

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

Victor Moura Vidal Costa

**O BRAÇO MOLECULAR INDUZIDO PELA FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA
POR ESTRESSE 1 (STIP1) E PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR (PRPC) ATUA NA
ADAPTAÇÃO E RESILIÊNCIA DE CARDIOMIÓCITOS A HIPERATIVIDADE
ADRENÉRGICA E A HIPÓXIA**

Belo Horizonte - MG
2026

Victor Moura Vidal Costa

**O BRAÇO MOLECULAR INDUZIDO PELA FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA
POR ESTRESSE 1 (STIP1) E PROTEÍNA PRIÔNICA CELULAR (PRPC) ATUA NA
ADAPTAÇÃO E RESILIÊNCIA DE CARDIOMIÓCITOS A HIPERATIVIDADE
ADRENÉRGICA E A HIPÓXIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientador(a): Prof. Dra. Sílvia Guatimosim

Belo Horizonte - MG
2026

043

Costa, Victor Moura Vidal.

O Braço Molecular induzido pela Fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1) e Proteína Priônica Celular (PRPC) atua na adaptação e resiliência de Cardiomiócitos a Hiperatividade Adrenérgica e a Hipóxia [manuscrito] / Victor Moura Vidal Costa. – 2026.

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

Orientador: Prof. 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. Farmacologia. 3. Coração. 4. Hipertrofia. 5. Hipóxia. 6. Fosfoproteínas. 7. Proteínas Priônicas. I. Guatimosim, Silvia. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 413 DE VÍCTOR MOURA VIDAL COSTA

Às 13:30 horas do dia 12 de janeiro de 2026, Transmitida através da plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Víctor Moura Vidal Costa**, A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, ICB/UFMG, **Profa. Dra. Cibele Rocha Resende**, ICB/UFMG, **Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, ICB/UFMG, **Profa. Dra. Ivanita Stefanon**, CCS/UFES e o **Dr. Fernando Pedro Souza Neto**, University of Minnesota Twin Cities, Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"O BRAÇO MOLECULAR INDUZIDO PELA FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE 1 (STIP1) E PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR (PRPC) ATUA NA ADAPTAÇÃO E RESILIÊNCIA DE CARDIOMÍOCITOS A HIPERATIVIDADE ADRENÉRGICA E A HIPÓXIA"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 12 de janeiro de 2026.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende**, Professora do Magistério Superior, em 14/01/2026, às 15:27, 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 **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, Professora do Magistério Superior, em 14/01/2026, às 15:36, 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 **Fernando Pedro de Souza Neto, Usuário Externo**, em 14/01/2026, às 15:42, 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 **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 14/01/2026, às 15:45, 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 15/01/2026, às 06:05, 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 **4881399** e o código CRC **CBA77AEA**.

AGRADECIMENTOS

O que nos move na vida? Por que fazemos o que fazemos? É por escolha ou é por necessidade? Ir para a ciência quase nunca é um caminho simplesmente por uma necessidade de uma ocupação ou fonte de renda. Essa escolha demanda renúncia, resiliência, esforço, sem necessariamente um retorno material claro. E por que mesmo assim escolhemos esse caminho? Por que mesmo com todas as dificuldades as frustrações e o medo do futuro nós escolhemos esse caminho? Eu acredito que cada pessoa pode ter uma visão para essa resposta, mas para mim é algo que talvez só tenha percebido por agora, nos meus últimos dias como um estudante de doutorado. Pra mim ciência nunca foi só um trabalho, é algo que me preenche e que faz parte de mim. Entender como os processos fisiológicos funcionam e, mais do que isso, olhar para um fenômeno que não tem uma resposta, que ainda não se sabe o por que e como acontece, é o que mais me fascina. É por isso que mesmo com tantas dificuldades, eu continuo fazendo ciência. Para mim ciência é quase como um tipo de arte e expressão artística, por isso, é inevitável fazer paralelos em meu trabalho com a maneira que enxergo a vida. E olhando para o que eu produzi, uma coisa que sempre me chamou a atenção é como o coração é um órgão resiliente. É impressionante, mesmo em contextos adversos, é um órgão que se adapta, que aumenta força, aumenta velocidade de contração, aumenta eficiência, o coração é um órgão que teima em bater. E algo que eu fui entendendo ao progredir nos meus estudos é que o coração só tem essa resiliência graças a uma série de sistema celulares e moleculares que garantem que ele se adapte, que ele sobreviva. Aqui nesse trabalho demonstramos que uma proteína induzível pelo estresse aparenta ser um desses fatores que sustentam a resiliência cardíaca. O que me fez refletir e me perguntar, quem foram as pessoas que sustentaram a minha resiliência e me fizeram chegar até aqui? E por isso eu preciso agradecer alguns fatores que foram modulados para permitir que eu vivesse meu sonho.

