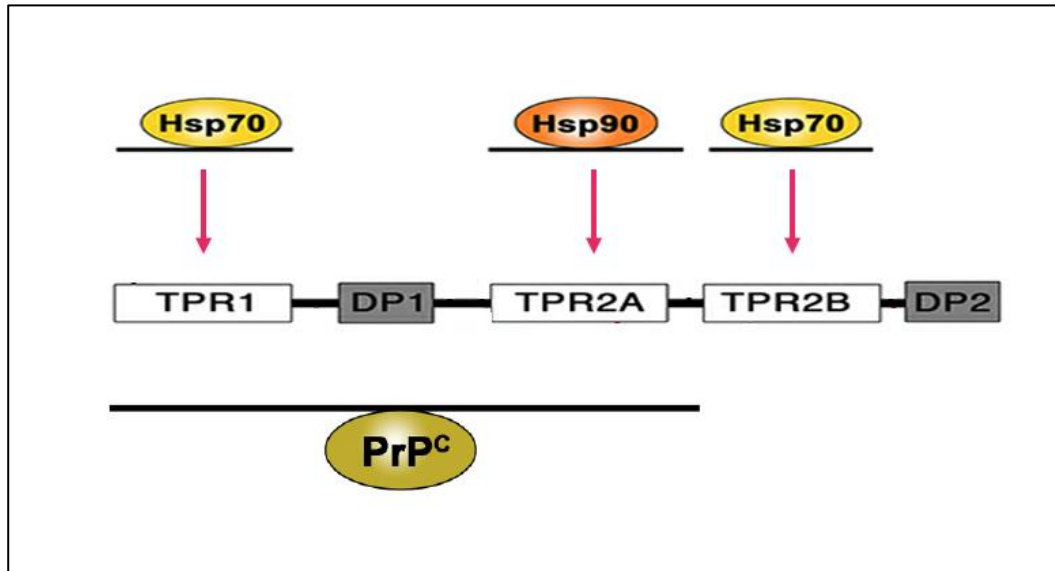
A STI1 ou *STIP1* (*stress inducible protein 1; stress inducible phosphoprotein 1*), também conhecida em humanos como Hop (*Hsp70/Hsp90 organising protein*), é uma co-chaperona capaz de modular a atividade do complexo das chaperonas Hsp70/Hsp90 (LACKIE *et al.* 2017). Esse complexo é responsável por prevenir a agregação e precipitação de proteínas

mal enoveladas, além de formar uma importante rede de chaperonas moleculares necessárias no enovelamento e maturação de proteínas reguladoras chaves, dentre elas moléculas de sinalização intermediárias ou fatores de transcrição. A STI1, como co-chaperona, atua transferindo proteínas clientes (proteínas que irão passar pelo correto processo de enovelamento e maturação) entre as chaperonas Hsp70 e Hsp90 se ligando a ambas para manter o controle de qualidade das proteínas clientes (LASSLE *et al.* 1997; SCHMID *et al.* 2012). Além desta função específica, estudos têm demonstrado o envolvimento da STI1 com diversos eventos celulares além do enovelamento de proteínas, como: transcrição, replicação viral, transdução de sinais e divisão celular, independente do complexo da Hsp70/Hsp90 (ODUNUGA *et al.*, 2004).

O gene que codifica para a STI1, o *STI1*, está presente no genoma de humano, camundongo, rato, inseto, levedura, plantas, parasitas e até mesmo vírus (ODUNUGA *et al.*, 2004). A STI1 foi inicialmente descrita como uma proteína de resposta ao estresse, a qual possui expressão aumentada após choque térmico similar as HSPs (BLATCH *et al.*, 1997; LASSLE *et al.*, 1997). Em camundongos, a STI1 é expressa nos estágios iniciais do embrião (HAJJ *et al.*, 2009), sendo essencial para o desenvolvimento, uma vez que embriões *knockout* totais para a STI1 não sobrevivem após o estágio E10.5 (BERALDO *et al.* 2013). A STI1 é expressa em diversos tecidos, incluindo o coração, e possui diversas localizações celulares, podendo estar presente no citoplasma, nos complexos de transcrição nuclear ou até mesmo na superfície celular, embora não possua domínio transmembrana ou peptídeo sinal para transporte (LASSLE *et al.* 1997; ZANATA *et al.*, 2002).

A estrutura da STI1 é modular, sendo composta por três domínios chamados domínios TPR (tetratricopeptídeos), sendo eles os domínios TPR1, TPR2A e TPR2B) e dois domínios ricos em resíduos de aspartato e prolina (DP1 e DP2) (Figura 6). Os domínios TPR da STI1 são responsáveis pela ligação direta ao complexo HSP70/HSP90 para facilitar a transferência de proteínas clientes entre elas (SCHMID *et al.*, 2012), onde o domínio TPR1 é sítio de ligação para a sequência de peptídeos EEVD, C-terminal da HSP70, enquanto o domínio TPR2A é sítio de ligação para sequência C-terminal MEEVD da HSP90 (ODUNUGA *et al.*, 2003; CARRIGAN *et al.*, 2004). O domínio DP1 possui localização C-terminal ao domínio TPR1, enquanto o DP2 é C-terminal ao domínio TPR2B (NELSON *et al.*, 2003), no entanto, suas funções ainda são desconhecidas. Além da interação com as HSP70/HSP90, a STI1 também possui uma região de ligação a receptores de membrana como a proteína príon celular (PrP^C) que compreende os domínios TPR1, DP1 e TPR2A (Figura 6).

Figura 6 – Domínios de ligação da estrutura da STI1. A estrutura da STI1 é composta de três domínios tetratricopeptídeos (TPR1, TPR2A e TPR2B) de interação com a HSP70 e HSP90 e dois domínios ricos em resíduos de aspartato e prolina (DP1 e DP2). Os domínios TPR1, DP1 e TPR2A formam uma região de interação com receptores PrP^C.



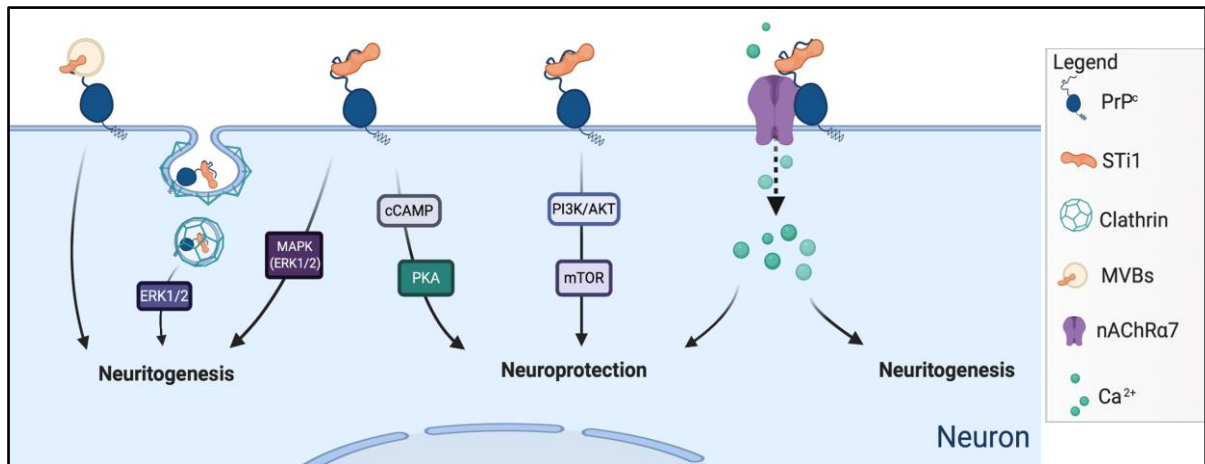
Fonte: Adaptado de LACKIE *et al.*, 2017.

Além das ações supracitadas, a STI1 desempenha funções extracelulares atuando como citocina (LACKIE *et al.* 2017). Sendo que no sistema nervoso, a STI1 pode ser secretada pelas células da glia, sinalizando para o aumento da proteção neuronal e diferenciação, bem como, secretada em células de tumores atuando em receptores PrP^C ou receptores ALK2 (WANG *et al.* 2010; BERALDO *et al.* 2010, 2013; 2017; TSAI *et al.* 2012) (Figura 7). Sob condições de isquemia cerebral a STI1 tem sua expressão aumentada, recrutando células-tronco derivadas da medula óssea de maneira dependente da ligação a PrP^C e assim facilitando a recuperação neurológica após acidente vascular encefálico (AVE) e prevenindo a morte neuronal, de forma também dependente da PrP^C em resposta a condições isquêmicas induzidas em cultura de células (LEE *et al.* 2013; BERALDO *et al.* 2013).

A interação da STI1 com a PrP^C desempenha um importante papel no sistema nervoso central. Em neurônios hipocâmpais em cultura, a STI1 foi demonstrada interagir com receptores PrP^C induzindo neuroproteção por meio da proteína quinase A (PKA) (ZANATA *et al.*, 2002; CHIARINI *et al.*, 2002). Outros estudos reportaram a interação STI1-PrP^C levando a neuritogênese por meio da via das MAPKs/ERK1/2, e além disso, também foi observado que a neuritogênese era dependente da internalização desse complexo por clatrina (LOPES *et al.*, 2005; CAETANO *et al.*, 2008). Tanto a neuroproteção, quanto neuritogênese foram mostradas ocorrerem pela interação do receptor PrP^C com receptores $\alpha 7$ nicotínicos ($\alpha 7$ nAChR), que uma vez ligados a STI desencadeiam um influxo de Ca²⁺, aumentando os níveis intracelulares de

Ca^{2+} (BERALDO *et al.*, 2010). Todos esses eventos ocorrem por meio do aumento da síntese proteica mediada pela ativação da via da PI3K/AKT/mTOR (ROFFE *et al.*, 2010) (Figura 7).

Figura 7 - A STI1 exerce papel de citocina por ação extracelular via interação a receptores PrP^C em neurônios. A STI1 interage com receptores PrP^C sinalizando para o aumento da diferenciação e proteção neuronal.



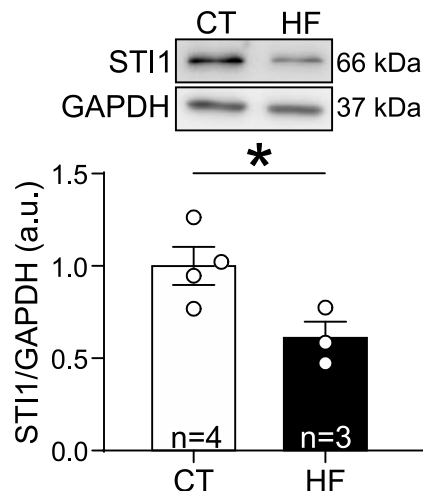
Fonte: Adaptado de DA FONSECA *et al.* 2021.

1.5.2. STI1 no coração

Embora seja bem esclarecido o papel da STI1 em neurônios, pouco ou quase nada se sabe com relação a sua função no coração. E neste tema, nosso grupo de pesquisa foi pioneiro em mostrar a redução na expressão da STI1 em amostras de pacientes com insuficiência cardíaca (IC) pós infarto do miocárdio (Figura 8). Além disso, também mostramos que camundongos com redução dos níveis de STI1 (STI1^{+/-}), que mimetizam o fenótipo encontrado em humanos com IC, são mais susceptíveis ao desenvolvimento da lesão cardíaca induzida pela hiperativação β-adrenérgica, indicando um possível papel protetor dessa proteína no coração (NOGUEIRA, 2020). Resumidamente, camundongos STI1^{+/-} apresentam uma resposta patológica exacerbada em resposta ao tratamento com isoproterenol quando comparado a camundongos controle. Além da indução da hipertrofia, esta resposta é caracterizada por um aumento da quantidade de matriz extracelular e infiltrado inflamatório, bem como, redução na porcentagem de cardiomiócitos, ativação de caspase e níveis aumentados de ANP (Figura 9).

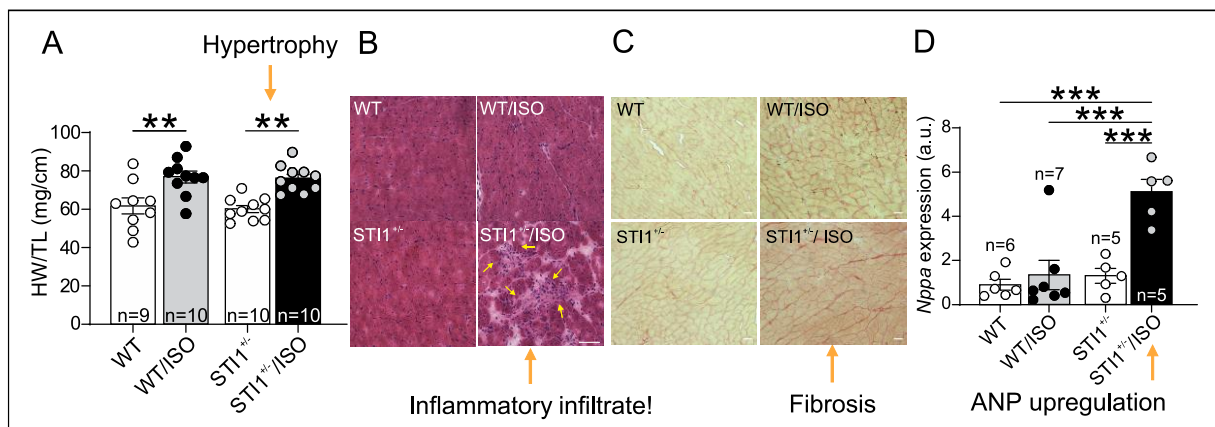
Uma análise do perfil proteômico cardíaco de camundongos $STI1^{+/-}$ tratados com isoproterenol demonstrou a ativação de vias de sinalização relacionadas a fibrose e necrose, regulação negativa de proteínas envolvidas em vias de síntese e degradação proteica e inibição da via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) (dados ainda não publicados - Dissertação de mestrado de Victor Moura Vidal Costa (2021)). Em conjunto os dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa com relação a $STI1$ no coração mostram que esta proteína exerce um papel essencial na resposta cardíaca ao estresse e pode vir a ser um importante alvo terapêutico no tratamento de doenças cardíacas.

Figura 8 - A expressão da $STI1$ está reduzida em amostras de coração de pacientes com insuficiência cardíaca pós infarto do miocárdio. CTRL= controle; HF= *heart failure*. CTRL: n=4; HF: n=4; p = 0,0228.



Fonte: NOGUEIRA, 2020.

Figura 9 - Camundongos $STI1^{+/-}$ apresentam uma resposta patológica exacerbada em resposta ao tratamento com isoproterenol. A) Camundongos $STI1^{+/-}$ sofrem hipertrofia, B) aumento de infiltrado inflamatório, C) aumento da quantidade de matriz extracelular e D) níveis aumentados de ANP.



Fonte: Adaptado de NOGUEIRA, 2020.

Pouco se sabe acerca das vias de sinalização ativadas pela STI1. Zanata *et al.* (2002) mostraram que um domínio da STI1 foi capaz de ativar as vias de sinalização da PKA e ERK, sendo associada a sobrevivência celular em explantes retiniais (CHIARINI *et al.*, 2002). Além disso, também foi demonstrado que a STI1 recombinante foi capaz de modular a proliferação e morte celular retinal, desencadear a neuroproteção e neuritogênese em neurônios hipocâmpais por meio das vias da PKA e MAPK, e induzir endocitose dependente da sinalização das MAPK (ARRUDA-CARVALHO *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2005; AMERICO *et al.*, 2007). Em adição, a STI1 também foi reportada promover a proliferação celular de uma linhagem de células derivadas de glioblastoma humano (A172) por meio das vias de sinalização das MAPK e PI3K (ERLICH *et al.*, 2007). Já é bem conhecido que a via das MAPK em cardiomiócitos contribui para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Além disso, essa via tem um papel importante no crescimento hipertrófico observado durante o desenvolvimento (BOGOYEVITCH *et al.*, 1993; BUENO *et al.*, 2000; CLERK *et al.*, 1994; HINES; THORBURN, 1998; HUNTER *et al.*, 1995; SUGDEN; CLERK, 2000; THORBURN *et al.*, 1993). Tendo em vista o papel já descrito da STI1 na regulação da via das MAPK e do papel dessa via na hipertrofia cardíaca, tanto durante o desenvolvimento, quanto em resposta a estímulos patológicos, é de grande importância a investigação do papel da STI1 no coração.

Uma vez que a hipertrofia cardíaca é um processo que requer maior taxa de síntese proteica e requer um fino controle de qualidade de proteínas para combater o desenvolvimento da IC, e que já temos indícios de que a STI1 tem papel crucial na resposta hipertrófica e remodelamento cardíaco, se faz necessário elucidar se essa co-chaperona também é capaz de proteger o coração do dano cardíaco. Assim, abordagens moleculares como a superexpressão gênica da STI1 poderá contribuir para a nossa compreensão sobre a atuação dessa proteína na proteção contra a hipertrofia, remodelamento e insuficiência cardíaca.

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente nosso grupo de pesquisa observou que a expressão da STI1 (*Stress inducible protein 1*) encontra-se reduzida em amostras de coração de pacientes com insuficiência cardíaca (NOGUEIRA, 2020). Em camundongos com redução na expressão da STI1 foi observada uma maior susceptibilidade ao estresse cardíaco induzido por isoproterenol (NOGUEIRA, 2020). Do ponto de vista mecanístico observamos por meio do perfil proteômico pós estresse induzido por isoproterenol que corações de animais com redução da STI1 apresentam prejuízo na síntese proteica e na resposta de controle da produção de ROS. Com base nestas observações e no fato de que a STI1 é capaz de modular a atividade das chaperonas HSP70/HSP90, responsáveis pelo enovelamento, maturação e degradação de diversas proteínas, nos propomos caracterizar os efeitos da superexpressão da STI1 para a função cardíaca, a nível basal e após indução de estresse cardíaco. A relevância deste trabalho baseia-se em 3 fatores principais: 1) a STI1 está reduzida na insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio em humanos, mostrando-se como um importante alvo no estudo da insuficiência cardíaca, 2) no fato que a STI1 ainda não possui função bem definida no coração e 3) existe uma relação entre a STI1 e vias de sinalização que conduzem a hipertrofia cardíaca. Assim, por meio de uma combinação de estratégias moleculares, bioquímicas e experimentos fisiológicos em um modelo de camundongo transgênico que superexpressa a STI1, avaliamos se essa co-chaperona é capaz de manter a homeostasia celular, mas também, de proteger o coração após estresse patológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Investigar as consequências da superexpressão da STI1 para a função cardíaca de camundongos no estado basal e após estresse cardíaco causado por isoproterenol.

3.2. Objetivos específicos:

- A) Realizar a caracterização cardíaca do modelo geneticamente modificado de superexpressão da STI1 (STI1-TgA).
 - I. Caracterizar a expressão e localização da STI1 no coração;
 - II. Investigar alterações na expressão da maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90;
 - III. Caracterizar a morfologia do coração e de cardiomiócitos por morfometria;
 - IV. Avaliar a função contrátil de cardiomiócitos;
 - V. Verificar a dinâmica do cálcio em cardiomiócitos isolados;
 - VI. Realizar análise do perfil proteômico do coração de camundongos STI1-TgA.

- B) Avaliar a resposta de camundongos STI1-TgA ao dano cardíaco causado pela hiperativação adrenérgica decorrente do tratamento com isoproterenol.
 - I. Caracterizar a expressão e localização da STI1 no coração em resposta ao Isoproterenol;
 - II. Investigar alterações na expressão da maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90;
 - III. Caracterizar alterações morfológicas no coração e em cardiomiócitos por morfometria;
 - IV. Investigar o remodelamento cardíaco induzido por isoproterenol;
 - V. Avaliar a função cardíaca por ecocardiografia;
 - VI. Avaliar a função contrátil de cardiomiócitos;
 - VII. Analisar a dinâmica do cálcio em cardiomiócitos isolados;
 - VIII. Verificar a resposta antioxidante em resposta ao isoproterenol;

IX. Investigar alterações no controle de qualidade de proteínas via degradação proteica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de superexpressão da STI1

Camundongos transgênicos geneticamente modificados que superexpressam a STI1 globalmente (STI1-TgA) (provenientes de colaboração com o professor Marco Prado – Universidade Western Canadá) e camundongos *wild-type* (WT) C57BL/6 (provenientes do Biotério Central da UFMG) foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas-2 (BICBIO-2), num ciclo luminoso de 12h - 12 horas de claridade, 12h de escuro - recebendo água e comida *ad libitum*. Os camundongos STI1-TgA foram mantidos em cruzamento com camundongos WT para manutenção da linhagem. Desta forma foi possível obter camundongos STI1-TgA e WT na própria ninhada que foram utilizados como controle nos experimentos. Camundongos machos foram utilizados para experimentos quando atingiram a idade de 10-12 semanas. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o número de protocolo 97/2022.

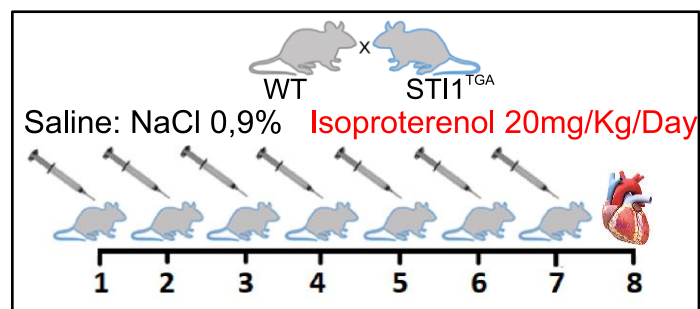
4.2. Linhagem STI1-TgA e genotipagem

Os camundongos transgênicos STI1-TgA foram gerados a partir de cromossomo artificial bacteriano (BAC) contendo 10 cópias extra do alelo da STI1 como descrito por Beraldo et al. (2013). Para identificar os animais STI1-TgA nós realizamos genotipagem dos animais por PCR convencional. A utilização de primers específicos para detecção do BAC contendo a STI1 (*Foward*: GCATCAGCCAGCGCAGAAATATTTCC; *Reverse*: GATACTTCGTTATCGACACCAGCTGC), detecta uma banda de 500 pb em gel de eletroforese, enquanto que para a detecção de animais WT foram utilizados primers específicos (*Foward*: GAGAGTACTTTGCCTGGGAGGA; *Reverse*: GGCCACAGTAAGACCTCCCTTG) que detectam uma banda de 171 pb em gel de eletroforese. Para a reação da PCR foi utilizado o mastermix GoTaq (Promega), seguindo protocolo padrão recomendado pelo fabricante.

4.3. Modelo de indução de estresse cardíaco por ISO

Para analisar a resposta cardíaca de animais STI1-TgA frente a um estímulo estressor, animais WT e STI1-TgA foram tratados com ISO (ISO, #I5627, Sigma-Aldrich) na dose de 20 mg/kg diluído em solução salina (0,9% NaCl), diariamente por um período de 7 dias. Para cada 20g de peso do animal, 200 μ L de solução salina (controle) ou da solução de isoproterenol foram administrados via injeção intraperitoneal nos animais WT e STI1-TgA. No oitavo dia após o último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados e os corações foram coletados e direcionados para os experimentos desejados (Figura 10).

Figura 10 - Desenho esquemático do tratamento de camundongos WT e STI1-TgA com salina ou isoproterenol por 7 dias na dose de 20 mg/kg/dia. No oitavo dia após o último dia do tratamento, os corações foram coletados e direcionados para os experimentos desejados.



4.4. Análise da morfometria e hipertrofia cardíaca

No intuito de avaliar o tamanho do coração e hipertrofia cardíaca dos animais WT e STI1-TgA, a nível basal e sob estresse cardíaco, realizamos a medida do peso corporal do animal (BW), do peso seco do coração (HW) logo após coleta e dissecação e a medida da tibia direita (TL). Por fim, foram analisadas as razões do HW/BW e HW/TL.

Para analisar a hipertrofia de cardiomiócitos ventriculares foi realizada a morfometria celular por meio da medida da área de cardiomiócitos em secção transversal em cortes histológicos de corações, marcados com a lectina fluorescente WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) (WGA: 1:200) que foi incubada por 15 min. O WGA se liga a N-acetil-D-Glicosamina e ácido siálico, presentes em membranas celulares, assim, marcando a superfície membranar e consequentemente a silhueta

das células. Além da superfície celular, os cortes também foram incubados com a sonda fluorescente DAPI (4,6-diamidino-2-phenillindole) (1:500) por 5 min, para marcação nuclear, e por fim, os cortes foram submetidos à microscopia confocal, no microscópio confocal Zeiss LSM 880, situado no CAPI/ICB/UFMG e imagens dos tecidos dos grupos WT e STI1-TgA tratados ou não com ISO foram capturadas.

4.5. Preparo do tecido cardíaco para histologia

Para análise de alterações morfológicas em corações de camundongos WT e STI1-TgA, a nível basal e sob estresse cardíaco, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilasina (80mg/Kg; 20mg/Kg), eutanasiados e em seguida foi aplicada injeção de KCl 10% diretamente no coração para que o coração parasse em diástole. Em seguida, o coração foi coletado, dissecado, fixado em PFA 4% por 24h, em seguida foi colocado em solução de sacarose 30% *overnight* para crioproteção e por fim, embebido em OCT (*optimal cutting temperature*) (Tissue Tek, #4583, Sakura) e congelado em freezer -80°C para posterior corte em criostato (fatias de 10 µm de espessura) e lâminas do tecido foram preparadas para os experimentos desejados.

4.6. Imunofluorescência

Análises de imunofluorescência foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: inicialmente, as lâminas histológicas foram fixadas em PFA 4% por 15 min a temperatura ambiente, seguida de bloqueio com uma solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) contendo BSA 3% (*Bovine Serum Albumin*) e Triton-X 0,3% por 30 minutos. Após bloqueio, os tecidos foram incubados em câmara úmida com anticorpos primários específicos (STI1: 1:100; NFAT: 1:100 (sc-8405); Colágeno III: 1:100 (ab7778); NRF2: 1:100 (ab31163) a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3x com PBS/BSA 1%, incubadas com o anticorpo secundário correspondente (1:300) por 1h a temperatura ambiente, protegidos da luz e lavadas novamente com PBS/BSA 1%. As lâminas foram então incubadas com a sonda fluorescente

para marcação nuclear. Após incubação com DAPI (1:500), as lâminas foram lavadas com PBS e montadas com glicerol 60% para aquisição de imagens em microscópio confocal. Para marcação da membrana celular foi utilizada a lectina fluorescente WGA (1:200).

4.7. Proteômica do tecido cardíaco

4.7.1. Processamento das amostras para espectrometria de massas

Os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, SDS 3%, NaCl 150 mM suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Roche, Indianapolis, IN, EUA), seguido de dois ciclos de 30s on-and-off a 4°C. As amostras foram então sonicadas por três ciclos (rajadas de 20s com pausas de 20s) e centrifugadas a 16.000 x g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de proteína foi medida usando um ensaio de proteína BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Alíquotas de lisados de SDS contendo 300µg de proteína total de cada amostra foram processadas de acordo com o método de preparação de amostra auxiliada por filtro (FASP), usando unidades de filtro centrífugo Microcon 10kDa (Merck, Burlington, MA, EUA) operadas a 10.000 x g por 50 min a 20°C (Wiśniewski et al. 2009; Wiśniewski et al. 2011; Wiśniewski 2016). Em seguida, Trypsin/LysC Mix (Promega, Madison, WI, USA) foi adicionado aos filtros em uma razão enzima-proteína de 1:50 (p/p) e incubado por 16h a 37°C. Após a digestão das proteínas, os peptídeos foram filtrados através da membrana e purificados por cromatografia de fase reversa usando pontas de micropipeta C18 (TopTip™, PolyLC Inc, Columbia, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos foram secos em um concentrador a vácuo e armazenados a -20°C.

4.7.2. Aquisição de dados de espectrometria de massa

Peptídeos secos foram ressuspensos em 20 μ L de ácido fórmico a 0,1% em água e analisados em Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado ao espectrômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A separação de peptídeos foi realizada com um gradiente linear de solvente A (0,1% de ácido fórmico) e solvente B (80% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) e 5 μ L de mistura de peptídeos foram carregados em uma coluna de armadilha (Acclaim PepMap 100, C18, 3 μ m, 75 μ m \times 2 cm, nanoViper, Thermo Scientific) a 500 bar. Após esse período, os peptídeos presos foram eluídos em uma coluna C18 (Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 μ m, 75 μ m \times 15 cm, nanoViper, Thermo Scientific) a uma taxa de fluxo de 300 nL/min. Os peptídeos foram eluídos da coluna usando um gradiente linear de 5-28% B por 80 min, seguido por um gradiente linear de 28-40% B por 10 min. Finalmente, a porcentagem de solvente B foi aumentada para 95% em 2 min e a coluna foi lavada por 12 min com esta proporção de solvente. O reequilíbrio do sistema com 100% A foi realizado antes de cada injeção. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos usando uma fonte de íons nanospray Flex NG (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e operando no modo ESI positivo com temperatura capilar a 300°C e nível de RF S-Lens a 30%. Uma varredura MS completa foi seguida por varreduras MS2 dependentes de dados em um tempo de ciclo de 3s. As varreduras MS e MS2 foram realizadas no analisador Orbitrap. Os íons precursores selecionados para MS2 foram excluídos para varreduras MS2 subsequentes por 40s. Os íons precursores foram fragmentados por HCD com uma energia de colisão normalizada de 30%. A resolução para o modo de varredura completa foi definida como 120.000 (em m/z 200) e o alvo de controle automático de ganho (AGC) em 5×10^5 . A faixa de m/z 350–1550 foi monitorada. Para medições de massa precisas, a opção de massa de bloqueio foi habilitada na varredura MS e os íons polidimetilciclossiloxano (m/z = 445,12003) foram usados para calibração interna em tempo real. Cada varredura completa foi seguida por uma aquisição MS2 dependente de dados com resolução de 30.000 (em m/z 200), tempo máximo de preenchimento de 54 ms e janela de isolamento de 1,2 m/z.

4.7.3. Identificação de proteínas, quantificação relativa e análise estatística

Os arquivos (.raw) foram carregados no software Peaks Studio 8.5 (Bioinformatics Solution Inc., Canadá) e o fluxo de trabalho padrão do PEAKS (sequenciamento de peptídeos de novo, PeaksDB, PeaksPTM e ferramentas SPIDER) foi aplicado à análise de pesquisa de banco de dados e identificação de proteínas (Ma & Johnson, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2005). Os espectros de MS/MS foram pesquisados no banco de dados de proteoma de referência *Mus musculus* (Mouse) disponível no UniprotKB (Proteome ID UP000000589, com 21.986 entradas de proteína. Os seguintes parâmetros foram usados: precursor tolerância de massa de 10 ppm; tolerância de massa de fragmento em 0,02 Da; tripsina foi definida como a enzima específica e foram necessárias até duas clivagens perdidas; carbamidometilação em Cys (+57,02 Da) como modificação fixa, oxidação em Met (+15,99 Da) e acetilação no terminal N da proteína (+42,01 Da) definido como modificações variáveis com no máximo 3 modificações por peptídeo nos resultados SPIDER. Um limite de taxa de descoberta falsa (FDR) de 1% na correspondência de espectro de peptídeo (PSM) e pelo menos um único peptídicos foram aplicados para identificações de proteínas. Módulo PEAKS Q foi aplicado (método de quantificação sem rótulo)) para o resultado da pesquisa de banco de dados, e os fatores de normalização baseados em Total-Ion Count (TIC) foram obtidos. O fator de normalização obtido para cada amostra foi aplicado para calcular as áreas normalizadas das proteínas. As áreas de proteína normalizadas foram valores transformados em log₂ e foram usadas para calcular o teste *t* de *Student*, no qual o valor $p < 0,05$ e a mudança de dobra $\geq 1,2$ [$\log_2(\text{FC}) \leq -0,26$ ou $\geq 0,26$] foram selecionados como um corte fora de significância para a abundância relativa diferencial de proteínas.

4.8. Ecocardiografia

Com o intuito de avaliar a função cardíaca dos camundongos, experimentos de ecocardiografia foram realizados em animais WT e STII-TgA tratados com salina ou ISO por 7 dias, com idade entre 10-12 semanas. Os animais foram sedados com isoflurano 1.5% em oxigênio, colocados em suporte térmico para monitoramento da temperatura corporal, que foi

mantida entre 36-37°C e as imagens de ecocardiografia foram capturadas com batimentos entre 400-500 bpm. As imagens e medidas de ecocardiografia foram realizadas no equipamento Vevo 2100 (Visual Sonics) em facility no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagens (CENABIO, UFRJ).

As imagens foram capturadas em cortes de eixo curto (sax – short axis) e eixo longo (pslax - parasesternal long axis), em modo M (unidimensional) e modo B (Bidimensional). As análises foram realizadas no software VevoLab, versão 3.1, onde as medidas do modo M e B foram usadas para medir os seguintes parâmetros:

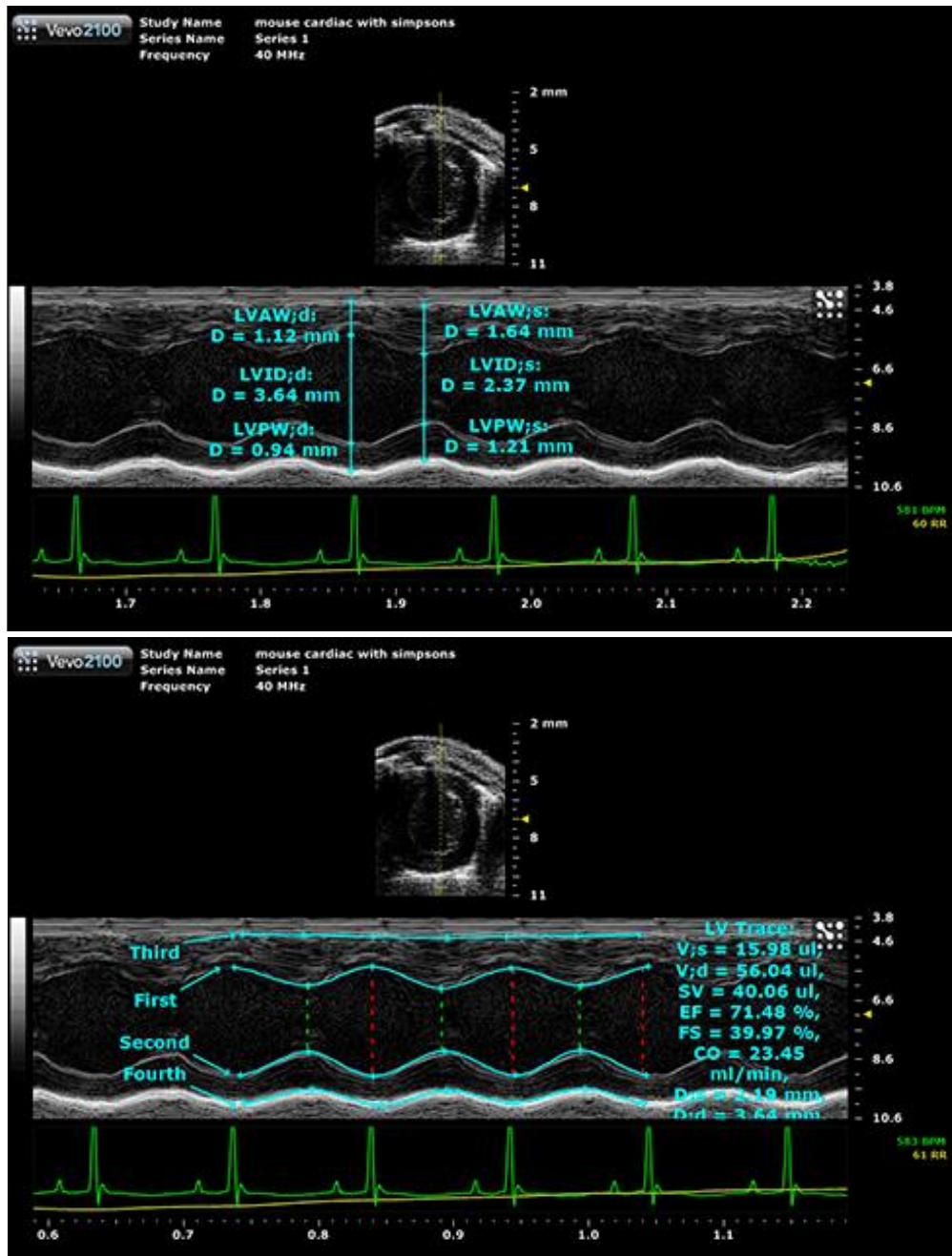
SAX M-Mode (Figura 11):

- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole (LVID;d- mm)
- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (LVID;s- mm)
- Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVPW;d- mm)
- Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (LVPW;s- mm)
- Parede anterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVAW;d- mm)
- Parede anterior do ventrículo esquerdo na sístole (LVAW;s- mm)
- Fração de ejeção (EF %)
- Fração de encurtamento (FS %)

PSLAX B-Mode – método de Simpson (Figura 11):

- Débito cardíaco (CO- ml/min)
- Volume de ejeção (SV- μ l)
- Fração de ejeção (EF- %)
- Fração de encurtamento (FS-%)

Figura 11 - Imagens representativas da aquisição dos parâmetros ecocardiográficos nos modos unidimensional e bidimensional. (SAX M-Mode e PSLAX B-Mode – método de Simpson, respectivamente).



4.9. Isolamento de cardiomiócitos ventriculares

Para isolamento de cardiomiócitos ventriculares adultos de camundongos, WT e ST11-TgA, foi utilizado o protocolo padrão de dissociação enzimática do tecido cardíaco como descrito em Rocha-Resende (2012). Sucintamente, os corações dos camundongos foram rapidamente

removidos e retro-perfundidos via método de Langendorff com solução DB (*Digestion Buffer*) livre de Ca^{2+} (em mmol/L: NaCl, 130; KCl, 5,4; HEPES, 25; MgCl_2 , 0,5; NaH_2PO_4 , 0,33; Glicose, 22 e insulina 100U/mL; pH = 7,4 ajustado com NaOH) contendo EGTA (0,15 mmol/L). Em seguida, o coração foi perfundido com DB contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1,1 mg/mL). Após digestão enzimática, o coração foi submetido à dissociação mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi gradualmente aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de solução tampão (Tyrode), chegando a 500 $\mu\text{mol/L}$ ao final do processo. Por fim as células foram centrifugadas e ressuspensas em 6 ml de solução Tyrode (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM glucose, and 5 mM HEPES; pH 7,4 ajustado com NaOH) e por fim, as células foram direcionadas para experimentos de morfometria celular, imunofluorescência, transiente de Ca^{2+} e contratilidade.

4.10. Transiente de Ca^{2+}

Para os experimentos de medidas do transiente de Ca^{2+} foi utilizado protocolo padrão do nosso laboratório publicado por Rocha-Resende (2012). Brevemente, os cardiomiócitos isolados foram marcados com a sonda fluorescente Fluo-4/AM (5 $\mu\text{mol/L}$, Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos à temperatura ambiente, cujo comprimento de onda de excitação é 488 nm e o de emissão, 515 nm. Após a marcação, os cardiomiócitos foram lavados em solução Tyrode para remover o excesso da sonda e ressuspensos em Tyrode. A aquisição de imagens e medida da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no cardiomiócito foi realizada utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 880 (CAPI, ICB, UFMG), na configuração line-scan, com o intuito de obter informações sobre a amplitude e a cinética do transiente de Ca^{2+} . Os cardiomiócitos foram estimulados a 1,0 Hz, com um pulso quadrado de duração de 5ms e 50V. Seis pulsos elétricos foram aplicados antes da aquisição da imagem.

4.11. Avaliação de contratilidade celular

Com o objetivo de avaliar a contratilidade de cardiomiócitos, os cardiomiócitos isolados foram colocados em uma plataforma de um microscópio invertido e as contrações foram estimuladas a 1Hz, com pulsos de duração de 5ms e uma intensidade de 50V. As imagens das células foram transmitidas por uma câmera acoplada ao microscópio, sendo usadas para medir parâmetros de contratilidade celular usando conversor A/D (Ionoptix) (Roman-Campos et al., 2009). As medidas de contratilidade foram avaliadas de acordo com as linhas de base fixadas nas extremidades dos CMs antes do início do estímulo de contração. A fração de encurtamento foi medida a partir da diferença entre o relaxamento máximo e a contração máxima a cada contração.

4.12. Western Blotting

Para análise da expressão proteica em corações de camundongos WT e ST11-TgA, os corações foram coletados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para uso posterior. Os corações foram homogeneizados em tampão de lise contendo detergentes (100mM NaCl; 50mM Tris-base; 5mM EDTA-2Na; 50mM Na₄P₂O₇·10H₂O; 1mM MgCl₂. pH=8,0; Nonidet P40 1%; Triton X-100 0.3% e Sodium deoxycholate 0,5%) e inibidores de protease (PMSF 1mM, benzamidina 15,7mg/mL e pepstatina 10µM) e fosfatase (20mM NaF e 1mM Na₃VO₄) por 30 min, em ciclos de homogeneização e repouso a cada 5min. Ao final das homogeneizações foi feita centrifugação a 8000 rpm por 12 min a 4°C e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e congeladas a -80°C até o uso posterior.

As proteínas (7-30 µg) foram diluídas em tampão de amostra e carregadas em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida), gel de separação em concentrações de 8-12%, dependendo da massa molecular das proteínas alvo, e gel de concentração a 4%. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF por meio de transferência semi-seca (Semi-dry Bio-Rad), a uma voltagem de 20V e com tempo de transferência que variou de 23-32 min, dependendo do peso molecular da proteína alvo. Após transferência, a membrana

foi bloqueada por 1h com solução TBS-T (*Tris-base Solution* contendo *Tween* 0,05%) contendo leite 5%. Ao final do bloqueio a membrana foi lavada em TBS-T e incubada com anticorpos primários específicos para as proteínas alvo, em solução TBS-T com leite 1%, *overnight* a 4°C. Após incubação, as membranas foram lavadas 3x com TBS-T, incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) específico para cada primário, por 1h a temperatura ambiente e depois lavadas 3x com TBS-T.

As bandas proteicas foram detectadas por reação de quimioluminescência, sendo utilizado o substrato ECL (Enhanced chemiluminescence, Biorad) e reveladas em sistema de imagem digital (ImageQuant™ LAS 4000). A análise da intensidade das bandas se deu por análise densitométrica. Os níveis de proteínas foram normalizados pelos níveis de expressão do GAPDH ou HSP90, seguida por normalização pelo grupo controle do experimento. Os anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de western blotting.

Anticorpo	Código de referência	Fabricante	Diluição
Primários			
anti-AKT (Rabbit)	9272	Cell Signaling	1 : 1000
anti-phospho-AKT Ser473 (Rabbit)	9271	Cell Signaling	1 : 1000
anti-GAPDH (Mouse)	sc32233	Santa Cruz Biotechnology	1 : 3000
anti-HSP90 α/β (HRP)	sc-13119	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-LC3B (Mouse)	L8918	Sigma-Aldrich	1 : 5000
anti-Serca2A (Mouse)	sc376235	Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000
anti-STI1 (Rabbit)		Homemade	1 : 5000
Secundários			
anti-Mouse	A2554	Sigma-Aldrich	1 : 15000
anti-Rabbit	A0545	Sigma-Aldrich	1 : 15000

4.13. Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica do mRNA que codifica para STI1 (*Stip1*), β -MHC (*Myh7*), ANP (*Nppa*), Col III (*Col3a*) e LC3B (*Lc3b*), o RNA total do tecido cardíaco foi extraído pelo reagente Trizol® (#T9424, Sigma-Aldrich) por meio do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). O RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenado a -80°C até o uso posterior. Em seguida foi realizada a transcrição reversa para cDNA utilizando-se protocolo recomendado pelo fabricante do kit de transcrição reversa. O cDNA foi utilizado como molde para as análises de PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 2). Para cada experimento, a reação sem cDNA foi usada como controle negativo. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e os dados foram normalizados pela expressão gênica do S26 (*Rps26*). Para síntese de cDNA e experimentos de PCR em tempo real foram utilizados kits de reagentes da Biorad. A sequência dos primers utilizados neste estudo estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista com a sequência de primers utilizados para os experimentos de PCR em tempo real.

Alvo	Primers	Sequência (5' - 3')
ANP (<i>Nppa</i>)	<i>Foward</i>	AGCCGTTTCGAGAACTTGTCTT
	<i>Reverse</i>	CAGGTTATTGCCACTTAGGTTCA
Col III (<i>Col3a</i>)	<i>Foward</i>	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA
	<i>Reverse</i>	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC
LC3 (<i>Lc3b</i>)	<i>Foward</i>	GGGACCCTAACCCCATAGGA
	<i>Reverse</i>	TCTCCCCCTTGTATCGCTCT
STI1 (<i>Stip1</i>)	<i>Foward</i>	GCCAAGAAAGGAGACTACCAG
	<i>Reverse</i>	TCATAGGTTCGTTTGGCTTCC
S26 (<i>Rps26</i>)	<i>Foward</i>	CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT
	<i>Reverse</i>	CGATTCCTGACAACCTTGCTATG
β -MHC (<i>Myh7</i>)	<i>Foward</i>	CCTGCGGAAGTCTGAGAAGG
	<i>Reverse</i>	CTCGGGACACGA TCTTGGC

4.14. Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e foram consideradas significativas as diferenças estatísticas com valor de $p < 0,05$. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste Shapiro-Wilk. O teste *t* de *Student* foi realizado para comparação entre dois grupos, usando teste não pareado (variáveis paramétricas) e o teste de Mann-Whitney (variáveis não-paramétricas). Para comparação de mais de dois grupos foi utilizado o teste Ordinary one-way ANOVA, quando os dados se apresentaram com distribuição normal, e o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para dados que não passaram no teste de normalidade. Para isto, foi utilizado o programa GraphPrism 8.

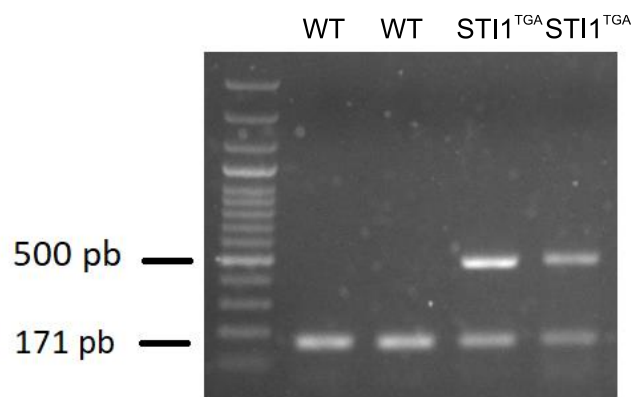
5. RESULTADOS

5.1. Caracterização cardíaca do modelo STI1-TgA no estado basal

5.1.1. A superexpressão da STI1 não altera a expressão da maquinaria das chaperonas e o desenvolvimento hipertrófico fisiológico no coração

Para validar o modelo de superexpressão global da STI1, os camundongos foram genotipados por PCR qualitativa a partir de amostras de DNA genômico, proveniente da cauda dos animais. Primers específicos que amplificam o alelo STI1-BAC foram utilizados. Como observado na Figura 12, o DNA que amplifica a banda com peso molecular de 500 pb (STI1-BAC) identifica os animais transgênicos para a STI1 (STI1-TgA), confirmando que esses camundongos superexpressam a STI1. As amostras que amplificam apenas a banda de 171 pb identifica o controle interno dos animais WT.