Primeiro, e os mais importantes nesse processo, gostaria de agradecer a minha mãe, Floreni, e ao meu pai, José Carlos. O sacrifício que vocês fizeram para que eu tivesse condições de chegar até aqui é imensurável. Mesmo nos momentos mais difíceis, vocês nunca cogitaram que eu parasse meus estudos, muito pelo contrário, sempre trabalharam para que eu pudesse perseguir meu sonho, por isso, muito obrigado. Também gostaria de agradecer a todas as minhas tias, vocês me ensinaram e ensinam qual é o verdadeiro significado de família, me ajudando principalmente nos momentos mais difíceis, esse exemplo me motiva ter a capacidade de ajudar outras pessoas da mesma forma que me ajudaram. Gostaria de agradecer e homenagear minha vó, Florinda, que infelizmente nos deixou durante

meu doutorado. É incrível como a vida constantemente me coloca em contato com mulheres fortes e resilientes, por isso, vó muito obrigado por seu exemplo e carinho. Também preciso agradecer a minha esposa, Anna Flávia, que além de ser minha cúmplice em tudo que eu proponho para minha vida também foi meu porto seguro nas piores tempestades. Estendo meu agradecimento a minha irmã e aos meus primos e primas, que além de família foram grandes parceiros para mim. A meus amigos que fiz durante a faculdade agradeço pela parceria e companheirismo que me acompanha até hoje e espero que se estenda a vida toda. Também preciso agradecer aos companheiros que fiz durante esse período de pós graduação, em especial aos meus queridos amigos do laboratório de nanotecnologia, a amizade de vocês foi e é extremamente importante para mim, me lembro de inúmeros almoços e encontros diários que deixavam as dificuldades do dia a dia bem mais leves. Aos meus colegas de laboratório, muito obrigado pela parceria e colaboração durante todos esses anos. Agradeço a todos os colaboradores desse trabalho, ciência não se faz sozinho e sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria o mesmo. Também preciso agradecer a todos os egressos do nosso laboratório de sinalização cardíaca, que de alguma maneira contribuíram para minha formação como cientista. Dentre as pessoas que auxiliaram em minha formação, gostaria de destacar duas. Ao Anderson Kenedy, que foi meu co-orientador durante minha iniciação científica e meu mestrado, meu muito obrigado por sua paciência e disponibilidade para me ensinar. Por último, gostaria de agradecer a minha orientadora, professora Silvia Guatimosim, com você eu aprendi a escrever cientificamente, apresentar graficamente meus resultados de forma clara, a propor experimentos e diversas outras coisas fundamentais para minha carreira. A professora Silvia é uma cientista que eu me inspiro muito e eu acredito que nos só nos inspiramos em quem admiramos. Por fim, agradeço ao governo federal que financiou minha bolsa durante o doutorado e meu muito obrigado ao programa de pós graduação em fisiologia e farmacologia do ICB-UFMG pela formação e estrutura.

RESUMO

A fosfoproteína 1 induzida por estresse (STIP1) é uma co-chaperona envolvida na proteostase neuronal e na resiliência ao estresse. Embora expressa no coração, sua função permanece indefinida. Em estudos prévios de nosso grupo identificamos a expressão reduzida de STIP1 em tecido cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca. Utilizando de animais haploinsuficientes para STIP1 (*STIP1^{+/-}*) demonstramos que os mesmos eram mais susceptíveis ao estresse cardíaco gerado pelo agonista β -adrenérgico isoproterenol (ISO), sendo que os cardiomiócitos não hipertrofiavam em resposta ao estímulo. Em um ensaio proteômico identificamos diversas proteínas reguladas negativamente relacionadas ao processo de síntese proteica nos animais *STIP1^{+/-}/ISO* quando comparado com WT/ISO. Também identificamos diversas vias celulares alteradas relacionadas ao processo de estresse oxidativo, bem como a inibição da via do fator de transcrição NRF2. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi averiguar a importância da STIP1 para a síntese proteica, que precede a hipertrofia de cardiomiócitos, bem como sua relevância no contexto de hipoxia em cardiomiócitos e sua relação com NRF2 nesse processo. Inicialmente, transfectamos cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) com siRNA para STIP1 e confirmamos sua eficácia em reduzir a expressão do RNAm da STIP1 e da proteína. Em seguida, identificamos que a STIP1 é importante para a hipertrofia de NRCMs em resposta ao ISO, mas não aparenta ser necessária para o aumento celular mediado por IGF-1. Também, validamos os achados do experimento proteômico ao mostrarmos que STIP1 é relevante para o aumento de síntese proteica em resposta ao ISO bem como na expressão de eIF4E. Em seguida demonstramos que a via em que STIP1 modula a hipertrofia de cardiomiócitos se mostra ser dependente de PrP^c, uma vez que o silenciamento da proteína impede a hipertrofia de NRCMs em resposta ao ISO, fenótipo idêntico ao silenciamento de STIP1. Em suporte a este achado, identificamos a capacidade de NRCMs de secretarem STIP1 e da mesma se ligar a PrP^c nessas células. Em seguida, demonstramos que a expressão e localização nuclear de STIP1 é modulada positivamente em cardiomiócitos submetidos a hipoxia gerada por CoCl₂. Esse mesmo contexto induz a secreção de STIP1 por NRCMs. O silenciamento de STIP1 em NRCMs gerou maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como agravou a morte de cardiomiócitos em resposta a hipoxia. Por fim, identificamos que a presença de STIP1 é relevante para garantir a expressão e localização nuclear de NRF2 em contexto de estresse oxidativo mediado por CoCl₂. Em conclusão, STIP1 demonstra ser uma molécula fundamental na adaptação e resiliência de cardiomiócitos ao estresse oxidativo bem como na hiperatividade adrenérgica. De forma que o presente estudo posiciona o braço molecular

STIP1-PrPc como alvo terapêutico importante a ser pesquisado no contexto das doenças cardíacas.

Palavras chave: Coração, hipertrofia, hipoxia, STIP1, PrP^c, NRF2.

ABSTRACT

Stress-induced phosphoprotein 1 (STIP1) is a co-chaperone involved in neuronal proteostasis and stress resilience. Although expressed in the heart, its function remains undefined. In previous studies by our group, we identified reduced STIP1 expression in cardiac tissue from patients with heart failure. Using haploinsufficient mice for STIP1 (*STIP1*^{+/-}), we demonstrated that these animals were more susceptible to cardiac stress generated by the β -adrenergic agonist isoproterenol (ISO), and their cardiomyocytes did not hypertrophy in response to the stimulus. In a proteomic assay, we identified several negatively regulated proteins related to the protein synthesis process in *STIP1*^{+/-}/ISO animals when compared to WT/ISO. We also identified several altered cellular pathways related to the oxidative stress process, as well as an inhibition of the NRF2 transcription factor pathway. Thus, the aim of this study was to investigate the importance of STIP1 for protein synthesis preceding cardiomyocyte hypertrophy, as well as the relevance of STIP1 in the context of hypoxia in cardiomyocytes and its relationship with NRF2 in this process. Initially, we transfected neonatal rat cardiomyocytes (NRCMs) with siRNA that was able to reduce the expression of STIP1 mRNA and protein. Subsequently, we identified that STIP1 is important for NRCM hypertrophy in response to ISO, but does not appear to be necessary for IGF-1-mediated cell enlargement. We also validated the findings of the proteomic experiment by showing that STIP1 is relevant for increased protein synthesis in response to ISO as well as for eIF4E expression. The pathway by which STIP1 modulates cardiomyocyte hypertrophy appears to be PrPc-dependent, since silencing the protein prevents NRCM hypertrophy in response to ISO, phenocopying STIP1 silencing. We also identified the ability of NRCMs to secrete STIP1 as well as its binding to PrP^c in these cells. Next, we demonstrated that the expression and nuclear localization of STIP1 is positively modulated in cardiomyocytes subjected to CoCl₂-induced hypoxia. This same context induces STIP1 secretion by NRCMs. STIP1 silencing led to increased production of reactive oxygen species (ROS), as well as exacerbated cardiomyocyte death in response to hypoxia. Finally, we identified that the presence of STIP1 is relevant to ensure the expression and nuclear localization of NRF2 in the context of CoCl₂-mediated oxidative stress. In conclusion, STIP1 proves to be a fundamental molecule in the adaptation of cardiomyocytes to oxidative stress as well as in adrenergic hyperactivity. Thus, this study positions the STIP1-PrPc molecular arm as an important therapeutic target to be investigated in the context of cardiac diseases.

Keywords: Heart, hypertrophy, hypoxia, STIP1, PrP^c, NRF2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DOMÍNIOS NEH DA PROTEÍNA NRF2. EM VERMELHO TEMOS OS MOTIVOS REGULATÓRIOS DE ATIVAÇÃO E EM AZUL OS DE INIBIÇÃO	22
FIGURA 2 - VIAS DE UBQUITINAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE NRF2 EM CONTEXTO DE NORMOXIA.....	23
FIGURA 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO E ACUMULO CELULAR DE NRF2 EM RESPOSTA A HIPÓXIA. LINHAS EM VERMELHO INDICAM ATIVAÇÃO DE NRF2 E AZUL INIBIÇÃO	24
FIGURA 4 - DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS DA HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA.....	26
FIGURA 5 - DIFERENTES VIAS CELULARES ATIVADAS NO CORAÇÃO EM CONTEXTO DE HIPERTROFIA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA.....	27
FIGURA 6 - TRANSPORTE DE PROTEÍNAS CLIENTES DA CHAPERONA HSP90 PARA HSP70 DE FORMA DEPENDENTE DE STIP1.....	30
FIGURA 7 - DOMÍNIOS DA PROTEÍNA STIP1 BEM COMO SEUS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO E SUMOILAÇÃO.....	31
FIGURA 8 - NÍVEIS REDUZIDOS DE STIP1 TORNAM OS CAMUNDONGOS MAIS SUSCETÍVEIS A LESÕES MIOCÁRDICAS INDUZIDAS POR ADRENÉRGICOS	33
FIGURA 9 - O CORAÇÃO STIP1 ^{+/-} /ISO APRESENTA UMA MARCADA REGULAÇÃO NEGATIVA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO RELACIONADAS À TRADUÇÃO	35
FIGURA 10 - CORAÇÃO STIP1 ^{+/-} APRESENTA MAIOR FIBROSE E PREJUÍZO NA MAQUINARIA DE SÍNTESE PROTEICA EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ISO	36
FIGURA 11 - O SILENCIAMENTO DE STIP1 PREJUDICA A HIPERTROFIA PATOLÓGICA EM CARDIOMIÓCITOS.....	43
FIGURA 12 - A PERDA DE STIP1 NÃO ALTERA A CONTRATILIDADE INDUZIDA POR ISO EM NRCMS	44
FIGURA 13 - O SILENCIAMENTO DE STIP1 PREJUDICA A ATIVAÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA INDUZIDA POR ISO EM CARDIOMIÓCITOS SEM ATIVAR ESTRESSE DE RETÍCULO	45
FIGURA 14 - A INTERAÇÃO STIP1-PRP ^c IMPULSIONA A ATIVAÇÃO DEPENDENTE DE ISO DA HIPERTROFIA EM CARDIOMIÓCITOS	47
FIGURA 15 - O COCL ₂ MIMETIZA A HIPÓXIA E INDUZ STIP1 PROMOVEDO SUA EXPRESSÃO E TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR EM CARDIOMIÓCITOS.....	49