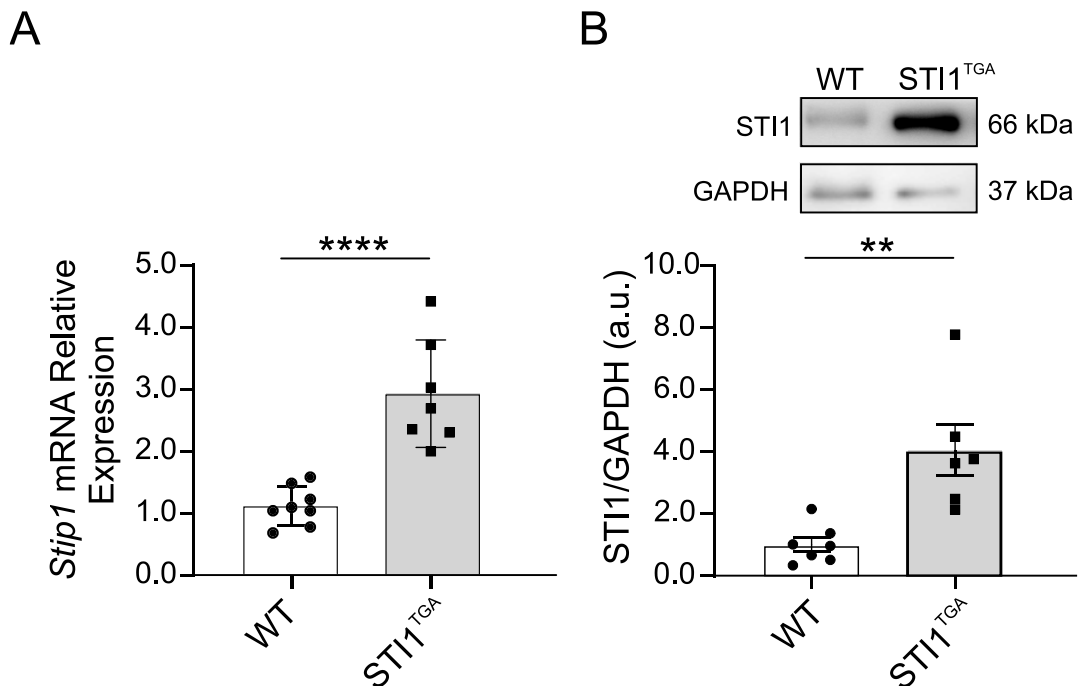
Figura 12 - Validação do modelo de superexpressão da STI1. Genotipagem de animais STI1-TgA e WT por detecção de DNA em gel de eletroforese. Banda de 500 pb = alelo STI1-BA; Banda 171 pb = alelo do controle interno.



A fim de confirmar a superexpressão da STI1 no coração, experimentos de PCR em tempo real e western blotting foram realizados, a partir de RNA e proteínas, respectivamente, extraídos de corações de camundongos WT e STI1-TgA. Como observado na Figura 13A, no coração os níveis de RNAm do gene que codifica para a STI1 (*Stip1*) apresentam um aumento

de três vezes em camundongos STI1-TgA quando comparados ao grupo WT. Quando avaliado os níveis de expressão proteica da STI1 no coração foi possível observar um aumento de quatro vezes na expressão da STI1 (Fig. 13B).

Figura 13 - Camundongos STI1-TgA apresentam aumento da expressão da STI1 no coração relativo a camundongos WT. **A)** Níveis de mRNA do gene *STIP1* são 3x mais expressos no coração de camundongos STI1-TgA quando comparados a animais WT (WT: n=8, STI1-Tg: n=7; ****= P<0,0001). **B)** A expressão proteica da STI1 é 4x mais expressa no coração de camundongos STI1-TgA comparados a animais WT (WT: n=7, STI1-TgA: n=6; **= P<0,0029). Os dados são mostrados como média ± SEM. O test-*t* foi usado para comparar grupos.



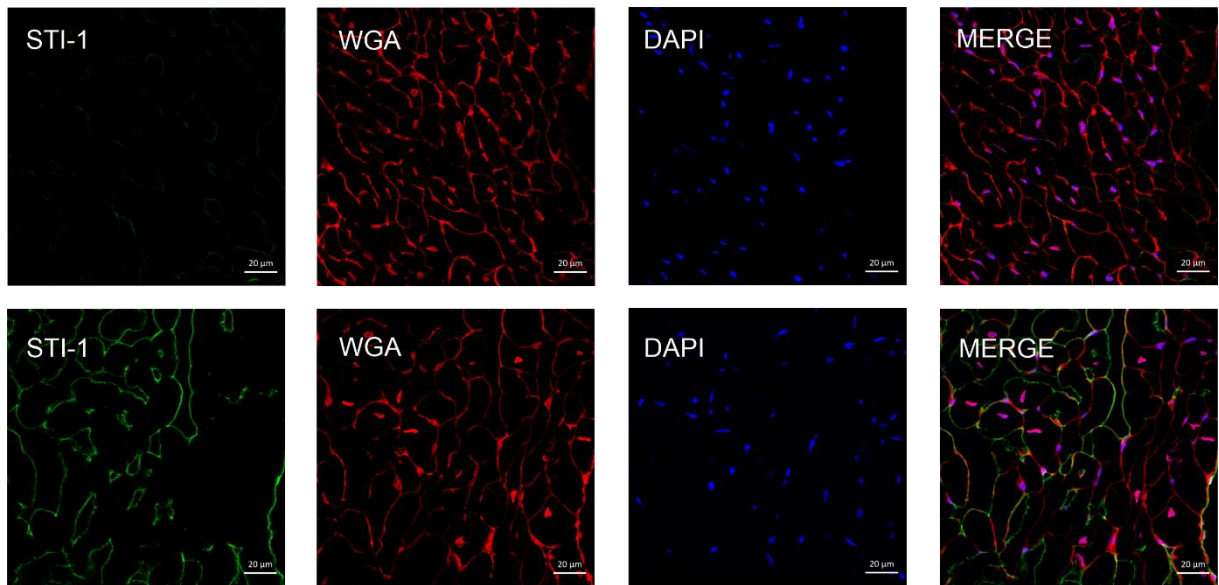
Para avaliar a localização da STI1 no tecido cardíaco, assim como, no miócito ventricular isolado, experimentos de imunofluorescência foram realizados. No tecido cardíaco de camundongos WT e STI1-TgA foi possível observar que a STI1 (marcada em verde) apresenta localização predominantemente perimembranar aonde se colocaliza com a proteína WGA (marcada em vermelho) em algumas regiões. Também foi possível observar marcação da STI1 no citoplasma, mas em níveis mais baixos (Figura 14A). Em cardiomiócitos isolados, a localização da STI1 se apresenta de forma semelhante, com maior presença perimembranar na célula (Figura 14B).

Visto que a STI1 é uma co-chaperona, capaz de modular a maquinaria da chaperonas HSP70/HSP90 e consequentemente modular o controle de qualidade de proteínas, avaliamos se a superexpressão da STI1 seria capaz de alterar a expressão proteica dessa maquinaria. Como

observado na Figura 5, a expressão da HSP70, bem como da HSP90 não sofreu alteração no coração de animais STI1-TgA (Figura 15A e B).

Figura 14 - STI1 apresenta localização no sarcolema e citoplasma no tecido cardíaco de camundongos. A) Imagens representativas de imunofluorescência mostrando a localização da STI1 no tecido cardíaco em cortes transversais, com maior distribuição da STI1 no sarcolema de cardiomiócitos (em verde, marcação da STI1; em vermelho, marcação do WGA na membrana e em azul, marcação nuclear com DAPI). **B)** Imunofluorescência de cardiomiócitos ventriculares isolados mostrando a localização celular da STI1 de forma semelhante no sarcolema (em verde, faloidina; em vermelho, STI1 e em azul, DAPI). Aumento da expressão da STI1 é observado no coração de camundongos STI1-TgA quando comparados ao grupo WT.

A



B

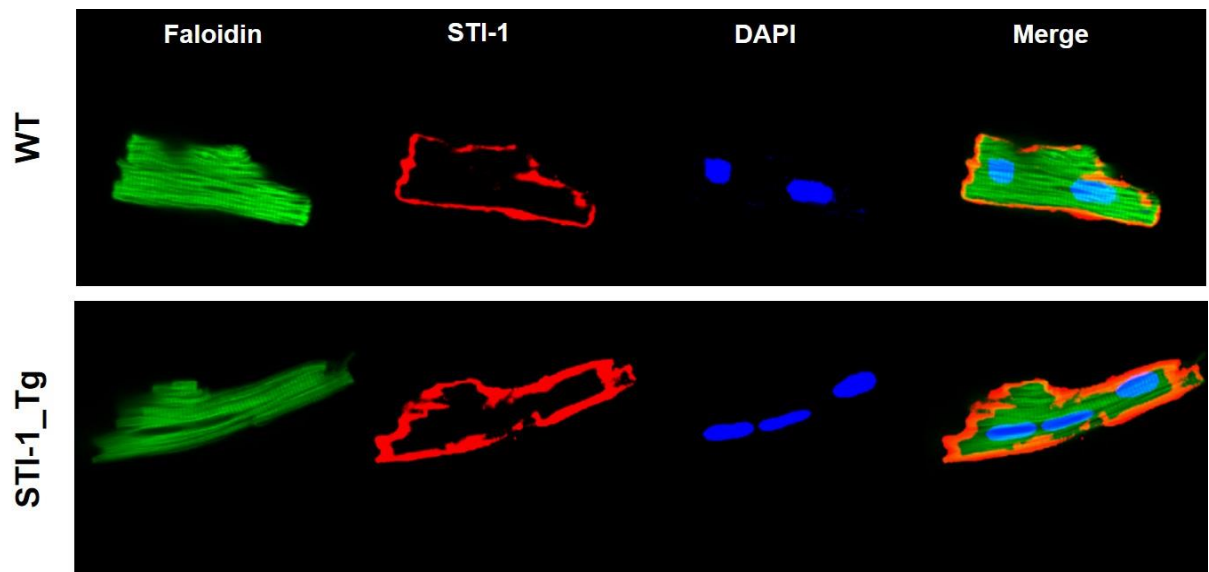
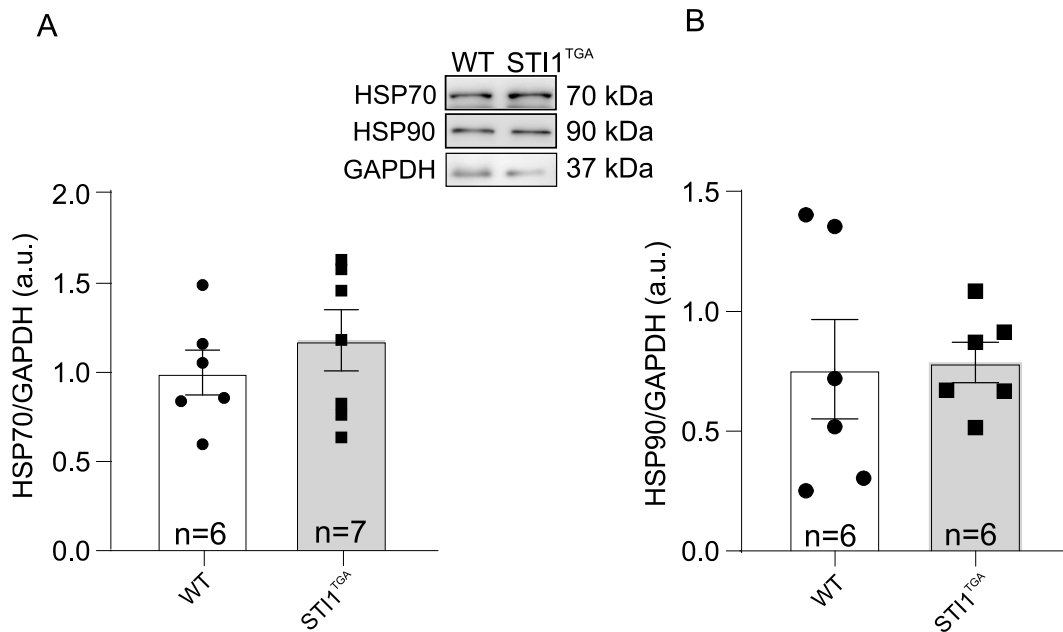


Figura 15 - A expressão da maquinaria HSP70/HSP90 não está alterada em corações de animais STI1-TgA. A) A superexpressão da STI1 não conduz a alterações na expressão proteica da chaperona HS70 em animais STI1-TgA. B) A superexpressão da STI1 não altera a expressão proteica da chaperona HSP90 em animais STI1-TgA. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O test-*t* foi usado para comparar os grupos.



Investigamos alterações macroestruturais no coração de animais STI1-TgA avaliando o peso do coração desses animais na fase adulta. Para isso, coletamos as medidas de peso corporal, peso do coração e comprimento da tíbia. Como resultado obtivemos que camundongos STI1-TgA não apresentam diferença na razão HW/BW, bem como, também não apresentam diferença na razão HW/TL (Figura 16A e B), indicando que, aparentemente, os animais STI1-TgA possuem desenvolvimento cardíaco normal, similar ao grupo WT.

No intuito de avaliar a morfologia celular de cardiomiócitos ventriculares, nós analisamos por morfometria a medida de área celular de cardiomiócitos em cortes histológicos, em secção transversal, que foram submetidos a imunofluorescência com marcação para WGA. Como podemos observar na Figura 17, camundongos STI1-TgA não apresentam alterações na área da fibra cardíaca quando comparados à animais WT (Figura 17A e B), corroborando o dado do tamanho do coração e confirmando o desenvolvimento fisiológico normal em animais STI1-TgA.

Figura 16 - Camundongos STI1-TgA não apresentam alterações no peso do coração na fase adulta. A) Razão do peso do coração pelo peso corporal (HW/BW) não está alterada em animais STI1-TgA quando comparado a camundongos WT. B) Razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia não é alterada em animais STI1-TgA. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O test-*t* foi usado para comparar grupos (n= número de animais).

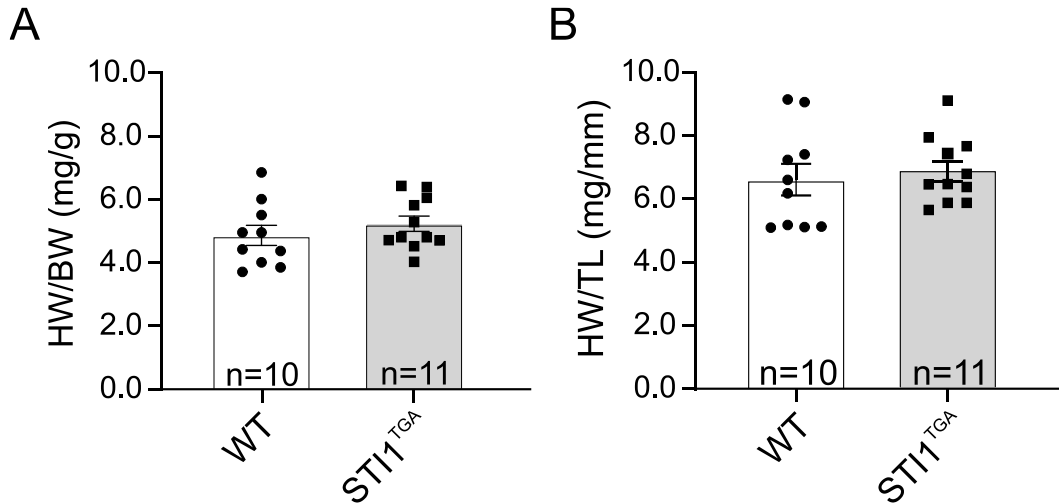
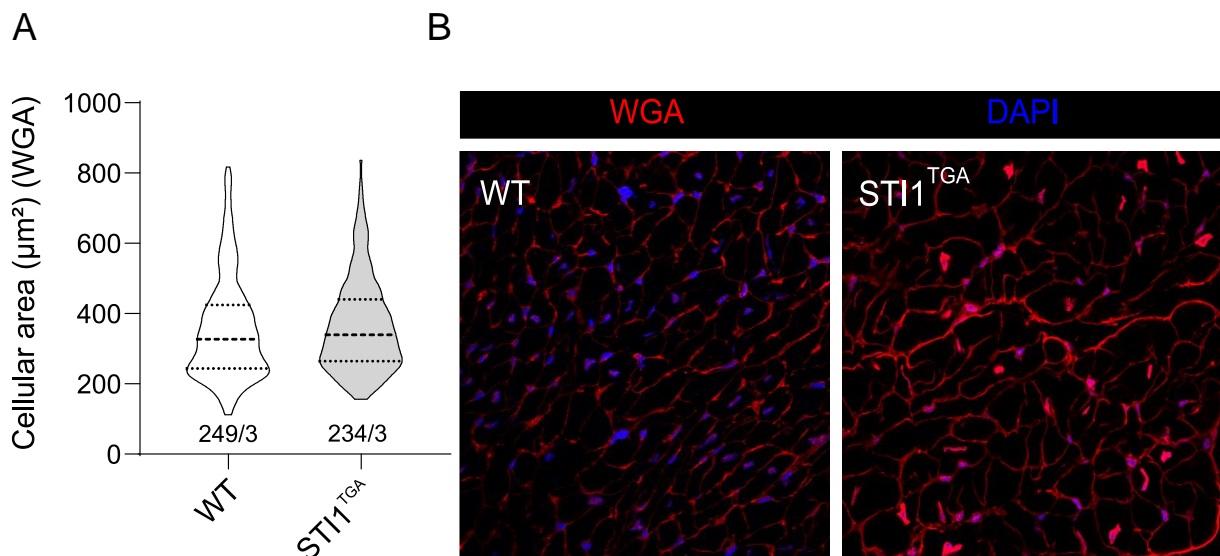


Figura 17 - Animais STI1-TgA apresentam área da fibra cardíaca semelhante a animais WT. A) Gráfico de violino mostra a área da fibra cardíaca em corte transversal não é alterada em camundongos STI1-TgA. B) Imagens representativas de imunofluorescência com marcação de WGA delimitando a membrana celular em cortes transversais de tecido cardíaco de animais WT e STI1-TgA (Em vermelho, marcação do WGA na membrana e em azul, marcação nuclear com DAPI). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O test-*t* foi usado para comparar grupos (n= número de células/número de animais).



Com o objetivo de avaliar a função contrátil de cardiomiócitos ventriculares isolados e possíveis alterações na função cardíaca, utilizamos o sistema IonOptix para avaliarmos a contratilidade de CMs provenientes de camundongos WT e STI1-TgA no estado basal. Como observado na Figura 18, camundongos STI1-TgA apresentaram um aumento significativo na

fração de encurtamento e consequente aumento na contratilidade (Figura 18A-B). A dinâmica de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares é um importante parâmetro de funcionamento do manejo intracelular de Ca^{2+} e acoplamento excitação-contração cardíaca. Na Figura 19 podemos observar que cardiomiócitos provenientes de animais STI1-TgA apresentam aumento no pico do transiente de Ca^{2+} (F/F_0), quando comparados a animais WT (Figura 19A). Também foi observado que o tempo do decaimento do transiente de Ca^{2+} no momento do relaxamento celular (T50), uma medida indireta do funcionamento da Serca2a (ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático), está reduzido em animais STI1-TgA (Figura 19B). Logo, esse resultado corrobora e explica o aumento na contratilidade de CMs observada em animais STI1-TgA pela maior disponibilidade de Ca^{2+} para contração e mais rápida recaptação de Ca^{2+} no relaxamento celular. Juntos, esses dados nos dão um importante indicativo de que camundongos STI1-TgA apresentam uma função cardíaca melhorada que pode vir a ser benéfica em condições de estresse.

Figura 18 - Animais STI1-TgA apresentam uma melhora na função contrátil de cardiomiócitos a nível basal.

A) A fração de encurtamento de cardiomiócitos isolados está aumentada em animais que superexpressam a STI1. B) Traçados representativos da fração de encurtamento em CMs de animais WT e STI1-TgA. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O Test-*t* foi usado para comparar grupos (n= número de células/número de animais). * = $p < 0,05$.

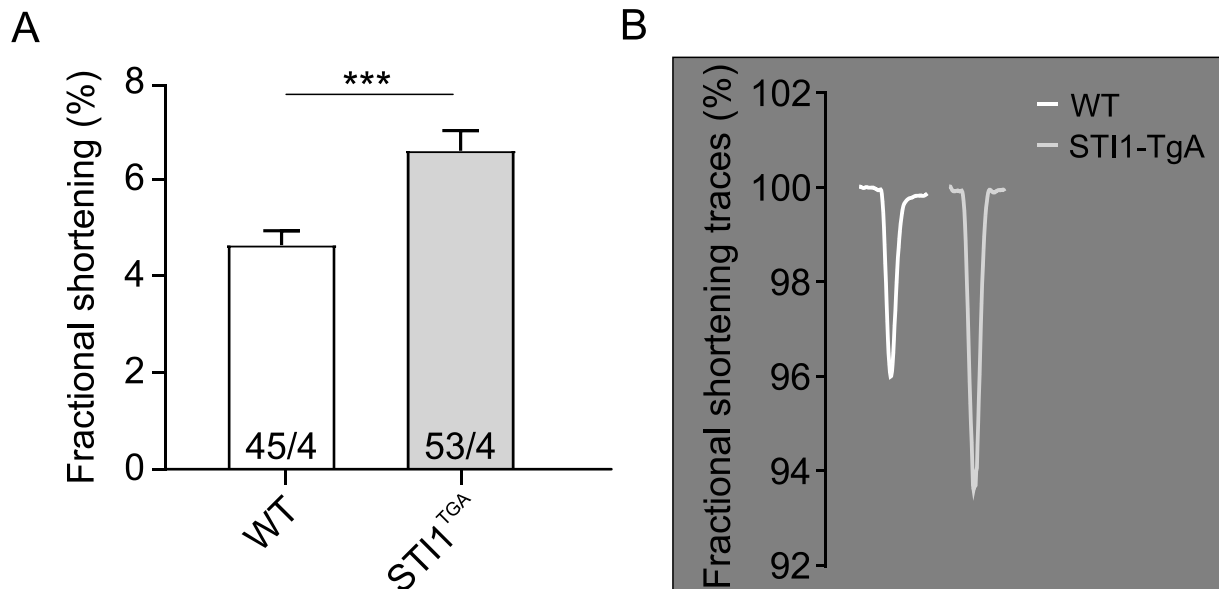
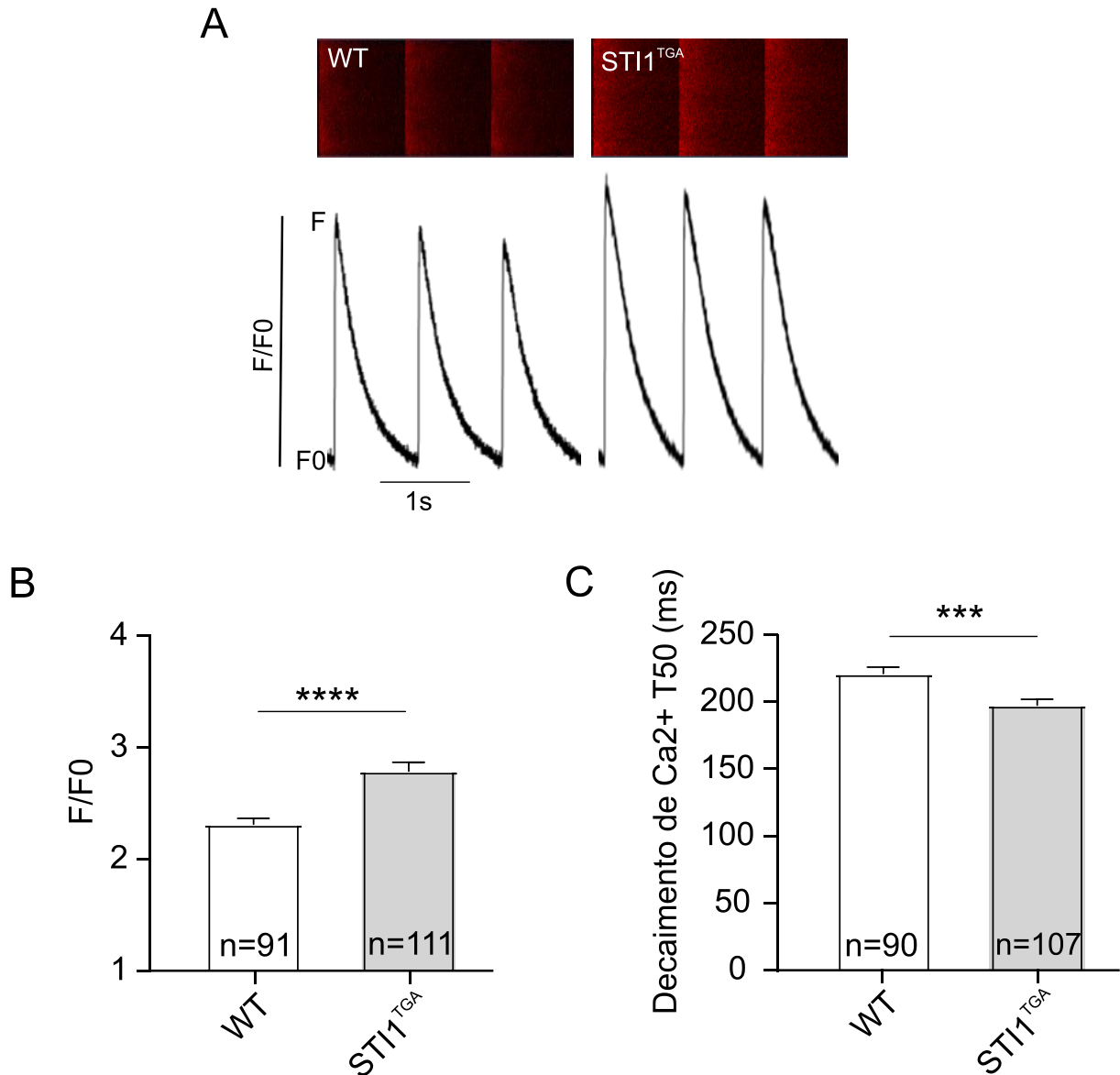


Figura 19 - Cardiomiócitos provenientes de camundongos STI1-TgA apresentam aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+} . A) Imagens representativas do transiente de Ca^{2+} obtidas a partir de cardiomiócitos marcados com a sonda fluorescente Fluo-4 AM. B) Pico do transiente de Ca^{2+} está aumentado em cardiomiócitos provenientes de camundongos STI1-TgA. C) Cardiomiócitos de animais STI1-TgA apresentam redução no tempo do decaimento do transiente de Ca^{2+} (T50). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O Test-*t* foi usado para comparar grupos (n= número de células/número de animais). *= $p < 0,05$.