FIGURA 16 - STIP1 É SECRETADO EM RESPOSTA À HIPÓXIA.....	51
FIGURA 17 - A LOCALIZAÇÃO DA GFP NÃO É ALTERADA PELO TRATAMENTO COM COCL ₂ EM NRCMS	52
FIGURA 18 – A DIMINUIÇÃO DE STIP1 LEVA A NÍVEIS ELEVADOS DE ROS E AUMENTA A SUSCEPTIBILIDADE DE NRCMS À MORTE CELULAR INDUZIDA POR HIPÓXIA.	54
FIGURA 19 - A STIP1 DESEMPENHA UM PAPEL CRUCIAL NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NRF2 E NA PROMOÇÃO DE SUA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA.....	56
FIGURA 20 - MODELO DE FUNCIONAMENTO DA REGULAÇÃO DA HIPERTROFIA PATOLÓGICA EM CARDIOMIÓCITOS PELO EIXO STIP1-PRP ^c	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRIMERS USADOS NO PRESENTE ESTUDO.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- STIP1: Proteína induzida por estresse
- NRF2: Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2
- PrP^c: Proteína priônica celular
- STIP^{+/-}: Camundongo haploinsuficiente para STIP1
- WT: Camundongo do tipo selvagem
- ISO: Isoproterenol
- IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
- Mock: Transfectado apenas com o veículo
- siRNA: RNA de interferência
- NRCMs: Cardiomiócitos neonatais de rato
- NMCMs: Cardiomiócitos neonatais de camundongo
- RNAm: RNA mensageiro
- RNAt: RNA transportador
- mTORC1: Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos
- eIF4E: Fator 4E de iniciação da tradução eucariótica
- ER: Retículo endoplasmático
- ATF4: Fator de transcrição ativador 4
- CHOP: Proteína homóloga C/EBP
- TIRF: Fluorescência por Reflexão Interna Total
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- WF: Campo amplo
- ARE: Elemento de resposta antioxidante

LISTA DE SÍMBOLOS

- mg.....Miligramas
- Kg.....Quilogramas
- αAlfa do alfabeto grego
- βBeta do alfabeto grego
- H^+Íon hidrogênio
- Ca^{2+}Íon cálcio
- Na^+Íon sódio
- Fe^{3+}Íon ferro
- OH^-Íon hidróxido
- mm.....Milímetros
- M.....Molar
- μmMicrometros
- mM.....Milimolar
- L.....Litro
- KCl.....Cloreto de potássio
- H_2OÁgua
- H_2O_2Peróxido de hidrogênio
- $CoCl_2$Cloreto de Cobalto
- μgMicrograma
- μMMicromolar
- μmMicrometro
- nm.....Nanômetro
- n.....Número experimental
- p.....Valor de probabilidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Doenças cardíacas	19
1.2 Doença isquêmica cardíaca	19
1.2.1 Necrose	20
1.2.2 Apoptose.....	20
1.2.3 Ferroptose	20
1.2.4 Necroptose.....	21
1.2.5 Piroptose	21
1.3 Papel protetor do Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2) na hipoxia cardíaca	21
1.4 Remodelamento cardíaco	25
1.5 Hipertrofia cardíaca	25
1.5.1 Síntese proteica na hipertrofia cardíaca.....	27
1.6 Fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1)	28
1.6.1 STIP1 na isquemia	31
1.6.2 STIP1 no coração.....	32
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. METODOLOGIA	38
3.1 Modelo animal	38
3.2 Cultura, transfecção, imunofluorescência e tratamento de cardiomiócitos	38
3.3 Análise de Western blot	39

3.4 Imunoprecipitação.....	39
3.5 Análises de qPCR.....	39
3.6 Contratilidade de cardiomiócitos neonatais	40
3.7 Ensaio de viabilidade celular.....	40
3.8 Fluorescência por Reflexão Interna Total (TIRF)	40
3.9 Análises estatísticas.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 A via celular STIP1-PrP^c é fundamental para a hipertrofia de cardiomiócitos induzida por ISO	42
4.1.1 A STIP1 é relevante para a hipertrofia de cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) em resposta apenas ao ISO e não a IGF-1.....	42
4.1.2 A STIP1 é importante para a ativação da síntese proteica mediada por ISO	44
4.1.3 Eixo STIP1-PrP ^c participa da regulação da hipertrofia de cardiomiócitos dependente do ISO	46
4.2 A STIP1 é relevante para a adaptação ao contexto de hipóxia em cardiomiócitos	48
4.2.1 CoCl ₂ é capaz de induzir hipóxia e modular a expressão de STIP1	48
4.2.2 CoCl ₂ modula a secreção de STIP1 em cardiomiócitos.....	49
4.2.3 Redução dos níveis de STIP1 impactam a sobrevivência de cardiomiócitos em resposta a hipóxia.....	53
4.2.4 STIP1 é relevante para a responsividade de NRF2 a hipóxia em cardiomiócitos	54
5 DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardíacas

As doenças cardíacas estão entre as mais prevalentes e são as que mais matam no mundo ¹. Essa problemática se dá por razões multifatoriais que vão desde questões de ordem genética, estilo de vida e situações socioeconômicas ¹.

Uma situação que vai de encontro com a problemática citada acima se dá pelo fato de o coração ser um órgão fundamental a vida. Sua função como bomba sanguínea se faz fundamental para o suprimento de nutrientes para os todos os sistemas. Este é um órgão que deve manter sua função contrátil por toda a existência do indivíduo de forma a se adaptar as diferentes demandas e ocasiões. A fração de ejeção, que pode ser medida pela porcentagem do volume sanguíneo que deixa o ventrículo esquerdo após o evento de sístole, deve ser sempre acima de níveis compatíveis com a demanda dos sistemas ². Diversas situações de quebra da homeostasia cardíaca, como ocorre na doença, podem impactar a força contrátil e conseqüentemente a fração de ejeção do coração devido a perda de tecido contrátil gerada pela morte de cardiomiócitos ². Dessa forma o coração deve estar apto a se adaptar a esses eventos de estresse, afim de manter sua função em níveis compatíveis a vida.