5.1.2. Análise do proteoma do tecido cardíaco de animais STI1-TgA

Com base no fato de que a STI1 é uma proteína importante no controle de qualidade de proteínas e com o intuito de identificar e entender possíveis alterações no proteoma cardíaco induzidas pela superexpressão da STI1, nós submetemos amostras de tecido cardíaco de animais WT e STI1-TgA a espectrometria de massa. Uma vez identificadas as proteínas

expressas, os dados de abundância relativa das proteínas obtidos para cada amostra foram comparados entre os animais do mesmo grupo. Como observado na Figura 20 as amostras do grupo WT apresentaram abundâncias relativas semelhantes e o mesmo ocorreu entre os animais do grupo STII-TgA (Figura 20A e B), assim, mostrando uma homogeneidade entre os grupos. Ao analisarmos a dispersão dos dados de abundância relativa das proteínas foi possível observar que ambos os grupos apresentaram distribuição normal para todos os animais dentro do mesmo grupo (Figura 21).

Figura 20 - A abundância relativa das proteínas é semelhante entre os animais de cada grupo. A) Abundância relativa das proteínas entre os animais do grupo WT. **B)** Abundância relativa das proteínas entre os animais do grupo STII-TgA.

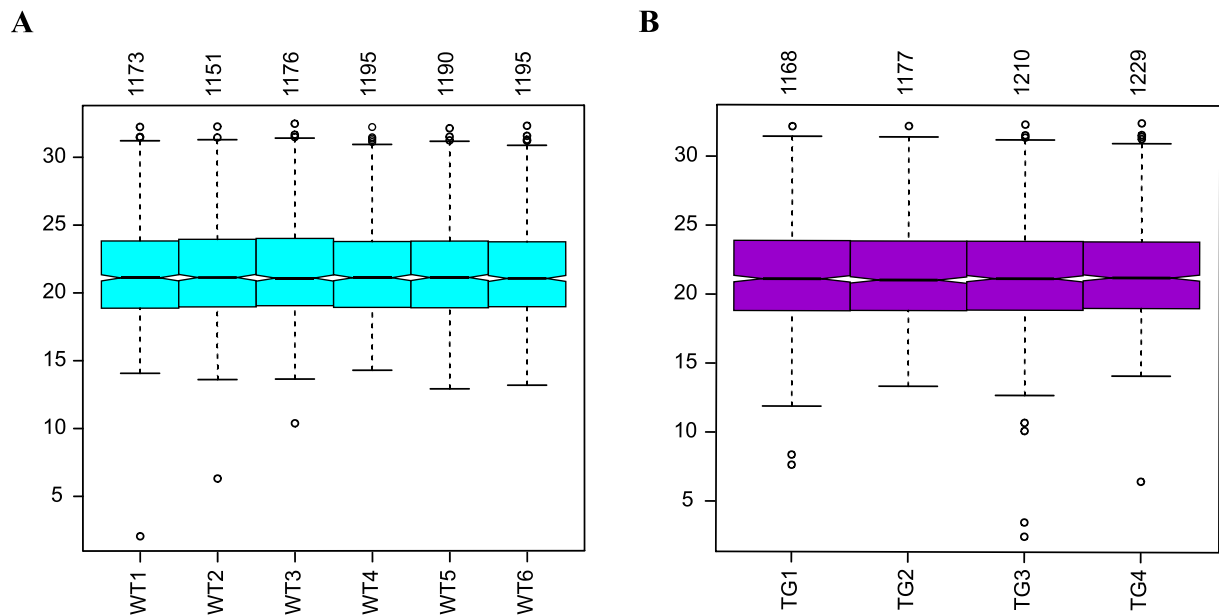
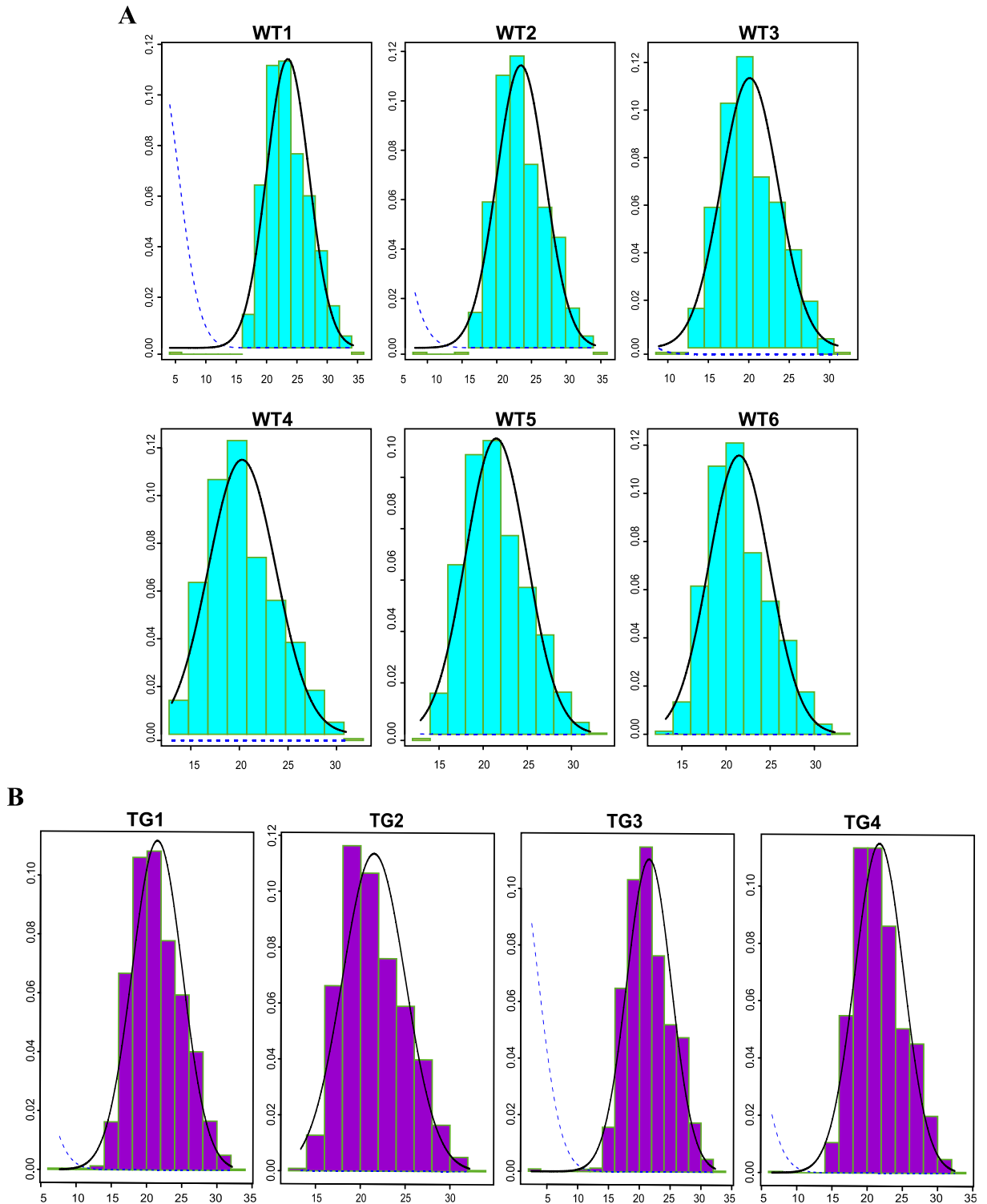


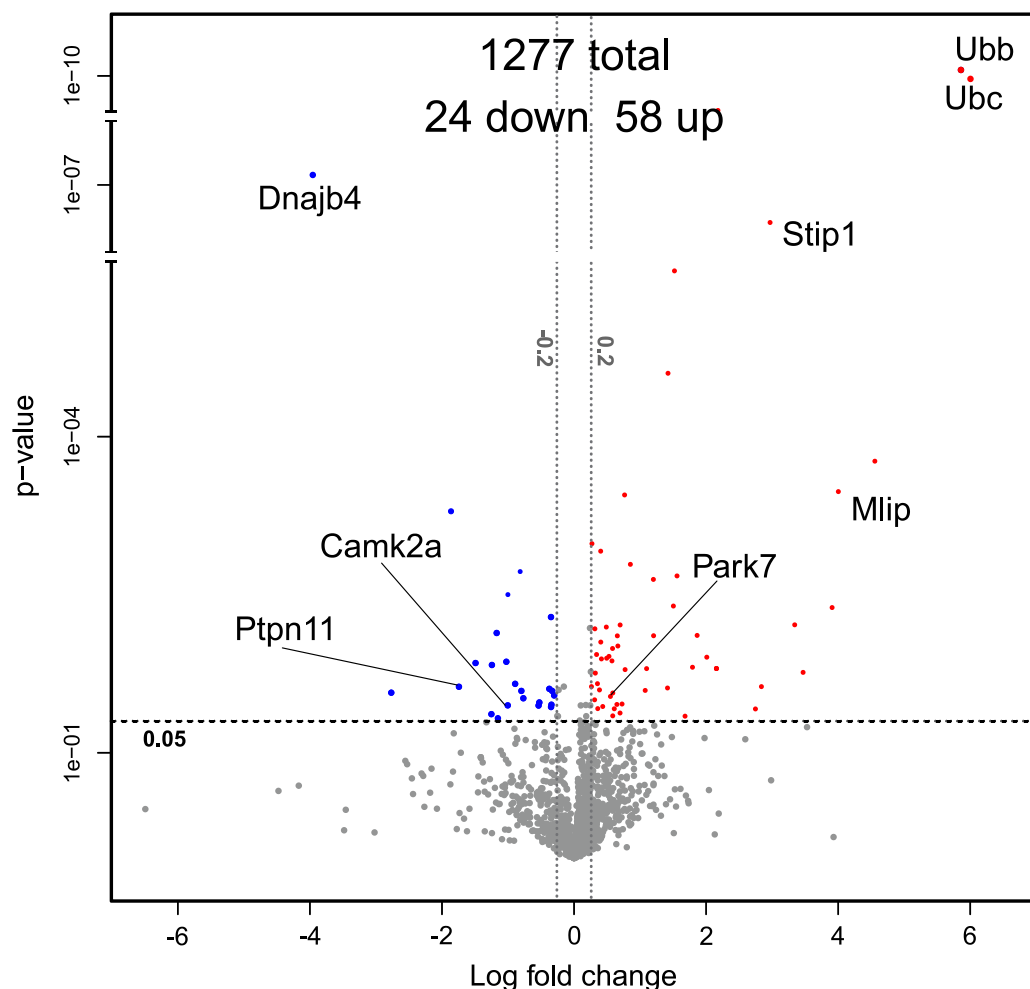
Figura 21 - A dispersão da abundância relativa das proteínas apresenta distribuição normal entre os animais de cada grupo. A) Distribuição normal da abundância relativa das proteínas entre os animais do grupo WT. B) Distribuição normal da abundância relativa das proteínas entre os animais do grupo STI1-TgA.



Quando analisamos a expressão global de proteínas no coração de camundongos STI1-TgA foi possível identificar um total de 1277 proteínas expressas. Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, nós submetemos ao teste-t, utilizando o grupo controle (WT)

como referência e significância de $p\text{-value} < 0,05$. Além disso, também foi aplicado o cutoff de abundância relativa da proteína maior que 0,2 e menor que -0,2 para identificar proteínas diferencialmente expressas no coração de camundongos STI1-TgA. Assim, encontramos um total de 82 proteínas que foram diferencialmente expressas, onde 58 foram reguladas positivamente (expressão aumentada) e 24 reguladas negativamente (expressão reduzida) (Figura 22). Os dados presentes na Figura 22 são mostrados em escala de Log na base 2. Valores negativos indicam expressão reduzida e valores positivos indicam expressão aumentada.

Figura 22 - Volcano Plot. Distribuição dos $p\text{-value}$ em relação a abundância relativa das proteínas encontradas expressas em animais STI1-TgA, comparado a animais WT. Linha tracejada horizontal = limiar de $p < 0,05$. Linhas tracejadas verticais = limiar de abundância relativa da proteína maior que 0,2 e menor que -0,2. (Os dados são mostrados em escala de Log na base 2).



Dentre as proteínas positivamente reguladas, além da STI1 que mostrou sua expressão significativamente aumentada no modelo em estudo, podemos destacar proteínas envolvidas

em processos de ubiquitinação de proteínas (*Ubb* e *Ubc*), adaptação cardíaca ao estresse (*Mlip*), cardioproteção em resposta ao estresse oxidativo (*Park7*), proteínas envolvidas com a síntese proteica e regulação pré e pós-traducionais (*Rps16*, *Ppl4*, *Ppl13*, *Rbmx*), sobrevivência celular (*Fgf1*), dentre outros processos (Figura 22). Em conjunto estes dados apontam que animais STI1-TgA apresentam um arcabouço de proteínas preparadas para adaptação cardíaca ao estresse. O grupo de proteínas positivamente reguladas após aplicados os critérios de *p-value* e abundância da proteína maior que 0,2 estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3 - Proteínas reguladas positivamente no proteoma de animais STI1-TgA vs animais WT.

ID Uniprot	Gene	Razão da abundância da proteína (Log2)	t-test (P-value)
P0CG49	Ubb	6,45	6,62E-11
P0CG50	Ubc	6,45	6,62E-11
Q9EPC1	Parva	4,56	1,71E-04
Q5FW52	Mlip	4,00	3,32E-04
P13541	Myh3	3,91	4,18E-03
P05125	Nppa	3,47	1,72E-02
A0A0A6YXW6	Igha	3,34	6,10E-03
Q60864	Stip1	2,97	2,27E-07
F6TQW2	Ighg2c	2,84	2,35E-02
Q9DB73	Cyb5r1	2,75	3,83E-02
Q64525	Hist2h2bb	2,18	3,97E-08
Q91VM5	Rbmxl1	2,16	1,59E-02
Q9WV02	Rbmx	2,16	1,59E-02
A0A2I3BRL8	Gm7324	2,16	1,59E-02
Q8BMK4	Ckap4	2,01	1,24E-02
E9PYF4	Lmo7	1,86	7,69E-03
P01867	Igh-3	1,79	1,54E-02
P01837	Igkc	1,68	4,49E-02
P62141	Ppp1cb	1,56	2,10E-03
P19157	Gstp1	1,52	2,67E-06
Q9CQ73	Pkp2	1,50	4,05E-03
D3Z7X0	Acad12	1,42	2,50E-05
Q9JK48	Sh3glb1	1,42	2,43E-02
P14131	Rps16	1,20	7,74E-03
P50247	Ahcy	1,20	2,26E-03
P61148	Fgf1	1,10	1,59E-02
P62827	Ran	1,08	2,56E-02
Q9QUI0	Rhoa	0,85	1,63E-03
P06801	Me1	0,77	1,62E-02
Q60854	Serpinb6	0,77	3,57E-04
P80316	Cct5	0,73	3,44E-02
Q8BZF8	Pgm5	0,70	6,12E-03
P24369	Ppib	0,70	4,19E-02
Q3UIZ8	Mylk3	0,66	9,69E-03
Q9WUR2	Eci2	0,66	7,76E-03
P14142	Slc2a4	0,65	3,47E-02
P08752	Gnai2	0,61	3,82E-02
P27546	Map4	0,59	2,71E-02
Q8CCM6	Timm21	0,59	4,46E-02
Q9D8E6	Rpl4	0,58	1,02E-02
P23506	Pcmt1	0,57	1,34E-02
P62962	Pfn1	0,55	2,92E-02

Q4VAE3	Tmem65	0,53	1,22E-02
P47963	Rpl13	0,49	1,27E-02
O88844	Idh1	0,49	6,41E-03
Q8BLF1	Nceh1	0,43	3,63E-02
Q9JK42	Pdk2	0,41	1,28E-02
P32020	Scp2	0,40	8,90E-03
Q9ERS2	Ndufa13	0,40	1,22E-03
Q9CQ75	Ndufa2	0,39	2,53E-02
Q99KQ4	Nampt	0,36	3,81E-02
Q9D0K2	Oxct1	0,35	2,21E-02
P47738	Aldh2	0,34	1,17E-02
Q9EQP2	Ehd4	0,32	1,75E-02
Q9D1G3	Hhat1	0,32	6,65E-03
Q99LX0	Park7	0,31	3,14E-02

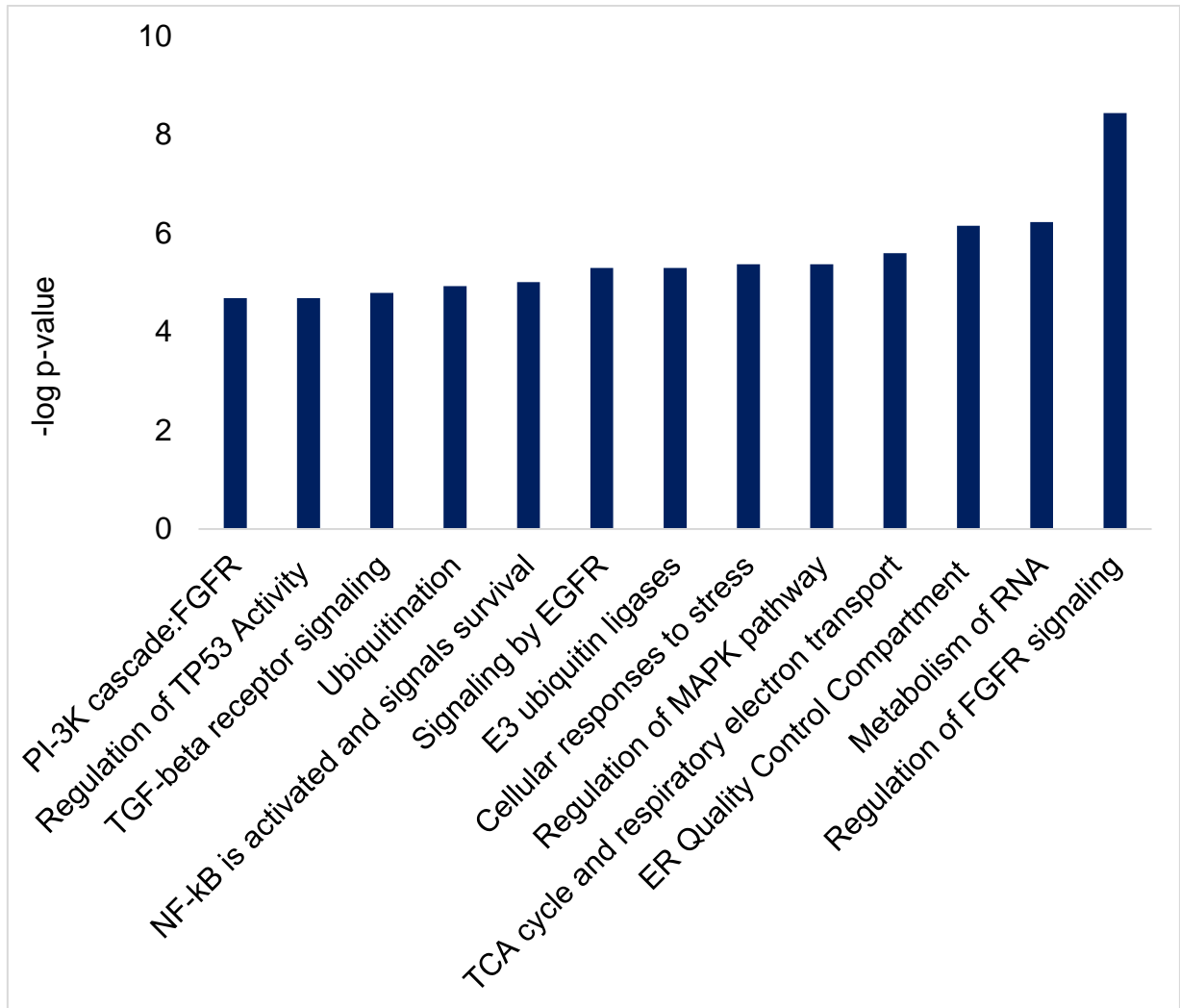
Dentre as proteínas negativamente reguladas, destacamos proteínas envolvidas em processos celulares de enovelamento e maturação proteica (*Dnajb4*, *Unc45b*), regulação da fosforilação de proteínas envolvidas na contração, apoptose e ativação transcricional (*Camk2a*), regulação positiva de vias de transdução de sinais hipertróficos (*Ptpn11*), metabolismo de ácidos graxos (*Cyb5r1*, *Acad12*) e dentre outros processos celulares (Figura 22). As proteínas negativamente reguladas após aplicados os critérios de *p-value* e abundância relativa da proteína menor que -0,2 estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4 - Proteínas reguladas negativamente no proteoma de animais STI1-TgA vs animais WT.

ID Uniprot	Gene	Razão da abundância da proteína (Log2)	t-test (P-value)
Q9D832	Dnajb4	-3,96	8,04E-08
Q9CRD0	Ociad1	-2,77	2,69E-02
Q8CGY6	Unc45b	-1,86	5,10E-04
P35235	Ptpn11	-1,74	2,36E-02
P61161	Actr2	-1,49	1,41E-02
O70373	Xirp1	-1,25	4,30E-02
Q80XL6	Acad11	-1,24	1,47E-02
Q8BVI4	Qdpr	-1,17	7,29E-03
Q9WUZ7	Sh3bgr	-1,15	4,70E-02
Q91YE8	Synpo2	-1,03	1,37E-02
P11798	Camk2a	-1,00	3,55E-02
O08709	Prdx6	-1,00	3,15E-03
Q149B8	Perm1	-0,89	2,22E-02
Q6P3A8	Bckdhb	-0,82	1,91E-03
Q8VCT4	Ces1d	-0,80	2,59E-02
Q9CZM2	Rpl15	-0,77	3,04E-02
P21981	Tgm2	-0,54	3,56E-02
O08583	Alyref	-0,53	3,33E-02
Q9CQV8	Ywhab	-0,37	2,47E-02
P60060	Sec61g	-0,35	5,15E-03
P03911	Mtnd4	-0,35	3,68E-02
O08528	Hk2	-0,34	3,50E-02
O09131	Gsto1	-0,33	2,58E-02
P40630	Tfam	-0,30	2,85E-02

Com o intuito de entender como a expressão diferencial das proteínas identificadas poderiam impactar nos processos biológicos cardíacos no coração de animais STI-TgA, nós analisamos os dados de abundância relativa no software/banco de dados IPA Pathway (*Ingenuity Pathway Analysis*, QIAGEN IPA). Após processamento dos dados, foi possível prever vias de sinalização que possam estar alteradas pela expressão diferencial das proteínas encontradas no coração de camundongos STI1-TgA. Na figura 23 encontram-se as vias alteradas com maior probabilidade de estarem relacionadas ao fenótipo observado no nosso modelo de superexpressão da STI1.

Figura 23 - Vias de sinalização preditas alteradas no coração de camundongos STI1-TgA. Os dados são apresentados em Log de p-value.

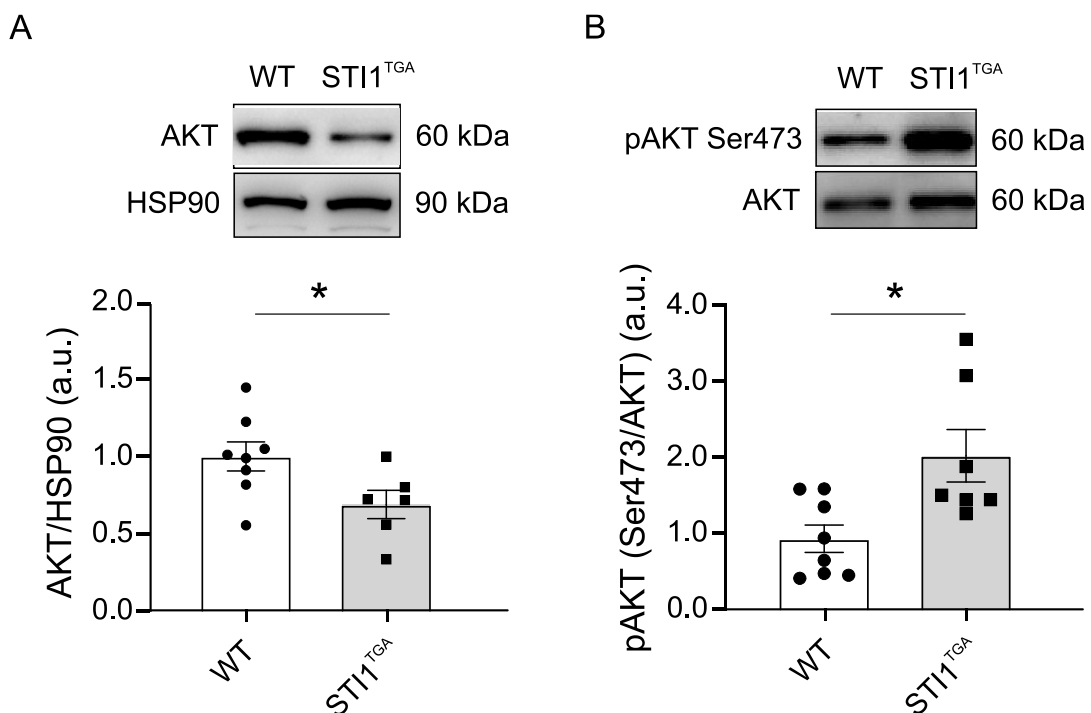


A análise de predição das vias alteradas em animais STI1-TgA mostrou alterações em vias relacionadas ao metabolismo de RNA, compartimento de controle de qualidade do retículo endoplasmático e ubiquitinação de proteínas, sendo este um indicativo de alteração em processos de síntese proteica, regulação transcricional, controle de qualidade de proteínas e degradação proteica. Todos esses processos são de grande importância para a homeostasia proteica.

Também foi observada predição de alteração em vias relacionadas a resposta celular ao estresse, regulação da atividade da TP53, ativação do fator de transcrição NF-kB e sinais de sobrevivência, regulação da via das MAPK e da via de sinalização FGFR, bem como, alteração na sinalização do receptor TGF- β , o que indica uma possível relação com uma menor predisposição ao desenvolvimento de hipertrofia e remodelamento cardíaco em animais STI1-TgA.

Uma vez que as análises proteômicas predisseram uma ativação do fator de transcrição NF- κ B e sinais de sobrevivência, e sabendo que a via da AKT é conhecida por estar envolvida na ativação de vias de sobrevivência celular em CMs, é capaz de ativar a transcrição do NF- κ B e é uma proteína cliente da maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90, nós avaliamos a expressão proteica e fosforilação da AKT. Como resultado, observamos que embora a expressão proteica da AKT esteja reduzida no tecido cardíaco de animais STI1-TgA, a sua ativação parcial pela fosforilação no sítio Ser473 está aumentada nesses animais comparados a camundongos WT (Figura 24A e B), indicando uma maior ativação desta via importante de sobrevivência celular.

Figura 24 - AKT está mais ativada no coração de animais STI1-TgA. A) A expressão proteica da AKT no coração de camundongos STI1-TgA é reduzida em comparação a camundongos WT. B) A fosforilação da AKT no sítio Ser473 é aumentada no coração de animais STI1-TgA (WT: n=8, STI1-TgA: n=7, $P < 0,05$). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O test-*t* foi usado para comparar grupos. *= $p < 0,05$.

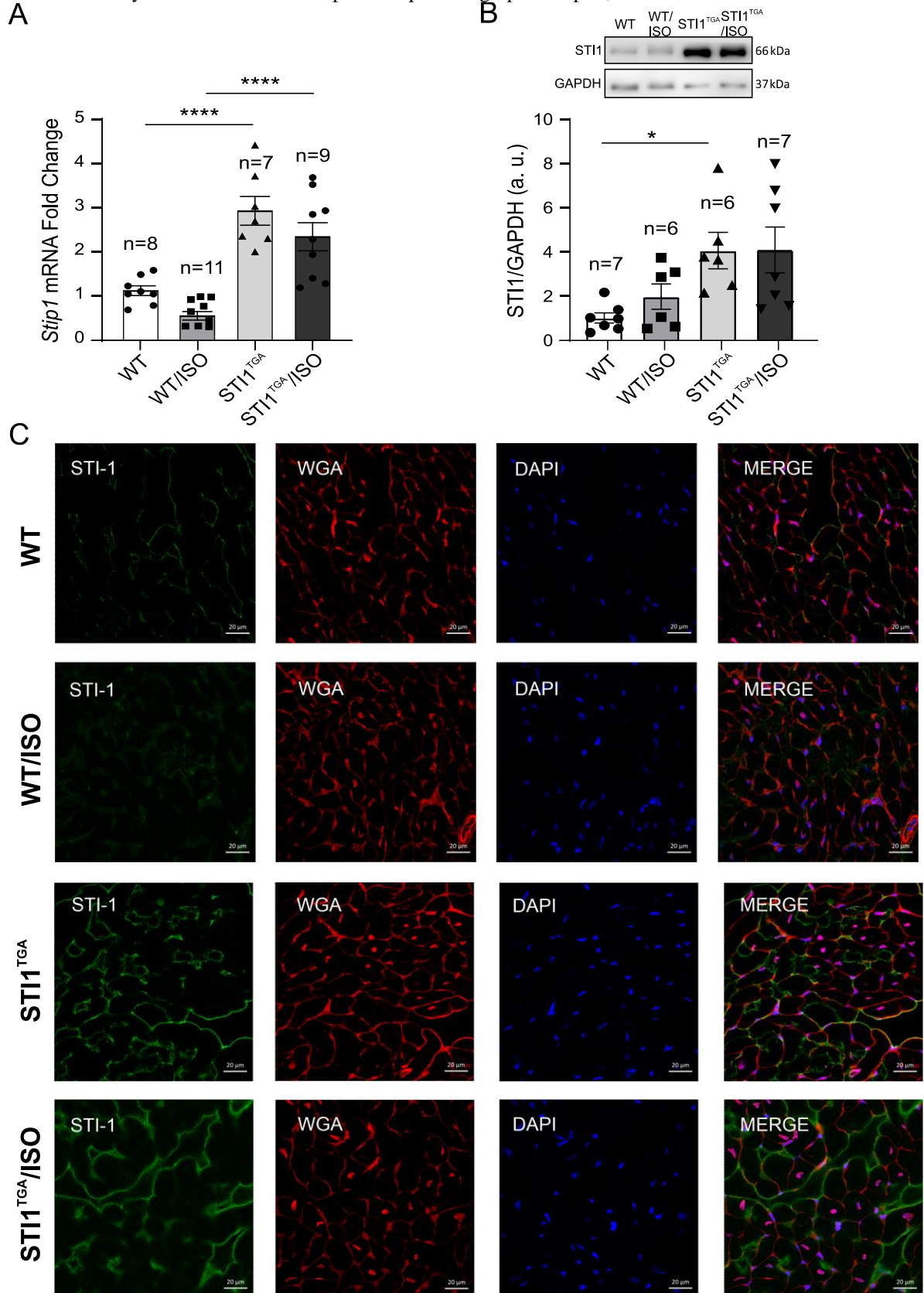


5.2. Caracterização da resposta cardíaca do camundongo STI1-TgA ao tratamento com isoproterenol

Visto que animais STI1-TgA apresentam características macroestruturais aparentemente normais e alterações no proteoma cardíaco que indicam a ativação de vias de

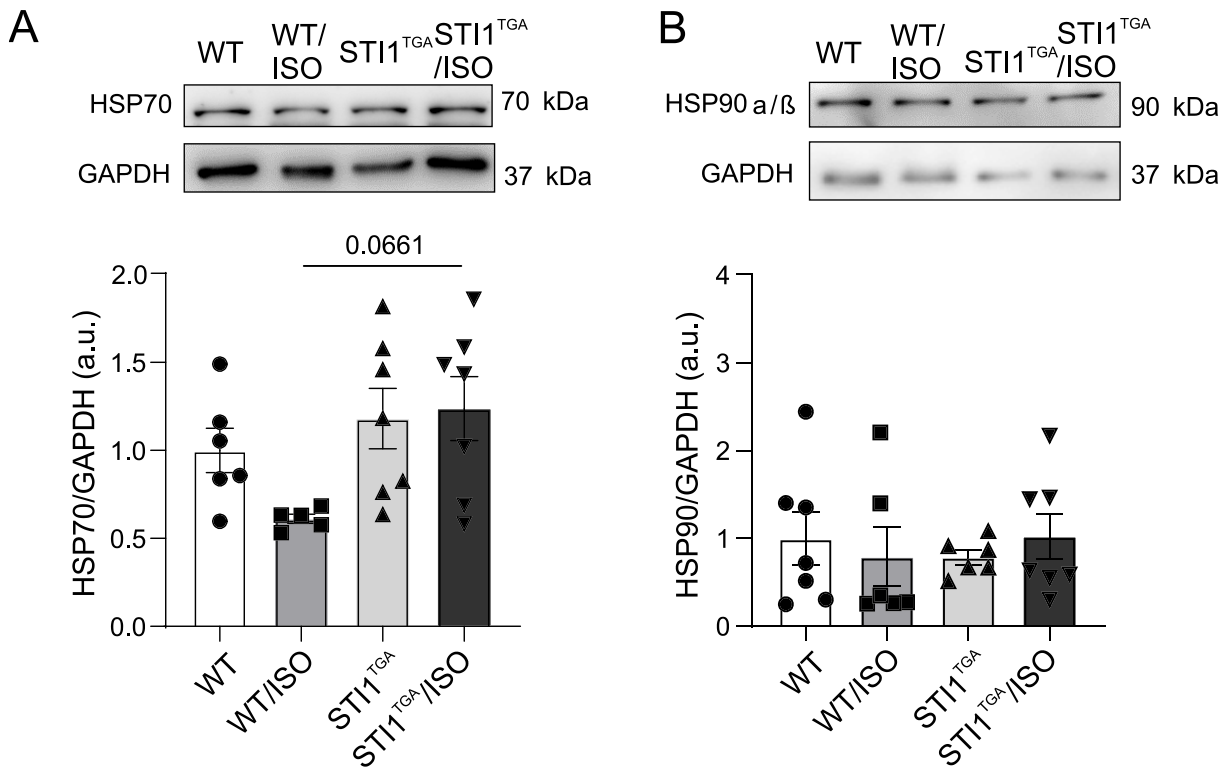
resposta ao estresse, partimos para avaliar a resposta desses animais frente ao estímulo estressor causado pelo Isoproterenol (ISO), após tratamento crônico (20mg/Kg/dia) por 7 dias. Quando avaliamos a expressão dos níveis de mRNA e da proteína STI1 foi possível observar que o ISO não alterou a expressão da STI1 em animais WT e STI1-TgA (Figura 26A e B). Análises de imunofluorescência da STI1 realizadas em cortes histológicos de corações de camundongos tratados com ISO ou salina demonstraram uma localização tecidual da STI1 com uma distribuição mais dispersa no citoplasma dos cardiomiócitos em tecidos de animais tratados com ISO (Figura 26C). Esse dado nos indica um possível recrutamento da STI1 para o citoplasma em resposta ao estresse, visto que a expressão da STI1 não é alterada em resposta ao ISO.

Figura 25 - Tratamento com Isoproterenol altera a localização da STI1 no coração. A) Níveis de mRNA do gene *Stip1* não são alterados pelo tratamento com ISO em animais WT e STI1-TgA. B) Expressão proteica da STI1 não é afetada pelo tratamento com ISO. C) Imagens representativas de imunofluorescência mostrando a localização tecidual da STI1 em cortes transversais de corações de camundongos WT e STI1-TgA tratados com salina ou ISO. Os dados são mostrados como média \pm SD (A). Os dados são mostrados como média \pm SEM (B). O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. * = $p < 0,05$.



Com o intuito de avaliar se o tratamento com ISO é capaz de alterar a expressão das chaperonas HSP70/HSP90, avaliamos a expressão proteica de ambas no coração. Como observado na Figura 27, a expressão da HSP70 possui uma tendência de redução na expressão em camundongos WT/ISO comparado a camundongos STI1-TgA/ISO (Figura 27A), enquanto que a expressão da HSP90 não se mostrou alterada pelo tratamento com ISO (Figura 27B). Esse resultado nos indica que o ISO pode estar regulando o funcionamento dessa maquinaria pela regulação da expressão da HSP70 em camundongos selvagens, o que não ocorre em camundongos STI1-TgA.

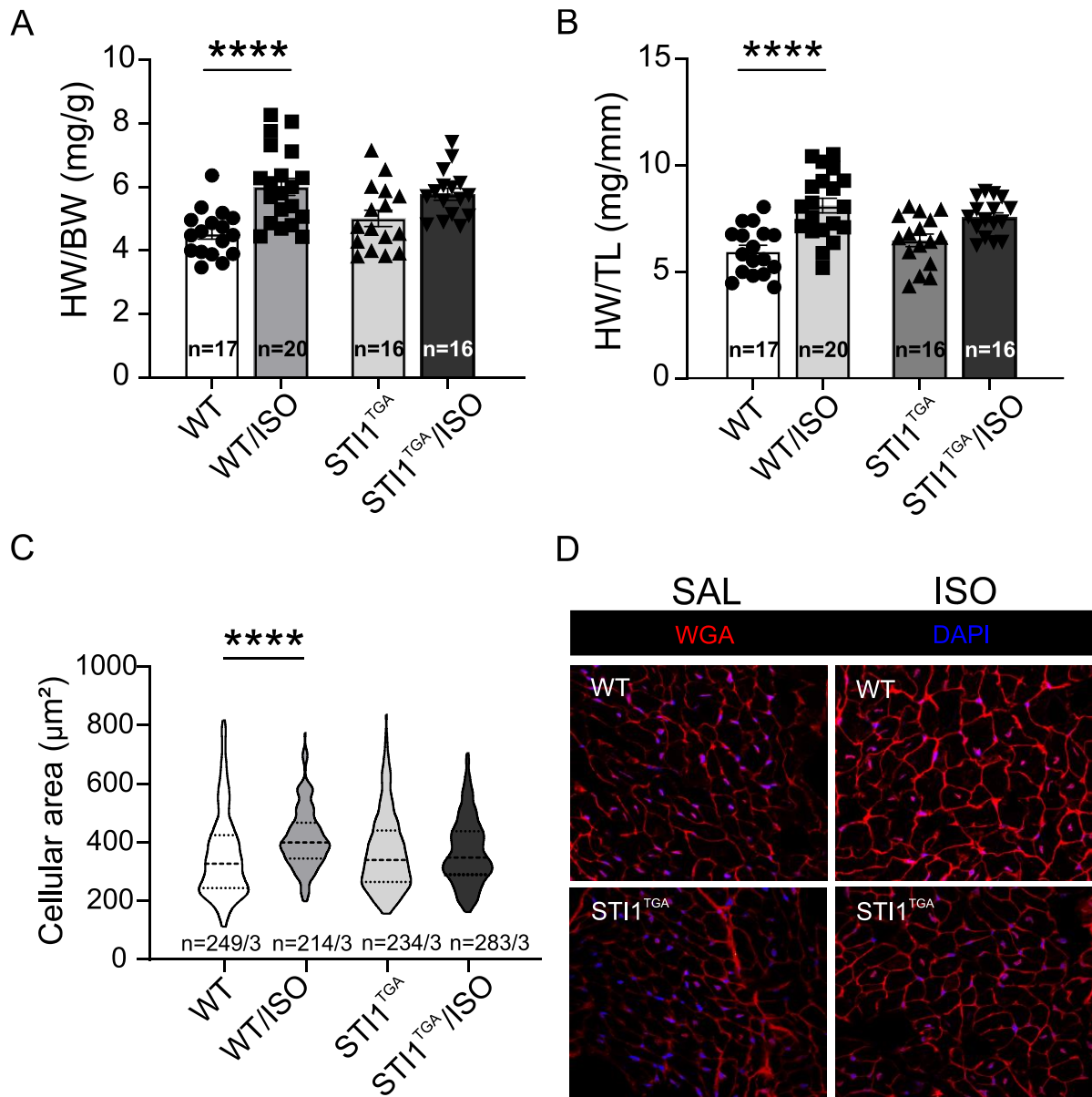
Figura 26 - Expressão proteica da maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90 em animais tratados com ISO. A) A expressão da HSP70 é reduzida em animais WT/ISO. (WT: n=6, WT/ISO: n=5, STI1-TgA: n=7 e STI-TgA/ISO: n=7). B) A expressão da HSP90 não sofre alteração pelo tratamento com ISO (WT: n=7, WT/ISO: n=6, STI1-TgA: n=6 e STI-TgA/ISO: n=7). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. *= p<0,05.



Para confirmar a hipertrofia cardíaca a nível macroestrutural, quando analisamos o coração de animais tratados com ISO foi observado que a razão HW/BW, bem como, HW/TL se mostraram aumentadas em animais WT/ISO (Figura 28A e B), como esperado. No entanto este aumento não foi observado em camundongos STI1-TgA tratados com ISO. Embora animais STI1-TgA/ISO tenham demonstrado uma tendência de aumento na razão HW/TL de ~16% não houve diferença estatística, assim sendo o aumento no peso do coração mais pronunciado em animais WT/ISO (WT: ~35% - p<0,05; STI1-TgA: ~16% - p<0,07). A análise

de área celular por morfometria em cortes histológicos com marcação para WGA mostrou um aumento na área celular em animais WT/ISO (Figura 28C e D), o que não ocorreu em animais STI1-TgA/ISO. Assim, indicando que um dos fatores que conduzem ao aumento do tamanho do coração em resposta ao ISO em animais WT é a hipertrofia de cardiomiócitos, fenômeno esse que não ocorre em animais STI1-TgA/ISO. Dessa forma confirma-se que nosso modelo de tratamento com ISO induz hipertrofia cardíaca e sugere que animais STI1-TgA estejam protegidos da hipertrofia cardíaca após estresse hipertrófico causado pelo ISO.

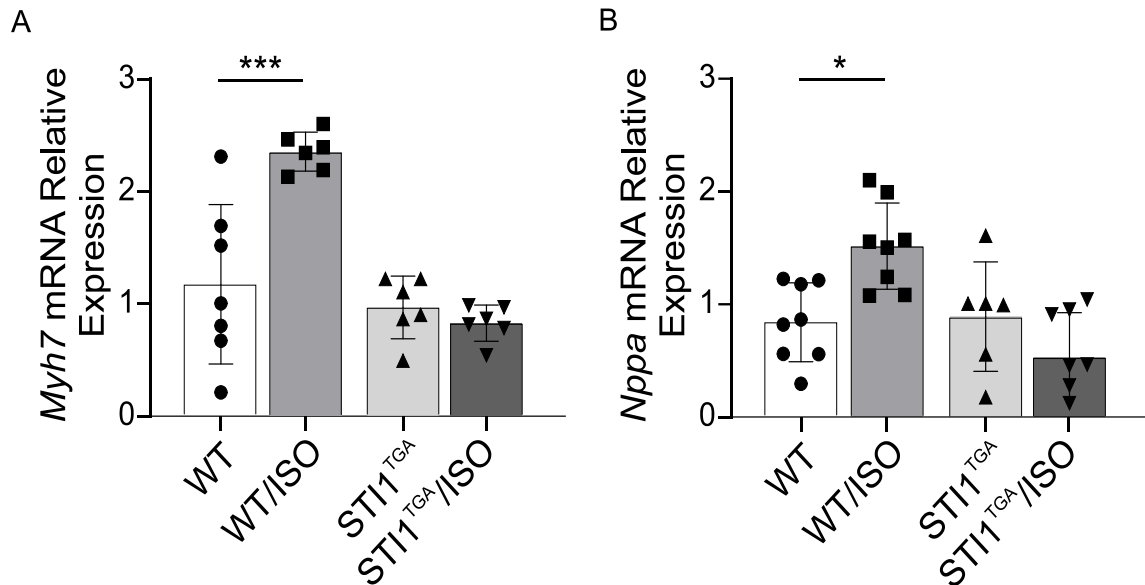
Figura 27 - Camundongos STI1-TgA não apresentam hipertrofia após tratamento com ISO. **A)** Razão do peso do coração pelo peso corporal (HW/BW) está aumentada apenas em animais WT após tratamento com ISO. **B)** Razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia (HW/TL) está aumentada apenas em animais WT após tratamento com ISO. **C)** Área celular de cardiomiócitos em corte transversal não é alterada em camundongos STI1-TgA tratados com ISO. **D)** Imagens representativas de imunofluorescência com marcação para WGA delimitando a membrana celular em cortes transversais de tecido cardíaco de animais WT e STI1-TgA tratados com salina ou ISO (Em vermelho, marcação do WGA na membrana e em azul, marcação nuclear com DAPI). Os dados são mostrados como média \pm SEM (A-B). O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. Os dados são mostrados como mediana e o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os grupos (C) (n= número de células/número de animais). *= $p < 0,05$.



O remodelamento cardíaco pode ser caracterizado também pela reexpressão de genes do programa fetal que codificam para β -MHC, ANP, BNP e α -actina esquelética. Quando avaliamos os níveis de mRNA dos genes que codificam para β -MHC (*Myh7*) e ANP (*Nppa*), observamos um aumento nos níveis de *Myh7* e *Nppa* no grupo WT/ISO, o que não ocorreu nos

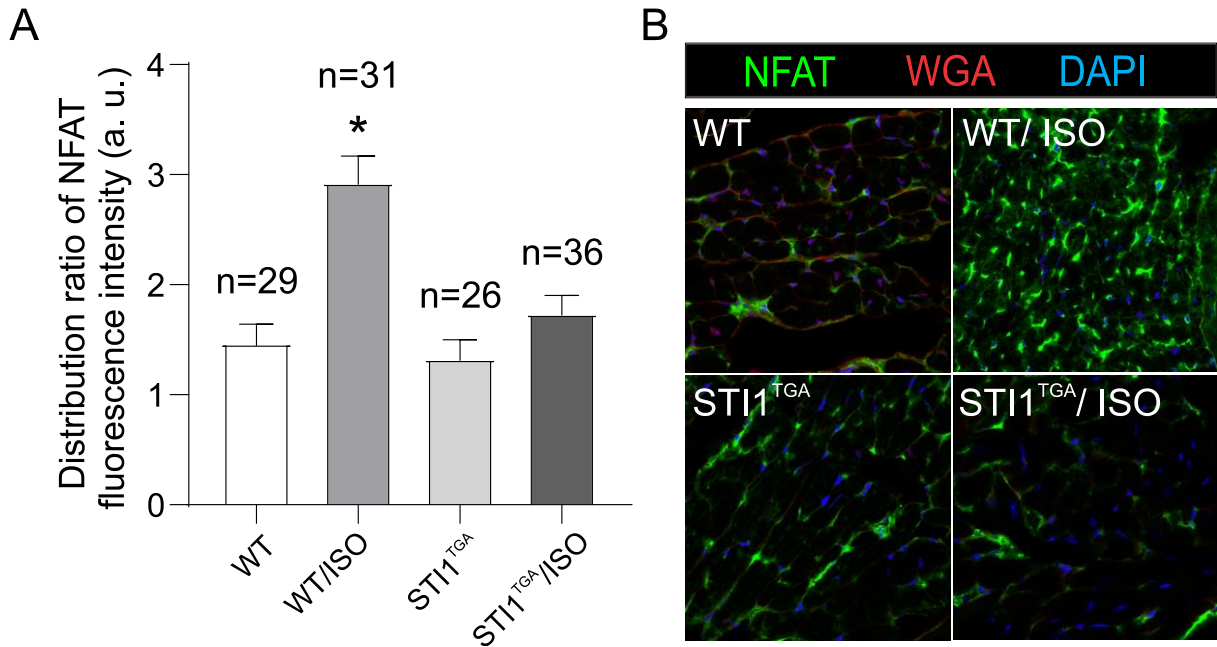
animais STI1-TgA/ISO (Figura 29A e B). Esse resultado mais uma vez confirma a resposta hipertrófica, bem como, adaptativa do coração frente ao ISO, e indica que animais STI1-TgA podem apresentar um coração adaptado frente a esse estímulo estressor.