1.2 Doença isquêmica cardíaca

Um dos quadros de quebra da homeostasia cardíaca ocasionado por doença se dá na isquemia cardíaca. Esse evento ocorre quando o fluxo sanguíneo em alguma porção do tecido é interrompido, ocasionando hipoxia e baixa nutricional na localidade que por sua vez gera morte de cardiomiócitos, estabelecendo o que é chamado de infarto agudo do miocárdio ³. A causa desse interrompimento no fluxo de sangue pode se dá por diversas doenças de ordem vascular coronariana, sendo a principal delas a aterosclerose ³.

A morte de cardiomiócitos gerada pelo infarto agudo do miocárdio se dá tanto pela interrupção do fluxo sanguíneo quanto pela sua reperfusão ⁴. As causas da morte celular na reperfusão são multifatoriais e estão intimamente ligadas ao acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e Ca^{2+} ⁴. O processo de morte de cardiomiócitos no infarto agudo do miocárdio é complexo e pode ser classificado em alguns tipos, como necrose, apoptose, ferroptose, necroptose e piroptose ^{5,6}.

1.2.1 Necrose

A necrose é um processo de morte celular que acomete cardiomiócitos em condições de hipoxia. Tal processo está relacionado com a ruptura da membrana citoplasmática e das mitocôndrias⁵. Isto se dá devido a um conjunto de fatores, como a acidose gerada pela hipoxia bem como o acúmulo intracelular de EROs e Ca^{2+} ⁵. Esse acúmulo de Ca^{2+} é resultado do acúmulo de H^+ decorrente do processo metabólico anaeróbico, gerando acidose celular e aumento da função do trocador Na^+/H^+ , dessa forma se tem um acúmulo de Na^+ citoplasmático forçando a ação do trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e gerando assim o acúmulo de Ca^{2+} citoplasmático⁵. O acúmulo de Ca^{2+} no meio intracelular gera disfunção mitocondrial, acúmulo de EROs, perda da contratilidade e por fim morte celular^{5;7}. O acúmulo de EROs é citotóxico e tem alta contribuição na morte celular em ambiente de hipoxia devido a esses agentes químicos gerarem dano oxidativo em proteínas, lipídeos e no DNA, induzindo a liberação de conteúdo celular para o meio externo^{5;7}. A liberação desse conteúdo celular gera a formação de padrões de dano celular, os chamados DAMPs, que por sua vez são reconhecidos por receptores Toll-Like, modulando assim uma resposta inflamatória que muitas vezes contribui no aumento da área infartada⁵.

1.2.2 Apoptose

Os tipos de morte celular programadas também acometem cardiomiócitos submetidos a hipoxia⁵. Diferentemente da necrose, a apoptose não envolve a ruptura da membrana citoplasmática, fazendo com que respostas inflamatórias a esse processo sejam atenuadas⁵. É importante dizer que a apoptose é um processo celular ativo que é induzido em resposta a marcadores de estresse mitocondrial, como a liberação de citocromo C, EROs, ao acúmulo citoplasmático de Ca^{2+} e dano ao DNA⁵. Dentre as enzimas que operam o processo de apoptose temos as caspases, são proteases que clivam proteínas que geram a fragmentação do DNA e do citoesqueleto^{5;8}.

1.2.3 Ferroptose

O acúmulo citoplasmático de ferro em células cardíacas é um fenômeno que acontece decorrente a hipoxia^{9;10}. Esse ferro em excesso pode reagir com peróxido de hidrogênio, gerando Fe^{3+} e OH^- (um tipo de ERO) em uma reação chamada de fenton⁶. Com o acúmulo de EROs, as enzimas antioxidantes, como exemplo as glutatona peroxidases, tentam resolver o estresse oxidativo estabelecido através de reações químicas que neutralizam EROs gerando H_2O e álcoois⁶. Quando os níveis de EROs estão acima da capacidade de neutralização dos sistemas antioxidantes, se tem uma massiva oxidação de lipídeos de

membrana que culminam a ruptura da membrana plasmática e mitocondrial gerando morte celular, estabelecendo assim o processo de ferroptose ⁶.

1.2.4 Necroptose

A necroptose é um tipo de morte celular que se assemelha ao processo de necrose, porém se diferencia por se tratar de um tipo de morte celular programada e dependente de ativação de vias celulares ⁶. Esse processo se inicia quando ligantes, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ativam receptores de morte. Dois exemplos desses receptores são o fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e TNFR2 ⁶. A ativação de TNFR1 induz a formação de um complexo proteico entre as proteínas quinase de interação com receptor 1 (RIP1), RIP3 e a pseudoquinase semelhante ao domínio da quinase de linhagem mista (MLKL), tal complexo é chamado de necrossomo ⁶. A formação desse complexo gera a fosforilação e ativação de MLKL, que por sua vez leva a ruptura da membrana celular, gerando a formação de DAMPs e induzindo o processo inflamatório ⁶. O processo de necroptose é ativado em contexto de hipoxia cardíaca, tendo um aumento da fosforilação de RIP1 e 3 no coração de camundongos submetidos a modelo de isquemia e reperfusão ^{6; 11}.

1.2.5 Piroptose

A Piroptose é um tipo de morte celular que se inicia através da resposta inflamatória, que no processo de isquemia e reperfusão cardíaca é ativada por DAMPs ⁶. As DAMPs induzem a formação do complexo entre o receptor NOD-like 3 (NLRP3), proteína semelhante a grânulos de apoptose (ASC) e caspase 1 (CASP1), sendo tal complexo denominado de inflamassoma ⁶. A formação do inflamassoma induz a clivagem e ativação de CASP1, que por sua vez cliva a gasdermina D e possibilita que sua porção N terminal se ligue a porção interna da membrana plasmática e possibilite a formação de poros, resultando na morte celular ⁶.