Figura 28 - Expressão de marcadores de estresse cardíaco não estão alterados em camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO. A) Níveis de mRNA do gene *Myh7* estão aumentados apenas em animais WT após tratamento com ISO. C) Níveis de mRNA do gene *Nppa* estão aumentados após tratamento com ISO apenas em animais WT. Os dados são mostrados como média \pm SD. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. *= $p < 0,05$.



O fator de transcrição NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), em conjunto com outros fatores de transcrição, é um fator pró hipertrófico que desempenha um papel crucial na ativação da transcrição de genes e vias de sinalização pró-hipertróficas, bem como, na regulação do processo de remodelamento cardíaco e insuficiência cardíaca. Avaliamos por imunofluorescência a expressão do NFAT no tecido cardíaco de animais WT e STI1-TgA tratados com ISO. Como observado na Figura 30, apenas os animais WT/ISO apresentaram uma aumentada expressão do NFAT, dado este que corrobora os dados obtidos previamente como a hipertrofia e a ativação da transcrição de genes do programa fetal neste grupo (Figura 29).

Figura 29 - O tratamento com ISO aumenta a expressão do fator de transcrição NFAT em corações hipertrofiados. A) A expressão do NFAT está aumentada em animais WT/ISO. B) Imagens representativas da imunofluorescência para o NFAT no tecido cardíaco de animais WT e STI1-TgA tratados ou não com ISO. (Em verde, marcação para NFAT e em azul, marcação nuclear com DAPI). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (n= número de imagens/número de animais). *= $p < 0,05$ em comparação a todos os grupos.



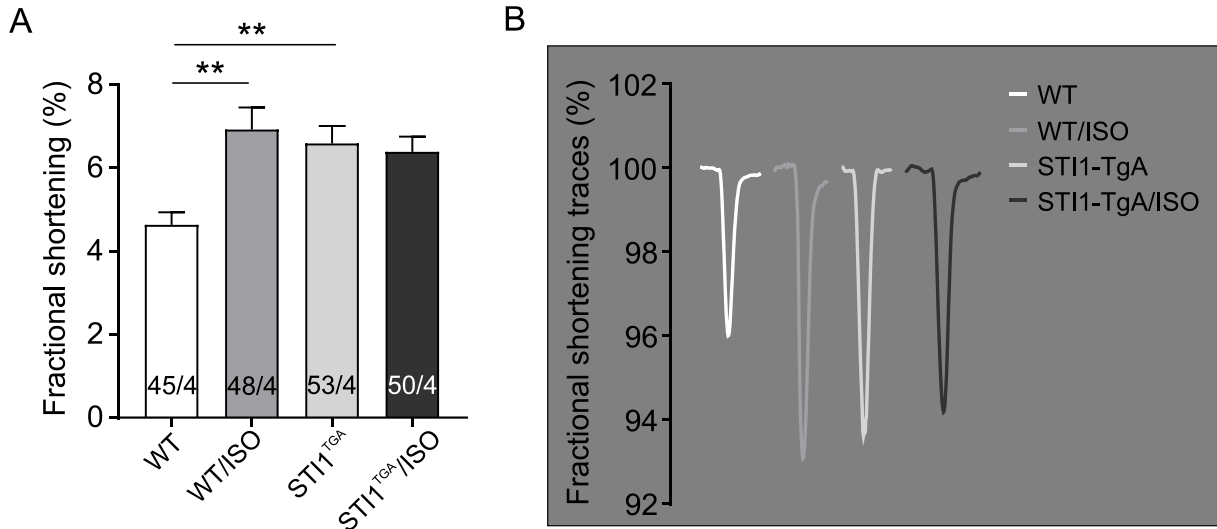
Com o objetivo de analisar a função ventricular esquerda e a morfologia cardíaca após estresse hipertrófico induzido por isoproterenol, nós realizamos análises de ecocardiografia em animais WT e STI1-TgA tratados com salina ou ISO. A análise da morfologia cardíaca não nos mostrou alterações significativas nos parâmetros avaliados, no entanto, animais WT/ISO nos mostraram uma tendência de aumento no LVPW na diástole (LVPW= espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo) que corrobora com a hipertrofia cardíaca já observada nesse grupo, mas que precisa ser melhor investigada pelo aumento no tamanho do n amostral (Tabela 5).

Tabela 5 - Ecocardiograma de animais WT e STI1-TgA tratados com ISO, parâmetros morfológicos (SAX M-mode). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (n= número de animais). *LVAW;d = Parede anterior do ventrículo esquerdo na diástole, LVAW;s = Parede anterior do ventrículo esquerdo na sístole, LVID;d = Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole, LVID;s = Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole, LVPW;d = Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole, LVPW;s = Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole, VE = Ventrículo esquerdo.

Parâmetro	WT (n=5)	WT/ISO (n=6)	STI1-TgA (n=5)	STI1-TgA/ISO (n=5)
LVAW; d	0,8329 \pm 0,094	0,7661 \pm 0,011	0,8545 \pm 0,043	0,9193 \pm 0,082
LVAW; s	1,265 \pm 0,066	1,238 \pm 0,046	1,375 \pm 0,107	1,483 \pm 0,091
LVID; d	3,63 \pm 0,128	3,544 \pm 0,112	3,465 \pm 0,227	3,622 \pm 0,174
LVID; s	2,451 \pm 0,164	2,341 \pm 0,106	2,129 \pm 0,263	2,412 \pm 0,186
LVPW; d	0,9271 \pm 0,038	1,107 \pm 0,078	0,9743 \pm 0,072	0,9507 \pm 0,075
LVPW; s	1,336 \pm 0,063	1,414 \pm 0,075	1,281 \pm 0,126	1,434 \pm 0,056
Massa do VE corrigida	91,96 \pm 7,877	86,18 \pm 3,151	94,22 \pm 6,927	93,39 \pm 5,921

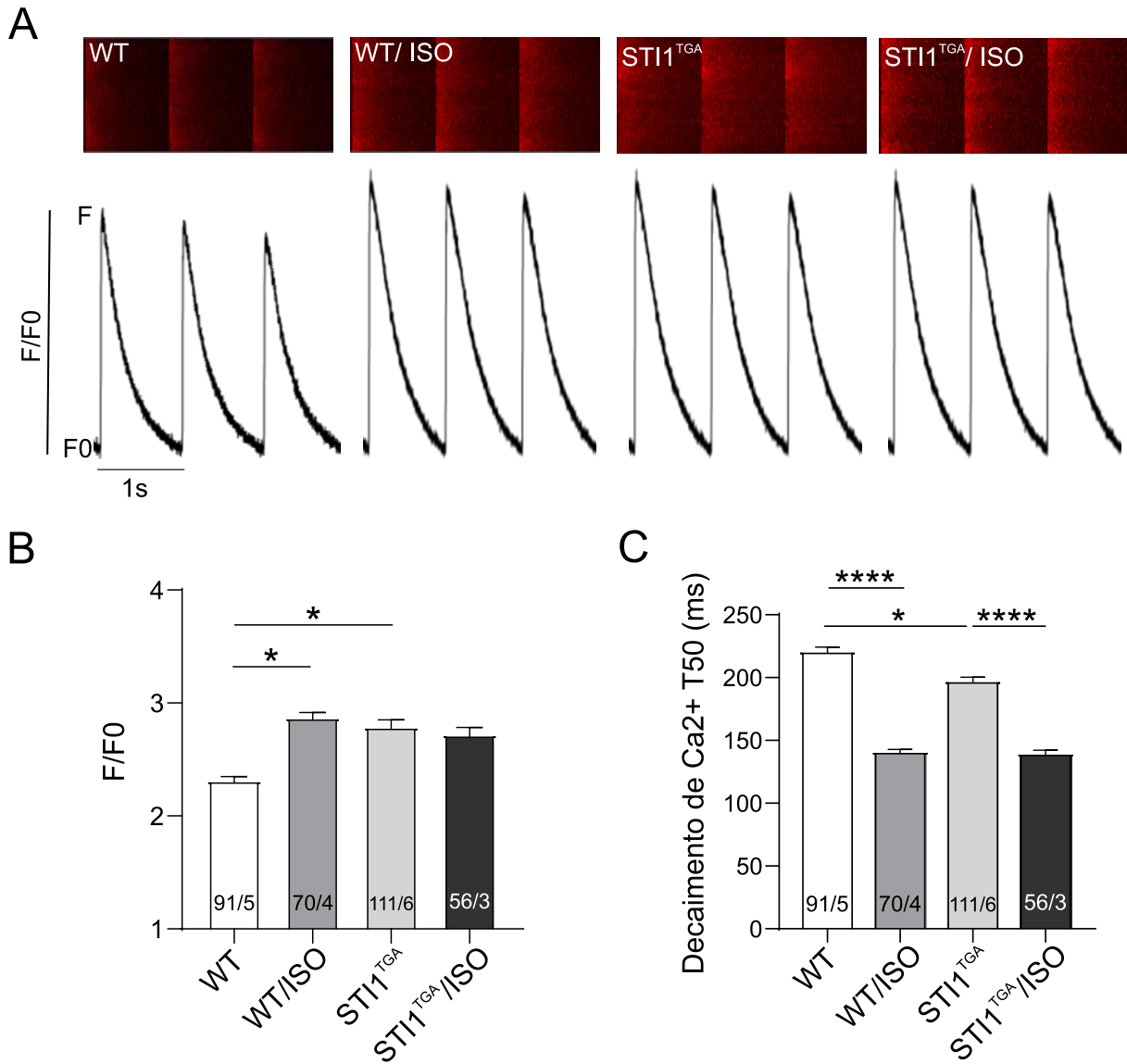
Levando em consideração que a função contrátil de CMs ventriculares de camundongos STI1-TgA mostrou-se aumentada a nível basal e que o tratamento com ISO é conhecido por induzir alterações na contratilidade de CMs, investigamos se o tratamento com ISO conduziria a alterações na contratilidade de CMs. Como observado na Figura 31, o ISO induziu o aumento da fração de encurtamento no grupo WT/ISO, no entanto, não alterou a fração de encurtamento em animais STI1-TgA/ISO, que mostrou função contrátil semelhante ao seu controle STI1-TgA basal. Esse dado indica que animais STI1-TgA, além de apresentarem maior contratilidade basal, aparentemente não sofrem indução de aumento de resposta contrátil pelo ISO.

Figura 30 - Tratamento com ISO não altera a contratilidade de cardiomiócitos em camundongos STI1-TgA. A função contrátil de cardiomiócitos não é alterada pelo tratamento com ISO em animais STI1-Tg. A fração de encurtamento de cardiomiócitos isolados é aumentada em animais WT após tratamento com ISO, no entanto, não sofre alteração em camundongos que superexpressam a STI1 tratados com ISO. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (n= número de células/número de animais). *= $p < 0,05$.



Ao observarmos alterações na contratilidade de CMs em resposta ao ISO em animais WT que não foi observada em animais STI1-TgA, partimos para avaliar a dinâmica de Ca^{2+} em CMs e seu papel na função contrátil que pudesse explicar a resposta contrátil ao ISO. Como esperado, o ISO induziu aumento no pico do transiente de Ca^{2+} (F/F_0) em camundongos WT, o que não ocorreu em animais STI1-TgA que já possuem níveis elevados de Ca^{2+} a nível basal e assim permaneceram (Figura 32A e B). Quando avaliamos o tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} no T50, animais WT apresentaram uma redução no tempo de recaptção de Ca^{2+} que curiosamente também foi observada em CMs de camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO (Figura 32C). Assim, nos indicando uma melhorada recaptção de Ca^{2+} em animais WT e STI1-TgA em resposta ao ISO.

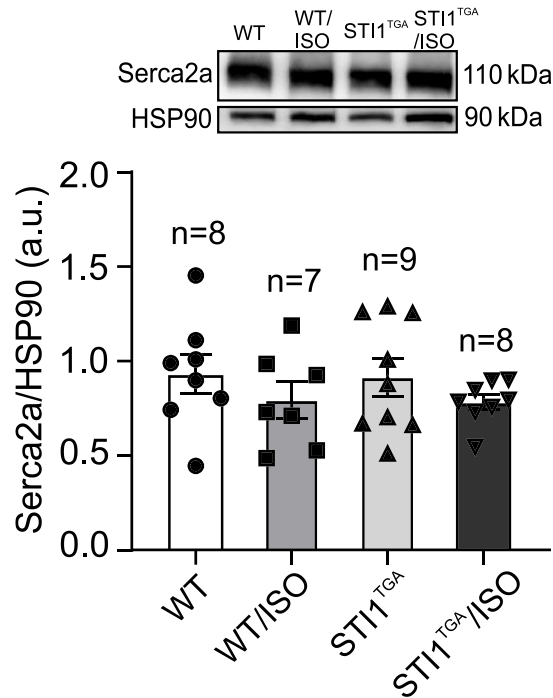
Figura 31 - ISO induz redução no tempo de recaptção de Ca^{2+} em cardiomiócitos de camundongos STI1-TgA. A) Imagens representativas de cardiomiócitos marcados com a sonda fluorescente sensível ao Ca^{2+} Fluo 4-AM. B) Pico do transiente de Ca^{2+} é aumentado apenas em cardiomiócitos de camundongos WT em resposta ao ISO. C) Cardiomiócitos de animais WT e STI1-TgA apresentam redução no decaimento do transiente de Ca^{2+} (T50). Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. * = $p < 0,05$. (n = número de células/número de animais).



As proteínas envolvidas no manejo do Ca^{2+} intracelular desempenham um importante papel no acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco. Proteínas como canais de Ca^{2+} do tipo-L, receptores de rianodina (RyR), ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), fosfolamban (PLN) e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) são responsáveis pelo manejo do Ca^{2+} em CMs. A SERCA2a é responsável pela recaptção de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, organela que armazena grande parte do Ca^{2+} responsável pela contração em CMs. Avaliamos por western blotting a expressão proteica da SERCA2a em resposta ao tratamento com ISO. Como observado na Figura 33, não foram encontradas alterações na

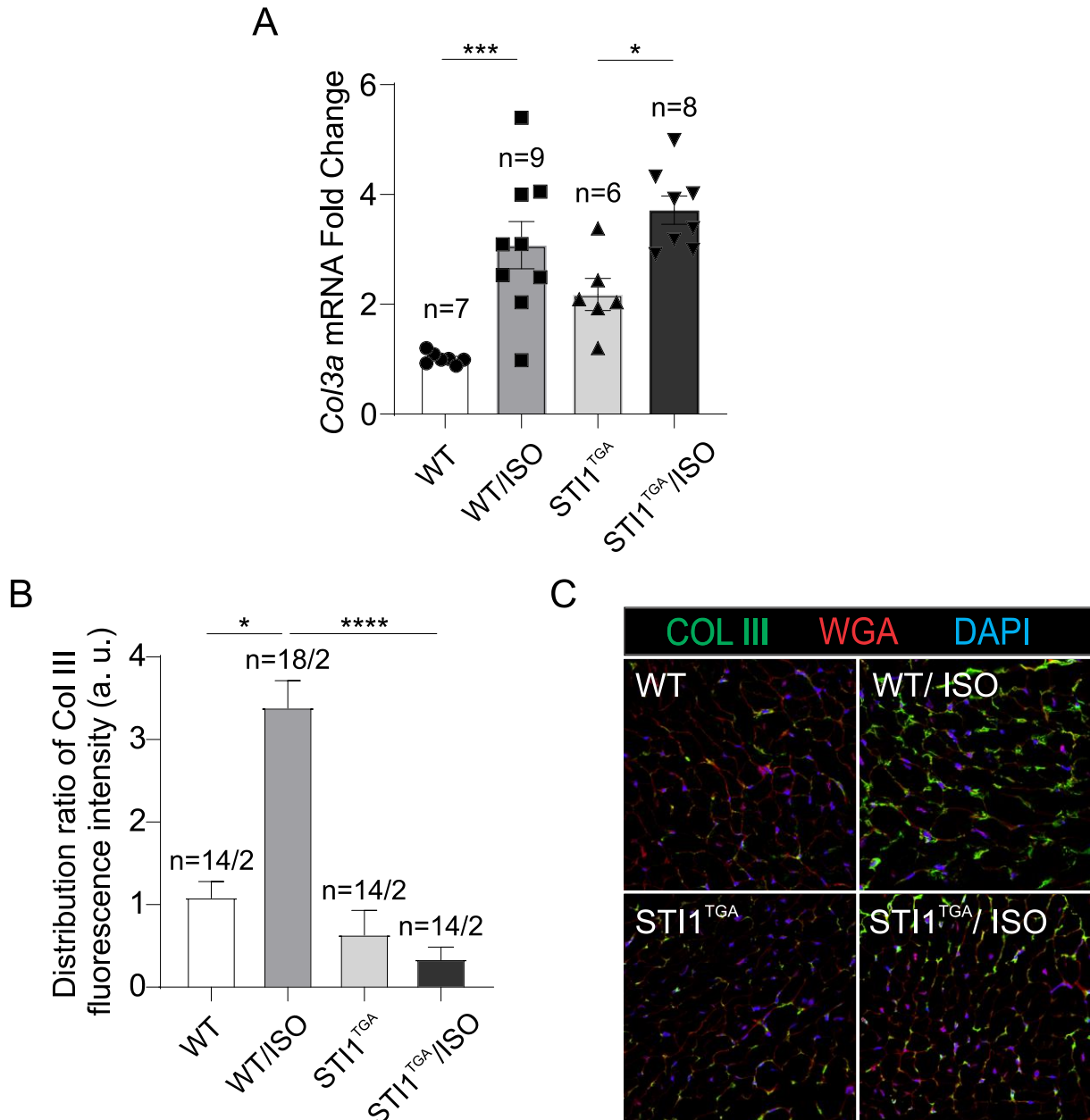
expressão da SERCA2a nos grupos em estudo, indicando que a alteração na receptação do Ca^{2+} observada entre o grupo WT e transgênico, não pode ser explicada por alterações na expressão da SERCA2a.

Figura 32 - A expressão da SERCA2a não é alterada entre os grupos WT e STI1-TgA. A expressão proteica da SERCA2a em resposta ao ISO não é alterada em animais WT e STI1-TgA. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (n= número de animais).



Sabendo que animais com redução na expressão da STI1 apresentam uma maior susceptibilidade a lesão cardíaca induzida por ISO, caracterizada por uma maior deposição de colágeno e níveis aumentados de *Col3a* (gene que codifica para o colágeno do tipo III) no tecido cardíaco, mensuramos os níveis de expressão gênica e proteica do colágeno III no tecido cardíaco de animais WT e STI1-TgA em resposta ao ISO. Como mostrado na Figura 34A, observa-se um aumento nos níveis de mRNA do gene que codifica para o colágeno III (*Col3a*) nos grupos tratados com ISO, WT/ISO e STI1-TgA/ISO. No entanto, a nível de expressão proteica observamos por imunofluorescência que apenas os animais WT/ISO apresentaram um aumento na expressão do colágeno III, o que não ocorreu em animais STI1-TgA/ISO (Figura 34B e C). Como já esperado para o grupo WT/ISO, esse dado valida o nosso modelo de hipertrofia e remodelamento cardíaco induzido por ISO e mostra que a superexpressão da STI1 além de proteger o coração da hipertrofia, também protege da deposição de colágeno e remodelamento cardíaco em camundongos.

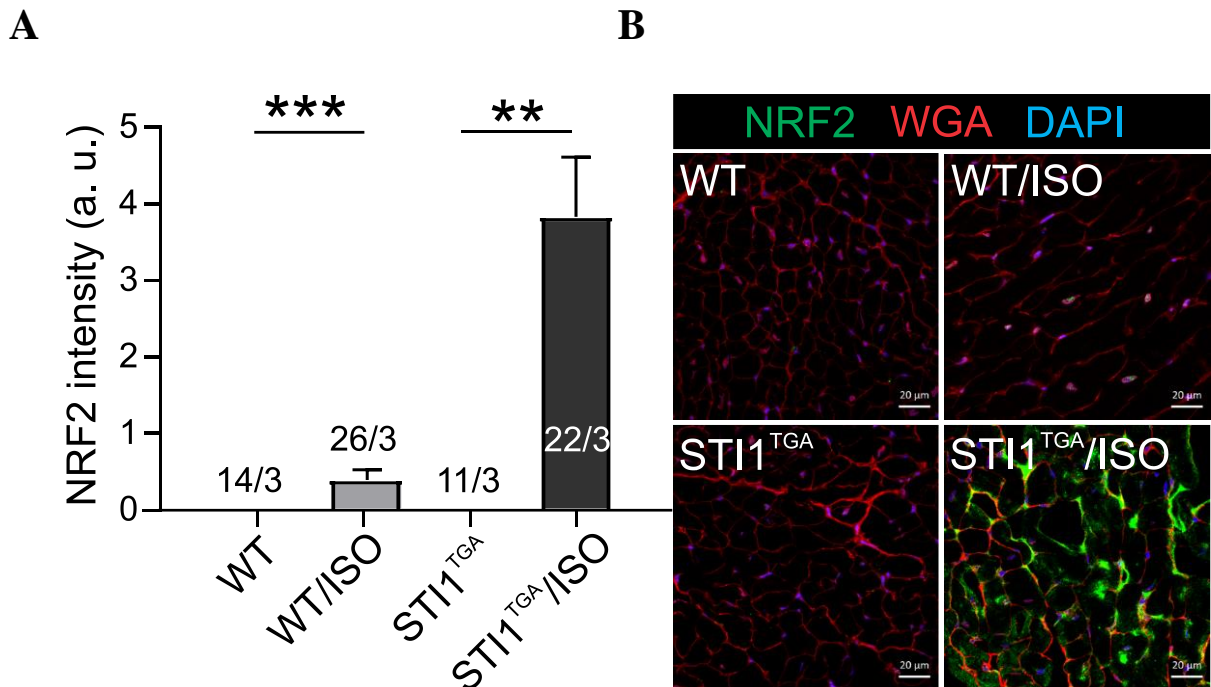
Figura 33 - Animais STI1-TgA são protegidos da deposição de colágeno do tipo III e remodelamento cardíaco induzido por ISO. A) O ISO induz a expressão gênica do *Col3a* em animais WT e STI1-TgA. B) A intensidade da fluorescência do colágeno do tipo III está aumentada em animais selvagens tratados com ISO. C) Imagens representativas de imunofluorescência mostrando o aumento e deposição de colágeno III apenas em animais WT/ISO. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (A: n= número de animais, B: n= número de imagens/número de animais). *= $p < 0,05$.



É bem descrito na literatura que o tratamento crônico com ISO é capaz de induzir estresse oxidativo no coração de camundongos. A resposta antioxidante é essencial para combater o estresse oxidativo e levar a homeostase de ROS. O fator de transcrição NRF2 (Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2), exerce um papel crucial em resposta ao estresse oxidativo por induzir a expressão de diversos genes envolvidos com a resposta antioxidante. Investigamos por imunofluorescência a expressão do NRF2 no coração de camundongos WT e

STI1-TgA tratados com ISO. Interessantemente, observamos que a marcação do NRF2 é aumentada em camundongos WT/ISO e amplificada em camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO, resposta essa que é ~4x maior quando comparado a animais WT/ISO (Figura 35). Portanto, esse dado nos sugere que um dos mecanismos que levam a proteção cardíaca de camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO é a ativação da resposta antioxidante dependente de NRF2.

Figura 34 - A expressão do fator de transcrição NRF2 é amplificada em animais STI1-TgA em resposta ao ISO. A) A intensidade da fluorescência do NRF2 é aumentada ~4x em camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO quando comparado a camundongos WT/ISO. B) Imagens representativas de imunofluorescência mostrando o aumento da expressão do NRF2 em animais WT/ISO, que é ainda maior em animais STI1-TgA/ISO. Os dados são mostrados como média \pm SEM. O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (n= número de imagens/número de animais). *= p<0,05.

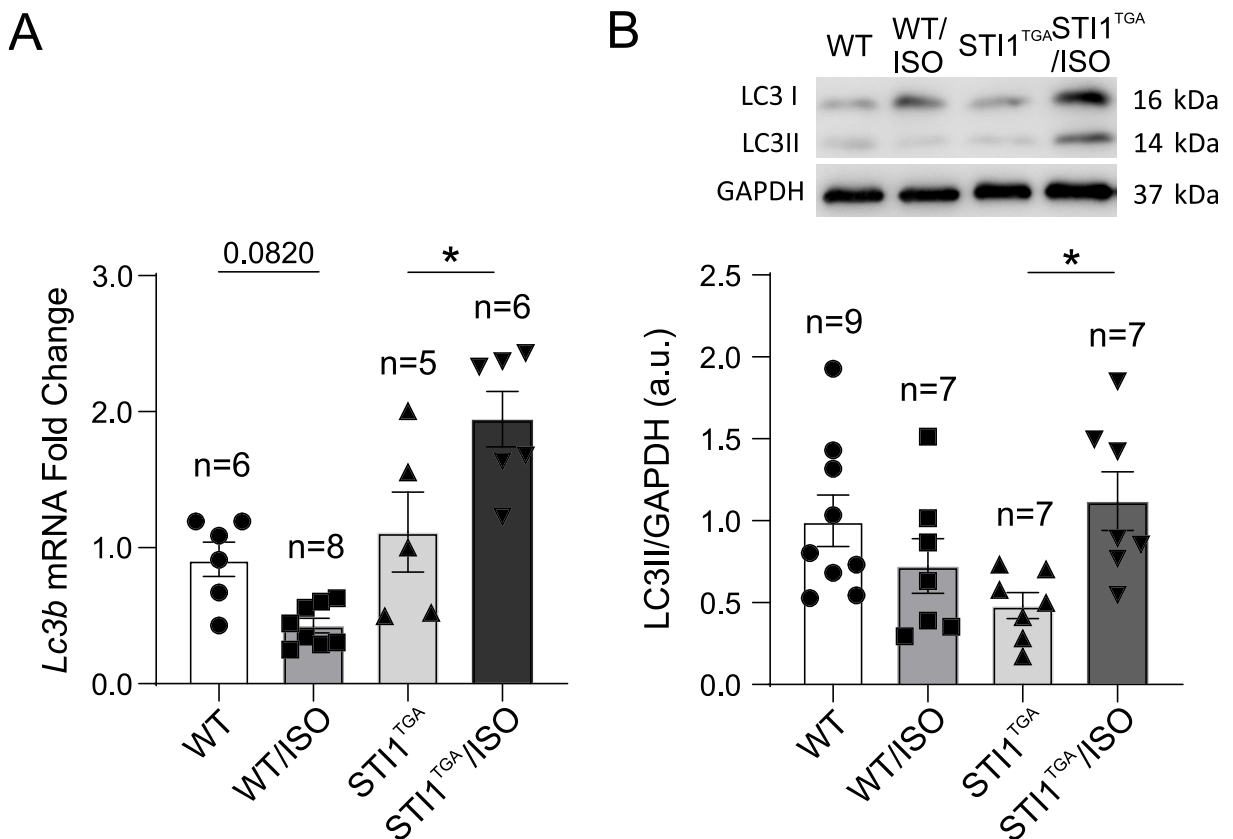


Uma vez que a proteômica indicou aumento dos níveis basais de ubiquitinas no tecido cardíaco de camundongos STI1-TgA, sugerindo um aumento na degradação proteica, resolvemos investigar possíveis alterações induzidas pelo ISO nos processos de degradação proteica, como por exemplo, a autofagia. A autofagia desempenha um importante papel na homeostase e sobrevivência celular. O ISO é conhecido induzir alterações no processo de autofagia no coração, em particular na macroautofagia. A proteína LC3B (*Microtubule-associated protein 1B-light chain 3*) é considerada um importante marcador do processo de autofagia, com aumentados níveis da isoforma LC3II (forma presente na membrana dos autofagossomo) sendo um indicador direto de atividade autofágica. Analisamos a expressão

gênica do *Lc3b* no tecido cardíaco e observamos uma tendência de redução do *Lc3b* no coração de animais WT/ISO quando comparado aos animais WT, enquanto animais STI1-TgA/ISO apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *Lc3b* comparado ao seu controle STI1-TgA (Figura 36 A e B). Assim, esses dados nos indicam que em resposta ao ISO a atividade da autofagia pode estar prejudicada em animais WT e melhorada em camundongos STI1-TgA.

Ao avaliarmos a expressão proteica da isoforma LC3II no coração em resposta ao ISO, não identificamos alterações no grupo WT/ISO comparado ao seu controle WT, no entanto, detectamos um aumento da isoforma LC3II em animais STI1-TgA/ISO quando comparado a animais STI1-TgA (Figura 36C). Assim, esse dado nos sugere que animais STI1-TgA respondem ao ISO melhorando a atividade autofágica, podendo este ser um mecanismo utilizado pelo coração para proteger do estresse hipertrófico via melhora no controle de qualidade de proteínas.

Figura 35 - A atividade autofágica é melhorada em animais STI1-TgA em resposta ao ISO. A) A expressão gênica do *Lc3b* é aumentada em animais STI1-TgA em resposta ao ISO. B) Os níveis de expressão proteica do LC3-II, presente no autofagossomo, são aumentados em animais STI1-TgA em resposta ao ISO. Os dados são mostrados como média \pm SD (A e B). Os dados são mostrados como média \pm SEM (C). O teste one-way ANOVA foi utilizado para comparar os grupos. (n= número de animais). *= $p < 0,05$.



6. DISCUSSÃO

6.1. Camundongos com superexpressão da STI1 apresentam alterações cardíacas que tornam o coração adaptado a possíveis condições de estresse

Até pouco tempo, nada se sabia sobre a expressão e papel da STI1 no coração, e neste contexto nosso grupo de pesquisa é pioneiro em descrever suas funções cardíacas. Além de mostrarmos que sua expressão é reduzida no coração de humanos com insuficiência cardíaca, a STI1 também se mostrou essencial na resposta ao estresse cardíaco patológico induzido por ISO em modelos murinos com redução da STI1 (STI1^{+/-} e Δ TPR) (NOGUEIRA, 2020), fato esse que se dá por alterações em diversas vias de sinalização envolvidas com a síntese proteica e estresse oxidativo (dados prévios do nosso grupo de pesquisa ainda não publicados). Sabendo-se disso, nos propomos em avaliar se a superexpressão da STI1 exerceria um papel protetor no coração de camundongos nos contextos fisiológico e patológico.

A nível basal, inicialmente validamos o nosso modelo de superexpressão da STI1, confirmando o aumento da expressão gênica e proteica da STI1 no coração de camundongos STI1-TgA (Figura 13). Quando analisamos a expressão proteica da STI1 no coração, foi possível observar um aumento de quatro vezes em animais STI1-TgA semelhante ao que é observado no cérebro desses camundongos quando comparado a camundongos WT (BERALDO *et al.*, 2013). Também avaliamos a localização celular da STI1, que é reportada em vários tipos celulares na membrana plasmática, citoplasma e núcleo, bem como, também foi demonstrada secretada e exercendo funções extracelulares (LASSLE *et al.* 1997; ZANATA *et al.*, 2002; WANG *et al.* 2010, 2017; TSAI *et al.* 2012). Como demonstramos, no tecido cardíaco e em CMs isolados, ficou evidente o aumento da expressão da STI1 no modelo transgênico, com localização predominantemente perimembranar/sarcolema (Figura 14), o que já era esperado, como visto por Nogueira (2020) em CMs de camundongos selvagens e diferente do que foi demonstrado por BERALDO *et al.* 2010 & 2013 em neurônios, onde a STI1 se apresenta com localização citoplasmática. Curiosamente, essa localização perimembranar em CMs nos faz refletir sobre o papel da STI1 nessa localização celular e se ela pode de alguma forma ser secretada por CMs para exercer funções extracelulares.

Já é conhecido que a STI1 interage fisicamente com a maquinaria das chaperonas HSP70/HSP90. Mais especificamente, a ligação à HSP90 atua regulando alterações

conformacionais da STI1 que modulam a ligação aos sítios da HSP70 e levando a uma consequente eficiência na transferência e ativação de proteínas clientes (ROHL *et al.*, 2015). Embora no cérebro a superexpressão da STI1 afete a maquinaria das chaperonas de animais STI1-TgA, conduzindo a um aumento na expressão da HSP90 e diminuição na expressão da HSP70 (BERALDO *et al.*, 2015), no coração ela não altera a modulação dessas chaperonas a nível basal (Figura 15), resultado esse que também é observado em camundongos STI1^{+/-} (NOGUEIRA, 2020).

Embora a análise morfológica do tamanho do coração e hipertrofia de CMs em camundongos STI1-TgA na fase adulta não tenha mostrado alterações no desenvolvimento cardíaco, interessante observamos que animais STI1-TgA apresentam uma melhora na função contrátil a nível basal, que ocorre devido a alterações no manuseio de Ca²⁺ intracelular. Embora esses animais não apresentem alterações em parâmetros morfológicos (Tabelas 5), do ponto de vista fisiológico, essa aumentada função contrátil de CMs parece se assemelhar a adaptações cardíacas que ocorrem na hipertrofia fisiológica induzida por exercício físico e gravidez. Nessas condições, a aumentada contratilidade de CMs leva a uma melhorada função sistólica que ocorre de forma adaptativa para aumentar a eficiência de bombeamento sanguíneo. Juntos, esses dados nos fazem refletir se o coração de camundongos STI1-TgA poderia apresentar adaptações cardíacas que o torna mais preparado para responder a estímulos de estresses fisiopatológicos.

Com o intuito de identificar alterações no proteoma cardíaco de animais STI1-TgA que pudessem elucidar proteínas e vias de sinalização envolvidas com adaptações cardíacas, realizamos experimentos de espectrometria de massa no coração de animais WT e STI1-TgA, e submetemos a análises proteômicas. A análise da abundância relativa das proteínas confirmou mais uma vez a superexpressão da STI1 no coração de camundongos STI1-TgA corrobora a expressão gênica e proteica já demonstrada neste estudo e validando o nosso ensaio proteômico.

Além da STI1, identificamos diversas proteínas reguladas positivamente, dentre elas a proteína de ligação a LMNA muscular (*Mlip*) (também conhecida como MLIP, CIP, C6orf142, e *Muscle-enriched A-type Lamin-interacting Protein*). MLIP exerce papel importante na adaptação cardíaca ao estresse regulando negativamente a hipertrofia cardíaca (CATTIN *et al.*, 2015). Neste estudo, foi demonstrado que a deleção desse gene causava um prejuízo na capacidade de adaptação ao estresse cardíaco induzido por ISO (CATTIN *et al.*, 2015). Além disso, Huang *et al.* (2012) reportaram que a superexpressão da CIP, em cardiomiócitos por adenovírus, atenuou a hipertrofia de cardiomiócitos neonatais induzida pelo agonista fenilefrina, sugerindo que CIP regula negativamente a hipertrofia de cardiomiócitos. Estes

dados indicam um papel crucial dessa proteína no contexto da adaptação cardíaca, o que nos faz refletir se a superexpressão da STI1 à nível basal pode estar de alguma forma atuando como uma molécula de adaptação cardíaca em conjunto com MLIP.

A proteína deglicase DJ-1 (*Park7*) foi encontrada aumentada no proteoma cardíaco de animais STI1-TgA (Figura 22). No coração, *Park7* se mostrou importante na cardioproteção em resposta ao estresse oxidativo, desempenhando função antioxidante, e protegeu da morte celular induzida por isquemia reperfusão, prevenindo a disfunção mitocondrial (BILLIA *et al.*, 2013; DONGWORTH *et al.*, 2014). Billia *et al.* (2013) descreveram o papel do gene *Park7* no coração, onde foi reportado altamente expresso no tecido cardíaco normal e tem sua expressão reduzida no estágio final da IC em humanos. Em camundongos deficientes em DJ-1 que sofreram estresse oxidativo induzido por TAC (constrição aórtica transversa) eles observaram uma exacerbada hipertrofia cardíaca, acompanhada por diminuição na densidade capilar dependente de p53, aumento na oxidação de DNA e apoptose de CMs. Interessantemente, camundongos com deficiência da STI1 (STI1^{+/-}) além de sofrerem hipertrofia e remodelamento cardíaco grave em resposta ao ISO, que também é caracterizado por uma aumentada morte de CMs (NOGUEIRA, 2020), também apresentam alterações em vias de sinalização envolvidas com o estresse oxidativo e uma resposta antioxidante prejudicada. Esses dados nos sugerem que o aumento na expressão da STI1 em camundongos STI1-TgA, junto com DJ-1 possa talvez exercer um papel cardioprotetor na resposta antioxidante e morte celular.

Dentre as proteínas negativamente reguladas foi encontrada a proteína quinase dependente de Ca²⁺-calmodulina II - CaMKII (*Camk2a*), proteína esta que desempenha um papel fisiopatológico relevante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Ela pode estar envolvida com a morte celular, inflamação, distúrbios no acoplamento excitação contração e excitação transcrição, que podem levar ao desenvolvimento da disfunção cardíaca (WEINREUTER *et al.*, 2014; MATTIAZZI *et al.*, 2015). O aumento na expressão e ativação da CaMKII foi demonstrado na IC, desempenhando efeito deletério no coração, quando excessivamente ativada promove hipertrofia cardíaca (ZHANG *et al.*, 2003), e além disso, sua inibição foi reportada proteger o coração da necrose e apoptose em modelo de lesão por isquemia-reperfusão (VILA-PETROFF *et al.*, 2007). Desse modo, a redução na expressão da CaMKII em camundongos STI1-TgA pode nos sugerir um possível papel protetor cardíaco.

A análise de predição das vias alteradas em animais STI1-TgA pelo IPA Analysis mostrou alterações em vias relacionadas a homeostase proteica, como vias de síntese, controle de qualidade e degradação proteica. Em análise proteômica realizada em estudo prévio por nosso grupo de pesquisa em animais STI1^{+/-} tratados com ISO, foram preditas regulações em

vias de sinalização relacionadas a síntese proteica, indicando um papel importante da STI1 na resposta ao estresse cardíaco hipertrófico que foi confirmada pela deficiência na hipertrofia de CMs em animais STI1^{+/-}/ISO. Embora animais STI1-TgA apresentem desenvolvimento cardíaco basal normal, proteínas envolvidas na síntese (proteínas do metabolismo de RNA: *Rps16*, *Ppl4*, *Ppl13*, *Rbmx*) e degradação proteica (proteínas da ubiquitinação: *Ubb* e *Ubc*) têm seus níveis aumentados (Tabela 3), o que pode nos indicar um preparo nessas maquinarias para uma melhor resposta à indução hipertrófica.

A análise IPA também nos indicou alterações nas vias de sinalização da PI3K, NFKB e sobrevivência celular no coração de camundongos STI1-TgA (Figura 23). A via de sinalização da PI3K/AKT é uma via clássica conhecida por induzir sinais de sobrevivência celular e crescimento em cardiomiócitos (ABEYRATHNA e SU, 2015; GHAFOURI-FARD *et al.*, 2022). A curto prazo a ativação e sinalização da AKT estimula o crescimento fisiológico do coração (SHIOJIMA e WALSH, 2006), pensando nisso e no fato de que a AKT é uma proteína cliente da STI1, analisamos a expressão da AKT e ativação via fosforilação no sítio Ser473. Observamos uma redução na expressão da AKT que é compensada pela maior fosforilação no sítio Ser473 (Figura 24), logo, nos indicando que a via de sinalização da AKT está mais ativa no coração de animais STI1-TgA a nível basal e pode estar envolvida com a sobrevivência celular predita pela análise proteômica.

Ao caracterizarmos a nível basal o coração de camundongos STI1-TgA nossos dados nos levam a crer que a superexpressão da STI1 conduz a alterações cardíacas que tornam o coração adaptado a possíveis condições de estresse.

6.2. Camundongos com superexpressão da STI1 são protegidos da hipertrofia e remodelamento patológico induzido por isoproterenol

Sendo a STI1 uma proteína induzida por estresse e tendo seu papel em resposta ao estresse cardíaco inicialmente descrito em linhagens com redução na sua expressão, avaliamos a indução e localização da STI1 em resposta ao ISO em camundongos STI1-TgA. Embora Nogueira (2020) tenha demonstrado que o ISO induz o aumento na expressão da STI1 no coração de camundongos WT, o mesmo não foi observado nos camundongos WT da linhagem STI1-TgA. Isso provavelmente ocorreu devido uma heterogeneidade encontrada dentro do grupo WT/ISO, que fez os dados de expressão proteica não apresentarem diferença estatística

(Figura 25). A localização da STI1 no tecido cardíaco em resposta ao ISO se mostrou mais dispersa no citoplasma, nos indicando que algum fenômeno pode estar ocorrendo por recrutamento da STI1 e sua internalização para o citosol em resposta ao ISO. BERALDO *et al.* 2010 & 2013 mostraram em neurônios que a STI1 se apresenta com localização citoplasmática e aumenta em condições de estresse, além disso, outros estudos demonstram a secreção da STI1 em vários tipos celulares (FONSECA *et al.* 2012; BERALDO *et al.*, 2013; HAJJ *et al.* 2013), no entanto, no coração essa função ainda é desconhecida e precisa ser melhor investigada.

Ao induzirmos a hipertrofia e remodelamento patológico pelo modelo de tratamento crônico de 7 dias com ISO (20mg/kg/dia), nós observamos que o ISO não foi capaz de induzir hipertrofia em camundongos STI1-TgA, que foi caracterizada também pela ausência de aumento da área de secção transversal de CMs (Figura 27). Embora os animais STI1-TgA não apresentem uma hipertrofia estatisticamente significativa em resposta ao ISO, foi observado um ligeiro aumento de ~16% na razão HW/TL, que deve ser levado em consideração (STI1-TgA: ~16% - $p < 0,07$). Em conjunto com outros dados, esse aumento moderado nos faz acreditar que a hiperestimulação β -adrenérgica se faz presente, mas não é patológica para camundongos STI1-TgA.

A reexpressão de genes do programa fetal é amplamente utilizada como um marcador de estresse cardíaco induzido por hipertrofia cardíaca em resposta ao ISO. Além da hipertrofia do coração e de CMs, o aumento da expressão gênica do ANP e β -MHC em camundongos WT/ISO confirma a indução de hipertrofia patológica já conhecida para esse modelo de hiperestimulação β -adrenérgica (Figura 28). Em adição, a maior expressão do fator de transcrição NFAT em animais WT/ISO corrobora com a indução da expressão de genes pró-hipertrofos (WILKINS e MOLKENTIN, 2004). Todos esses fenômenos não ocorreram em camundongos STI1-TgA, fenômenos esses que não alteram na hipertrofia fisiológica que acontece em resposta ao exercício físico e gravidez, por exemplo, (WILKINS *et al.*, 2004). Considerando que camundongos STI1-TgA parecem ser adaptados e possuem um moderado aumento no tamanho do coração em resposta ao ISO, poderiam esses animais sofrerem hipertrofia fisiológica?

Afim de elucidar possíveis alterações morfológicas e funcionais no coração de animais WT e STI1-TgA em resposta ao ISO realizamos análises de ecocardiografia, contratilidade de CMs e análises moleculares. Como esperado para o tratamento crônico de 7 dias com ISO, na dose de 20mg/kg/dia, animais WT apresentaram uma tendência de aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (Tabela 5). Esse dado corrobora a hipertrofia observada em animais WT/ISO, nos indicando uma adaptação para aumento da força de contração

ventricular esquerda. Ao analisarmos a contratilidade de CMs, observamos um aumento na fração de encurtamento, que foi justificado pela maior quantidade de Ca^{2+} intracelular presente na contração, bem como, um menor tempo de recaptação observados nos experimentos de transiente de Ca^{2+} (Figuras 30 e 31). Para animais WT isso indica que o aumento da contratilidade induzido pelo ISO desencadeia uma resposta inicialmente adaptativa do coração ao estímulo β -adrenérgico. Resposta esta que é conhecida ocorrer na fase adaptativa da hipertrofia patológica.

Em animais STI1-TgA não observamos alterações morfológicas em resposta ao ISO. Interessantemente, a nível basal camundongos STI1-TgA apresentam uma contratilidade de CMs e transiente de Ca^{2+} aumentados, indicando que esses camundongos já apresentam uma adaptação cardíaca fisiológica (Figura 30). Em resposta ao estímulo β -adrenérgico, embora a contratilidade e o transiente de Ca^{2+} não sejam alterados, permanecendo a níveis basais, o tempo de recaptação de Ca^{2+} é reduzido, indicando uma maior eficiência contrátil (Figura 30 e 31C). Logo, sugerimos que camundongos STI1-TgA também apresentam uma resposta adaptativa fisiológica após estimulação adrenérgica, que pode ser benéfica para o coração.

Com o intuito de entender essas alterações no manejo do Ca^{2+} intracelular, analisamos a expressão da SERCA2a, proteína esta que tem papel relevante na recaptação de cerca de 80% do Ca^{2+} para o RS durante o relaxamento de CMs em camundongos (BERS, 2002). Não observamos alterações na expressão da SERCA2a nos grupos estudados (Figura 32), indicando que as alterações na recaptação do Ca^{2+} não são dependentes da expressão dessa proteína. No entanto, a SERCA2a tem sua atividade regulada pela proteína PLN via inibição direta, que uma vez fosforilada, a PLN deixa de inibir a SERCA2a permitindo uma maior atividade de recaptação de Ca^{2+} para o RS (KOSS e KRANIAS, 1996). Essa modulação ocorre via fosforilação dos seus principais sítios de ativação, Ser16 e Thr17 da PLN, que é um mecanismo conhecido por ser induzido pelo ISO (WEGENER *et al.*, 1989; TALOSI *et al.*, 1993), porém, ainda não sabemos se esse mecanismo ocorre em resposta ao ISO em animais STI1-TgA a nível basal. Além disso, também é conhecido que um importante determinante de aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em CMs em resposta ao ISO é a regulação da liberação de Ca^{2+} via RyR, que uma vez fosforilados, liberam grande quantidade de Ca^{2+} dos estoques do RS, que é responsável pela contração celular ou pelo vazamento de Ca^{2+} envolvidos em atividades arritmicas (GINSBURG e BERS, 2008). Também não sabemos qual o mecanismo que aumenta os níveis de Ca^{2+} em resposta ao ISO em camundongos STI1-TgA a nível basal. Assim, se faz importante investigar o mecanismo pelo qual esse aumento no transiente, bem como, na recaptação de Ca^{2+} ocorrem e quais as vias de sinalização que levam a essa melhorada função contrátil de CMs.