1.3 Papel protetor do Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2) na hipoxia cardíaca

O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) foi descoberto como um fator de transcrição que se liga a um sítio *cis* regulatório no DNA chamado de elemento de resposta antioxidante (ARE) ¹². A proteína NRF2 possui sete domínios altamente conservados, denominados Nrf ECH homólogos (Nhe) (**Figura 1**) ¹². Tais domínios são fundamentais para sua modulação, localização e ação na resposta antioxidante ¹². Em humanos, foram encontrados diversos polimorfismos únicos (SNPs) no gene de NRF2, de forma que uma

mutação específica no sítio ARE localizado em sua região promotora reduz significativamente a expressão de NRF2 e leva a maior prevalência de doenças cardíacas e hipertensão ¹². É possível hipotetizar que esse fenótipo é causado devido a função protetora e antioxidante que NRF2 possui.

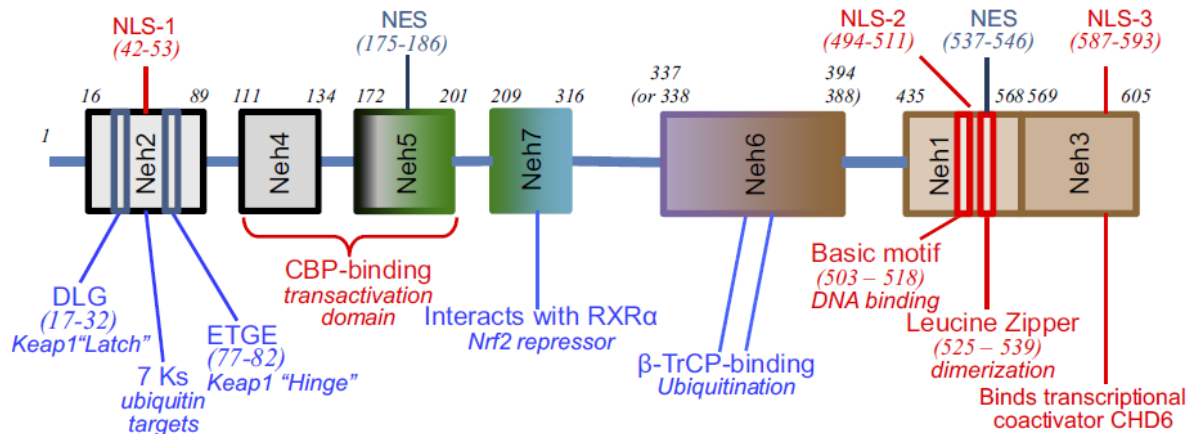


Figura 1 - Domínios Neh da proteína NRF2. Em vermelho temos os motivos regulatórios de ativação e em azul os de inibição ¹².

Em situações de normoxia tecidual, onde não se tem abundância de EROs, a proteína NRF2 se encontra localizada no citoplasma constantemente ligada a proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (Keap1) (**Figura 2**) ¹². A ligação a Keap1 induz a ubiquitinação de NRF2 e posteriormente a sua degradação ¹². Outras vias de degradação de NRF2 se dão de forma dependente de HMG CoA redutase (Hrd1) e glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3β) (**Figura 2**) ¹². Em situações de quebra da proteostase celular e estabelecimento do chamado estresse de retículo a proteína Hrd1, que se encontra ancorada a membrana do reticulo endoplasmático liso, se liga a NRF2 e permite sua ubiquitinação e degradação ¹². Em situações de normoxia, a quinase GSK3β se encontra ativa e capaz de fosforilar NRF2, essa fosforilação permite a interação da proteína β-TrCP ao domínio Nhe6 de NRF2, permitindo a formação de um complexo proteico que promove a ubiquitinação de NRF2 e sua degradação ^{12; 13}.