O remodelamento cardíaco é um processo exaustivamente caracterizado em resposta ao ISO em camundongos. Um dos principais marcadores de remodelamento cardíaco é a presença de fibrose no tecido cardíaco, devido a um aumento na síntese e deposição de fibras de colágeno, assim como, outras proteínas da matriz extracelular, como fibronectina e laminina (OSADCHIL, 2007). Os colágenos do tipo I e III são os principais marcadores de deposição de colágeno no miocárdio por serem os tipos mais expressos na matriz extracelular (JALIL *et al.*, 1989). Quando avaliamos o remodelamento cardíaco pela expressão proteica do colágeno III no tecido cardíaco, ficou evidente que apenas camundongos WT/ISO apresentaram uma aumentada deposição de colágeno III em regiões intersticiais (Figura 33), sendo este um indicativo de fibrose reativa. Uma vez que camundongos STI1-TgA não apresentaram níveis proteicos aumentados de colágeno III, esse resultado nos sugere que a superexpressão da STI1 também pode proteger o coração do remodelamento patológico induzido por ISO.

Sabendo que camundongos STI1-TgA possuem uma expressão basal de DJ-1 aumentada no coração, que já é conhecida desempenhar um papel antioxidante em resposta a indução de estresse oxidativo, e sabendo que o ISO conduz ao estresse oxidativo em camundongos, nos questionamos se a superexpressão da STI1 poderia exercer um papel antioxidante em resposta ao estresse induzido por ISO. Em análise proteômica realizada em camundongos STI1^{+/-} por nosso grupo de pesquisa, observamos que a deficiência da STI1 torna esses animais susceptíveis ao estresse oxidativo e desencadeiam uma resposta antioxidante prejudicada no coração, que ocorre via sinalização do fator de transcrição NRF2. Quando avaliamos a ativação dessa via de sinalização no coração de camundongos STI1-TgA em resposta ao ISO, ficou evidente que esses animais possuem uma resposta antioxidante melhorada (Figura 34). Desse modo, considerando que animais com redução na expressão de STI1, apresentam redução do NRF2 em resposta ao ISO e animais com superexpressão, respondem de forma oposta, podemos concluir com elevado grau de certeza que existe uma relação muito estreita entre a STI1 e o NRF2. Estes dados corroboram mais uma vez a ideia de que a superexpressão da STI1 pode exercer um papel cardioprotetor via função antioxidante.

A HC está relacionada ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, agregação proteica e acúmulo de organelas danificadas que precisam ser eliminadas para manter a homeostase celular (RANEK *et al.*, 2017). A degradação via autofagia tem papel importante por antagonizar os efeitos da hipertrofia cardíaca ao realizar o *clearance* de proteínas e organelas em CMs. Além disso, a autofagia também atua como uma via de sobrevivência em resposta ao estresse oxidativo (GYONGYOSI *et al.*, 2019). Embora haja uma certa controvérsia sobre o papel da autofagia nas DCVs, alguns estudos mostram que o aumento na atividade autofágica induzida

pelo ISO contribui para a patologia cardíaca (CHEN *et al.*, 2020), enquanto que outros estudos relatam que sua atividade prejudicada leva a progressão da resposta patológica e disfunção cardíaca (PFEIFER *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 2015; WANG e CUI, 2017). Em adição, a autofagia já foi demonstrada ter seus níveis aumentados de maneira dose-dependente pelo tratamento com ISO (GYONGYOSI *et al.*, 2019). Em contramão, outros trabalhos demonstram o papel cardioprotetor da autofagia em resposta a indução hipertrófica e remodelamento cardíaco. A redução da atividade autofágica foi observada em CMs de ratos imunizados com autoanticorpos anti receptores β_1 -adrenérgicos, induzindo morte de CMs e disfunção cardíaca (WANG *et al.*, 2015). Enquanto que o aumento da atividade da autofagia em condições de estresse foi mostrada exercer um papel crucial na proteção cardíaca. Na HC induzida por sobrecarga de pressão e após IM em estágios agudos, subagudos e crônicos, a ativação da autofagia protegeu da progressão e remodelamento cardíaco (BUSS *et al.* 2009; KANAMORI *et al.* 2011; NAKAI *et al.* 2007; ZHU *et al.* 2007)

Ao avaliarmos a expressão do marcador de autofagia LC3B, observamos que em resposta ao ISO na dose estudada a autofagia parece estar prejudicada em camundongos WT, diferente do que ocorre em camundongos STI1-TgA, que apresentam uma atividade autofágica aumentada pela maior expressão da isoforma LC3-II (Figura 35). Esse dado indica que em resposta a indução hipertrófica o controle de qualidade de proteínas é mais eficiente em camundongos STI1-TgA. A provável redução da atividade autofágica em camundongos WT se assemelha ao que já foi observado na HC induzida por TAC em camundongos. Uma semana após TAC, em animais com função cardíaca preservada, a atividade autofágica foi suprimida, sugerindo que a autofagia é reduzida durante a resposta hipertrófica compensatória (NAKAI *et al.*, 2007). Como apresentado em nosso conjunto de dados, os animais WT parecem responder de forma compensatória ao ISO, o que nos indica que esses animais podem apresentar um acúmulo de macromoléculas danificadas que podem induzir a morte celular e disfunção cardíaca a longo prazo. Alguns estudos demonstraram o papel de co-chaperonas, como BAG-1 e BAG-3, na sobrevivência celular por inibirem a apoptose e induzirem autofagia como mecanismo cardioprotetor em resposta a estresses patológicos (TOWNSEND *et al.*, 2004; GURUSAMY *et al.*, 2009). Na hipertrofia fisiológica, o aumento no controle de qualidade de proteínas desempenha um papel crucial (NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018), desse modo, o aumento da autofagia em animais STI1-TgA aponta um outro mecanismo cardioprotetor de adaptação fisiológica pela superexpressão da STI1.

Em conjunto, nossos dados mostram que camundongos STI1-TgA apresentam uma adaptação cardíaca basal que além de manter a homeostase cardíaca, protege o coração dos

efeitos da hiperativação β -adrenérgica induzida por isoproterenol. Em resposta ao estresse cardíaco induzido por ISO, ficaram evidentes alterações adaptativas fisiológicas que nos fazem crer que esses animais sofrem hipertrofia fisiológica. Essa hipertrofia fisiológica é caracterizada por um aumento moderado no tamanho do coração, melhora na função contrátil de CMs, ausência de fibrose, resposta antioxidante melhorada e controle de qualidade de proteínas por autofagia mais eficiente. Em suma, o presente estudo foi capaz de atribuir um papel cardioprotetor à superexpressão da STI1, na prevenção da hipertrofia e remodelamento cardíaco patológico induzido por isoproterenol.

7. CONCLUSÃO

Frente aos resultados apresentados, concluímos que a superexpressão da STI1 em camundongos tem ação cardioprotetora, desempenhando papel na adaptação cardíaca fisiológica que protege o coração da indução da hipertrofia e remodelamento patológico causado pela hiperativação adrenérgica. Estes achados *in vivo* abrem caminhos para outros estudos que possam avaliar os mecanismos de proteção, bem como, as vias de sinalização que conduzem a proteção cardíaca. Este trabalho enfatiza o papel protetor das co-chaperonas e mostra pela primeira vez este dado no coração, indicando a STI1 como uma nova molécula com potencial terapêutico para o tratamento de doenças cardíacas que induzem hipertrofia e insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIAS

- ABEYRATHNA, P.; SU, Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. **Vascul Pharmacol.** 74:38-48, maio. 2015.
- AMERICO, T. A.; CHIARINI, L. B.; LINDEN, R. Signaling induced by hop/ STI1 depends on endocytosis. **Biochem Biophys Res Commun.** 358:620–625, 2007.
- ARNDT, V. *et al.* Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. **Curr Biol.** 20:143–148, 2010.
- ARRUDA-CARVALHO, M. *et al.* Hop/STI1 modulates retinal proliferation and cell death independent of PrPC. **Biochem Biophys Res Commun**, in press. 2007.
- BAEHRECKE, E.H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 6, 505–510, 2005.
- BAKER, A. J. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. **Pflugers Arch.** 466:1139–50, 2014.
- BALLIGAND, J. L. Beta3-adrenoreceptors in cardiovascular diseases: new roles for an “old” receptor. **Curr Drug Deliv.** 10:64–6, 2013.
- BERALDO, F. H. *et al.* Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. **J. Biol. Chem.** 285, 36542–36550. 2010.
- BERALDO, F. H. *et al.* Stressinducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB J.** 27, 3594–3607, 2013.
- BERALDO, F. H. *et al.* Hyperactivity and attention deficits in mice with decreased levels of stress-inducible phosphoprotein 1 (STIP1). **Disease Models and Mechanisms.** 8(11):1457–66, 2015.
- BERNARDO, B. C. *et al.* Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & Therapeutics.** 128:191–227, 2010.
- BERNARDO, B. C. *et al.* HSP70: therapeutic potential in acute and chronic cardiac disease settings. **Future Med. Chem.** 8, 2177–2183, 2016.
- BERS, D. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature.** 415, 198–205, 2002.
- BILLIA, F. *et al.* Parkinson-susceptibility gene DJ-1/PARK7 protects the murine heart from oxidative damage in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA.** 110(15):6085-90, abr. 2013.
- BLATCH, G. L. *et al.* Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene.** 194:277–282, 1997.

BOGOYEVITCH, M. A.; GLENNON, P. E.; SUGDEN, P. H. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. **FEBS Journal**, v. 317, n. 3, p. 271–275, 1993.

BORLAUG, B. A. Evaluation and management of heart failure with preserved ejection fraction. **Nat Rev Cardiol**. 17, 559–573, 2020.

BRAUNSTEIN, J. B. *et al.* Noncardiac comorbidity increases preventable hospitalizations and mortality among medicare beneficiaries with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**. 42:1226–1233, 2003.

BRISTOW, M. R. *et al.* Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. **Circ Res**. 59(3):297-309, set. 1986.

BROUET, A. *et al.* Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxidizer-mediated effects of statins. **Circ. Res**. 89, 866–873, 2001.

BUENO, O. F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **The EMBO**, v. 19, n. 23, p. 6341–6350, 2000.

BUSS, S. J. *et al.* Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**. 54, 2435–2446, 2009.

CAETANO, F.A. *et al.* Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. **J. Neurosci**. 28:6691–6702, 2008.

CARRIGAN, P. E. *et al.* Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. **J. Biol. Chem**. 279, 16185–16193, 2004.

CATTIN, M. E. *et al.* Deletion of MLIP (muscle-enriched A-type lamin-interacting protein) leads to cardiac hyperactivation of Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) and impaired cardiac adaptation. **J Biol Chem**. 30;290(44):26699-714, out. 2015.

CHANG, J. *et al.* Activation of the heat shock response: relationship to energy metabolites. A (31)P NMR study in rat hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. 280, H426–H433, 2001.

CHIARINI, L. B. *et al.* Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J**. 21:3317–3326, 2002.

CLERK, A. *et al.* Differential Activation of Protein Kinase C Isoforms by Endothelin-1 and Phenylephrine and Subsequent Stimulation of Mitogen-activated Protein Kinases in Ventricular Myocytes Cultured from Neonatal Rat Hearts *. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 52, p. 32848–32857, 1994.

DA FONSECA, A. C. C. *et al.* The multiple functions of the co-chaperone stress inducible protein 1. **Cytokine Growth Factor Rev**. 57:73-84, fev. 2021.

- DAMMRICH, J. & PFEIFER, U. Cardiac hypertrophy in rats after supra-avalvular aortic constriction. II. Inhibition of cellular autophagy in hypertrophying cardiomyocytes. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 43, 287–307, 1983.
- DATTA, R. et al. Myocyte-derived Hsp90 modulates collagen upregulation via biphasic activation of STAT-3 in fibroblasts during cardiac hypertrophy. *Mol. Cell Biol.* 37, e00611, 2017.
- DE JONG, P. R. et al. Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects. *Cell Stress Chaperones.* 14, 117–131, 2009.
- DECKER, R. S. & WILDENTHAL, K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am. J. Pathol.* 98, 425–444, 1980.
- DEPRE, C. et al. Characterization of pDJA1, a cardiac-specific chaperone found by genomic profiling of the post-ischemic swine heart. *Cardiovasc Res.* 58(1):126-35. abr. 2003.
- DONGWORTH, R. et al. DJ-1 protects against cell death following acute cardiac ischemia–reperfusion injury. *Cell Death Dis.* 5, e1082, 2014.
- DUNLAY, S. M., ROGER, V. L., REDFIELD, M. M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 14:591–602, 2017.
- ERLICH, R. B. et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55:1690–1698, 2007.
- FANG, X. et al. Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 127(8):3189-3200, 2017.
- FONSECA, A. C. et al. Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human glioblastoma cells. *Neuroscience.* 200, 130–141, 2012.
- FONTANA, J. et al. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.* 90, 866–873, 2002.
- FREY, N., & OLSON, E. N. Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annual Review of Physiology.* 65(1), 45–79, 2003.
- GARCIA, R. et al. Extracellular heat shock protein 90 binding to TGFb receptor I participates in TGFb-mediated collagen production in myocardial fibroblasts. *Cell. Signal.* 28, 1563–1579, 2016.
- GAVIOLI, M. et al. Cholinergic signaling exerts protective effects in models of sympathetic hyperactivity-induced cardiac dysfunction. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014.
- GHAFOURI-FARD, S. et al. Interplay between PI3K/AKT pathway and heart disorders. *Mol Biol Rep.* 2022.

- GINSBURG, K. S.; BERS, D. M. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca²⁺ load and Ca²⁺ current trigger. **J Physiol.** 556:463–80, 2004.
- GOUSSETIS, D. & MESTRIL, R. Cardiomyocyte protection by Hsp70 and Hsc70 from oxidative stress induced apoptosis **Experimental biology. FASEB J.** 20(4), A119, 2006.
- GREENWOOD, J. P. et al. Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to peripheral sympathetic drive. **J Am Coll Cardiol.** 38:1711–1717, 2001.
- GYONGYOSI, A. et al. The Role of Autophagy and Death Pathways in Dose-dependent Isoproterenol-induced Cardiotoxicity. **Curr Pharm Des.** 25(19):2192-2198, 2019.
- GURUSAMY, N. et al. BAG-1 induces autophagy for cardiac cell survival. **Autophagy.** 5:1, 120-121, 2009.
- HAIJ, G. N. et al. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **J Comp Neurol.** 517:371–384, 2009.
- HAKUI, H. et al. Loss-of-function mutations in the co-chaperone protein BAG5 cause dilated cardiomyopathy requiring heart transplantation. **Science Translational Medicine.** 14;628, jan. 2022.
- HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature.** 13;381(6583):571-9, jun. 1996.
- HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature.** 475, 324–332, 2011.
- HINES, W. A.; THORBURN, A. Ras and Rho are Required for Gαq-Induced Hypertrophic Gene Expression in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 30, p. 485–494, 1998.
- HUANG, Z. P. et al. CIP, a Cardiac Isl1-Interacting Protein, Represses Cardiomyocyte Hypertrophy. **Circulation Research.** 110:818–830, fev. 2012.
- HUNTER, J. J. et al. Ventricular Expression of a MLC-2v- ras Fusion Gene Induces Cardiac Hypertrophy and Selective Diastolic Dysfunction in Transgenic Mice*. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 39, p. 23173–23178, 1995.
- JALIL, J. E. et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circ Res.** 64(6):1041-50, jun. 1989.
- KANAMORI, H. et al. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. **Cardiovasc Res.** 91, 330–339, 2011.
- KE, X. et al. Heat shock protein 90/Akt pathway participates in the cardioprotective effect

of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury to H9c2 cells. **Int. J. Mol. Med.** 39, 1001–1010, 2017.

KNOWLTON, A. A.; BRECHER, P.; APSTEIN, C. S. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. **J. Clin. Invest.** 87, 139–147, 1991.

KROEMER, G.; MARINO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Mol Cell.** 40(2): 280-93, 2010.

KOSS, K. L.; KRANIAS, E. G. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. **Circ Res.** 79(6):1059-63, dez. 1996.

LACKIE, R. E. et al. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. **Front. Neurosci.** 11, 254, 2017.

LASSLE, M. et al. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J. Biol. Chem.** 272, 1876–1884, 1997.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys Acta.** 1823:624–635, 2012.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annu. Rev. Biochem.** 55, 1151–1191, 1986.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** 22, 631–677, 1988.

LOPES, M. H. et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 25:11330–11339, 2005.

MANDAL, K. et al. Association of high intracellular, but not serum, heat shock protein 70 with postoperative atrial fibrillation. **Ann. Thorac. Surg.** 79, 865–871, 2005.

MATTIAZZI, A. et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 308, H1177–H1191, 2015.

MENSAH, G. A.; ROTH, G. A.; FUSTER, V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors 2020 and Beyond. **Journal of the American College of Cardiology.** 74: 2529-2532, 2019.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science,** 259, 1409–1410, 1993.

NAKAI, A et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. **Nat Med.** 13(5):619-24, maio. 2007.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nature Reviews Cardiology.** 15: 387-40, 2018.

NELSON, G. M.; HUFFMAN, H.; SMITH, D. F. Comparison of the carboxy-terminal Dp-repeat region in the co-chaperones Hop and Hip. **Cell Stress Chaperones** 8: 125–133, 2003.

NICHTOVA, Z. et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. **Gen Physiol Biophys.** 31(2):141-51, jun. 2012.

NISHIZAWA, J. et al. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. **Circulation.** 99, 934–941, 1999.

NOGUEIRA, I. P. **Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1) desempenha função protetora na resposta ao estresse cardíaco.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

ODUNUGA, O. O. et al. Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70–mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. **J. Biol. Chem.** 278, 6896–6904, 2003.

ODUNUGA, O. O., LONGSHAW, V. M.; BLATCH, G. L. Hop: More than na Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays.** 26:1058–1068, 2004.

OSADCHII, O. E. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. **Heart Fail Rev.** 12(1):66-86, mar. 2007.

HEINEKE, J.; MOLKENTIN, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 7: 589-600, 2006.

PASUMARTHI, K. B.; FIELD, L. J. Cardiomyocyte cell cycle regulation. **Circulation research.** v. 90, p. 1044-54, 2002.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu. Rev. Biochem.** 75, 271–294, 2006.

PFEIFER, U. et al. Short-term inhibition of cardiac cellular autophagy by isoproterenol. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.** 19(12), 1179–1184, 1987.

PFEFFER, M. A.; SHAH, A. M.; BORLAUG, B. A. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. **Circ Res.** 24;124(11):1598-1617, maio. 2019.

PICARD, D. HSP90 Interactors. Disponível em:
<https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf> (Acesso em: 20/07/2022). 2017.

PONIKOWSKI, P. et al. ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **Eur Heart J.** 37:2129–2200, 2016.

QIAN, Y. Z. et al. Induction of 72-kDa heat shock protein does not produce second window of ischemic preconditioning in rat heart. **Am. J. Physiol.** 2016.

RAMMOS, K. St. et al. Low preoperative HSP70 atrial myocardial levels correlate significantly with high incidence of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *Cardiovasc. Surg.* 10, 228–232, 2002.

RICHARDSON, D. W. et al. Modification by beta-adrenergic blockade of the circulatory responses to acute hypoxia in man. **J Clin Invest.** 1967;46:77–85, 2002.

ROCHA-RESENDE, C. et al. Absence of upregulator of cytokine signaling 2 turns cardiomyocytes unresponsive to LIF590 dependent increases in Ca²⁺ levels. **Am J Physiol Cell Physiol.** 312: C478–C486, 2017.

ROFFE, M. et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107:13147–13152, 2010.

ROHL, A. et al. Hsp90 regulates the dynamics of its cochaperone Sti1 and the transfer of Hsp70 between modules. **Nature Communications.** 6:6655, 2015.

ROMAN-CAMPOS, D. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Basic Research in Cardiology**, 104(3), 238–246, 2009.

ROTH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. **Journal Of The American College Of Cardiology.** v.76, p. 2982-3021, 2020.

SAITO, R. F. Indução de estresse de retículo endoplasmático como estratégia de quimiosensibilização de melanoma. Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2014.

SAPRA, G. et al. The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice. **Nat. Commun.** 5, 5705, 2014.

SCHLAICH, M. P. et al. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. **Circulation.** 108:560–565, 2003.

SCHLAICH, M. P. et al. Angiotensin II and norepinephrine release: interaction and effects on the heart. *J Hypertens.* 23(5):1077-82, maio. 2005.

SCHMID A. B. et al. The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. **EMBO J.** 31, 1506–1517, 2012.

SHIMOMURA, H. et al. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. **Jpn. Circ. J.** 65, 965–968, 2001.

SHIOJIMA, I.; WALSH, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. **Genes Dev.** 20, 3347–3365, 2006.

STRAND, A. H. et al. Arterial plasma noradrenaline predicts left ventricular mass independently of blood pressure and body build in men who develop hypertension over 20 years. **Journal of Hypertension**. Volume 24 - Issue 5 - p 905-913, maio. 2006.

SUGDEN, P. H.; CLERK, A. Activation of the Small GTP-binding Protein Ras in the Heart by Hypertrophic Agonists. **TMC**. v. 10, n. 1, p. 1–8, 2000.

TALOSI, L.; EDES, I.; KRANIAS, E. G. Intracellular mechanisms mediating reversal of beta-adrenergic stimulation in intact beating hearts. **Am J Physiol**. 264:H791-H797, 1993.

TAMURA, S.; Marunouchi, T.; Tanonaka, K. Heat-shock protein 90 modulates cardiac ventricular hypertrophy via activation of MAPK pathway. **Journal of Molecular and Cellular Cardiol**. 127:34-142, 2019.

THORBURN, A. et al. HRas-dependent Pathways Can Activate Morphological and Genetic Markers of Cardiac Muscle Cell Hypertrophy *. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 3, p. 2244–2249, 1993.

TOWNSEND, P. A. et al. BAG-1 proteins protect cardiac myocytes from simulated ischemia/reperfusion-induced apoptosis via an alternate mechanism of cell survival independent of the proteasome. **J Biol Chem**. 14;279(20):20723-8, maio. 2004.

TSAI, C. L. et al. Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells. **Cell Rep**. 2, 283–293, 2012.

WANG T. H., Chao A., Tsai C. L. et al. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. **Mol. Cell Proteomics** 9, 1873–1884, 2010.

WANG, L. et al. Decreased autophagy: a major factor for cardiomyocyte death induced by β_1 -adrenoceptor autoantibodies. **Cell Death Dis**. 6, e1862, 2015.

WANG J. et al. Autocrine and paracrine STIP1 signaling promote osteolytic bone metastasis in renal cell carcinoma. **Oncotarget**. 8, 17012–17026, 2017.

WANG, D. X. et al. Involvement of HSP90 in ischemic postconditioning-induced cardioprotection by inhibition of the complement system, JNK and inflammation. **Acta Cir Bras**. 20;35(1):e202000105, mar. 2020.

WEEKS, K. L. et al. Phosphoinositide 3-kinase p110a is a master regulator of exercise induced cardioprotection and PI3 K gene therapy rescues cardiac dysfunction. **Circ. Heart Fail**. 5, 523–534, 2012.

WEGELE, H.; MULLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**. 151, 1–44, 2004.

WEGENER, A. D. et al. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles: phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. **J Biol Chem**. 264:11468-11474, 1989.

- WEINREUTER, M. et al. CaMKinaseIImediatesmaladaptivepost-infarct remodelingandpro-inflammatorychemoattractantsignalingbutnotacute myocardialischemia/reperfusioninjury. **EMBOMol.Med.** 6, 1231–1245, 2014.
- WILKINS, B. J. & MOLKENTIN, J. D. Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 322, 1178–1191, 2004.
- WILKINS, B. J. *et al.* Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. **Circ. Res.** 94, 110–118, 2004.
- WILLIS, M. S. & PATTERSON, C. Proteotoxicity and cardiac dysfunction—Alzheimer’s disease of the heart? **N Engl J Med.** 368:455–464, 2013.
- WONG, C. Y. et al. Trends in comorbidity, disability, and polypharmacy in heart failure. **Am J Med.** 124:136–143, 2011.
- WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>. Acesso em: 18/04/2021.
- YAN, L. et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 13807–13812, 2005.
- YANCY, C. W. et al. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. **Circulation.** 128, e240–e327, 2013.
- YUSUF, S. et al. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. **Lancet**, 395: 795-808, 2020.
- ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J.** 21:3307–3316, 2002.
- ZHANG, T. et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. **Circ Res.** 92: 912–919, 2003.
- ZHAO, X. H. et al. Influence of heat shock protein 90 on protein serine threonine kinases expression in hypoxic cardiomyocytes. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 23, 265–268, 2007.
- ZHU, H. et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. **J Clin Invest.** 117, 1782–1793, 2007.