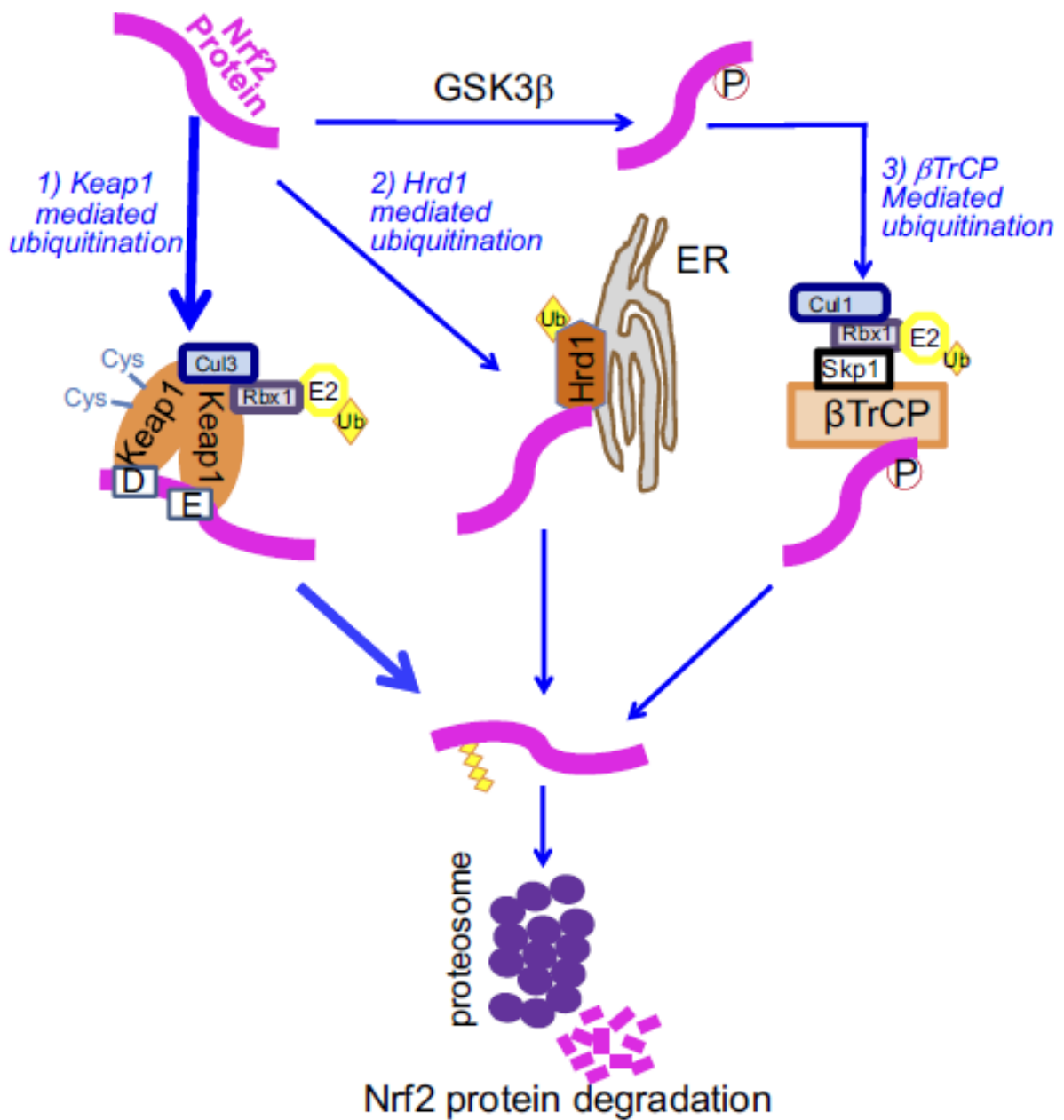


Figura 2 - Vias de ubiquitinação e degradação de NRF2 em contexto de normoxia ¹².

Como já discutido anteriormente, ambientes de hipoxia induzem a formação e o acúmulo de EROs, que por sua vez são citotóxicos e induzem a morte celular. A proteína NRF2 possui papel importante no combate a EROs por ser induzível as mesmas e por modular uma resposta celular antioxidante ao se translocar para o núcleo, se ligar a sítios ARE no genoma e modular a expressão de proteínas como a NAPH quinona redutase 1 (NQO1), Heme oxigenase 1 (HO-1), Superóxido dismutase 1 (SOD-1) entre outras ¹². Podemos classificar as formas como NRF2 é induzível a hipoxia em quatro, pela inativação de Keap1,

a remoção de Keap1, a ativação por feedback positivo e pela inativação de GSK3 β (Figura 3) ¹². O aumento dos níveis de EROs é reconhecido por regiões sensíveis a oxidação na proteína Keap1, isso faz com que a mesma se desligar de NRF2, o liberando para a translocação nuclear e ativação genica ¹². O estresse oxidativo também pode induzir a ligação do complexo proteico p62/ SQSTM1 a proteína Keap1, induzindo sua degradação por autofagia e seu desligamento de NRF2, liberando assim a translocação de NRF2 para o núcleo ¹². O promotor do gene de NRF2 também possui sítio ARE, o que possibilita a proteína NRF2 induzir a própria expressão genica quando está presente no núcleo, em um processo de feedback positivo ¹². Como dito anteriormente, GSK3 β pode induzir a degradação de NRF2 em contexto de normoxia, esse processo é inibido quando o estresse oxidativo ativa a via celular fosfatidinositol quinase 3 (PI3K) / proteína quinase B (AKT) que culmina na fosforilação de GSK3 β , isso inibe a ação quinase da proteína impedindo a mesma de fosforilar NRF2, impedindo sua degradação ¹².

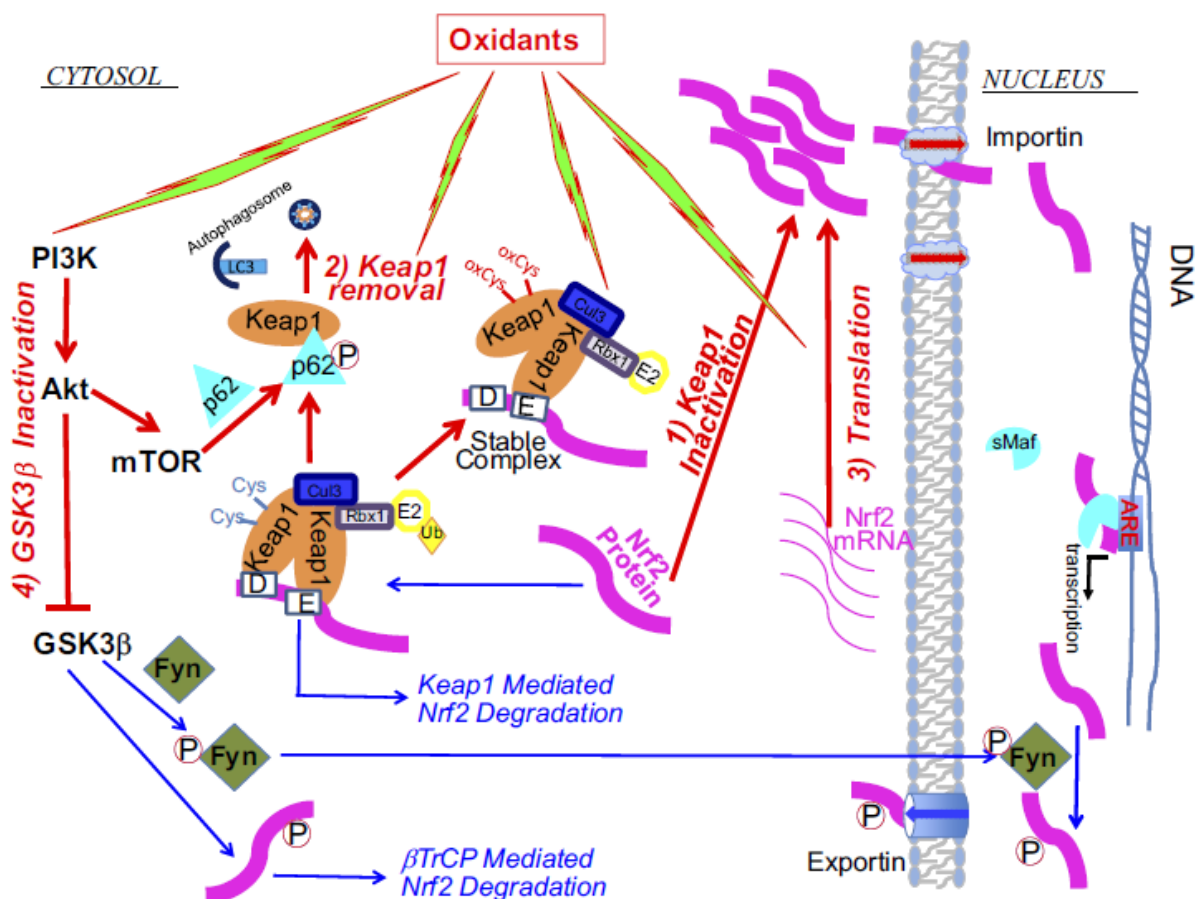


Figura 3 - Vias de ativação e acumulação celular de NRF2 em resposta a hipóxia. Linhas em vermelho indicam ativação de NRF2 e azul inibição ¹².

Em camundongos submetidos a modelos de isquemia e reperfusão se foi possível identificar aumento da expressão de NRF2 ^{12; 14}. Nesse mesmo estudo também foi evidenciado a relevância de NRF2 para a adaptação ao evento isquêmico, uma vez que animais NRF2-Knockout apresentaram maior área infartada e dano cardíaco ¹⁴. Interessantemente, diversas drogas ativadoras de NRF2 demonstraram ter efeitos protetores em modelos murinos de Isquemia e reperfusão, diminuindo a área infartada, melhora da função ventricular e diminuição de eventos arritmogênicos ¹².

1.4 Remodelamento cardíaco

O processo de remodelamento cardíaco é caracterizado pela mudança morfológica do coração em resposta a um estímulo agressor ^{15; 16}. Esse remodelamento se difere quando provem de um estímulo fisiológico para um patológico ¹⁵. Na doença, onde é comum a presença de morte de cardiomiócitos, o coração muda morfológicamente afim de preservar a estrutura do órgão bem como sua função ¹⁵. Esse processo pode ser caracterizado em três etapas, um processo inflamatório, hipertrofia cardíaca e fibrose ¹⁶. O processo inflamatório acontece em resposta ao dano tecidual e morte celular, como ocorre na isquemia e reperfusão, o que facilita a remoção de tecido morto, favorecendo o processo de cicatrização e fibrose, mas também pode gerar agravamento do dano cardíaco bem como hipertrofia ¹⁶. A fibrose é um processo fundamental em resposta a morte celular, pois ela garante a cicatrização tecidual e manutenção da estrutura do coração. Porém, a deposição de colágeno não recupera tecido muscular cardíaco perdido pelo dano, possibilitando uma perda de força contrátil no órgão ¹⁵. Em ordem de responder a essa problemática, os cardiomiócitos remanescentes são estimulados a hipertrofiarem, afim de preservar a força de contração desse coração lesionado ¹⁵.

1.5 Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca é um fenômeno caracterizado pelo aumento do coração bem como da hipertrofia de suas unidades funcionais, os cardiomiócitos. Tal processo pode ser originado tanto em resposta a eventos de ordem fisiológica, como gravidez e exercício físico, quanto em resposta a doença e dano cardíaco, assim como no infarto agudo do miocárdio ¹⁷. Ambos os tipos de hipertrofia, fisiológica e patológica, se diferem entre si tanto no aspecto morfológico quanto nas vias celulares acometidas ¹⁷.

Na hipertrofia fisiológica temos a distribuição de sarcômeros pelos cardiomiócitos de forma horizontal e vertical, fazendo com que as células aumentem de tamanho tanto em largura quanto em comprimento (**Figura 4**)¹⁷. Em resposta a estímulos fisiológicos o coração tem uma hipertrofia excêntrica, com aumento da luz ventricular (**Figura 4**)¹⁷. Esse tipo de remodelamento acomete vias que aumentam a síntese proteica, bem como melhora o controle de qualidade proteica e eficiência energética (**Figura 5**)¹⁷. A hipertrofia fisiológica é considerada um processo saudável e reversível, sem acometimento de morte celular e, em alguns casos, com melhora na eficiência cardiovascular caracterizada por diminuição da frequência cardíaca e fração de ejeção preservada¹⁷.

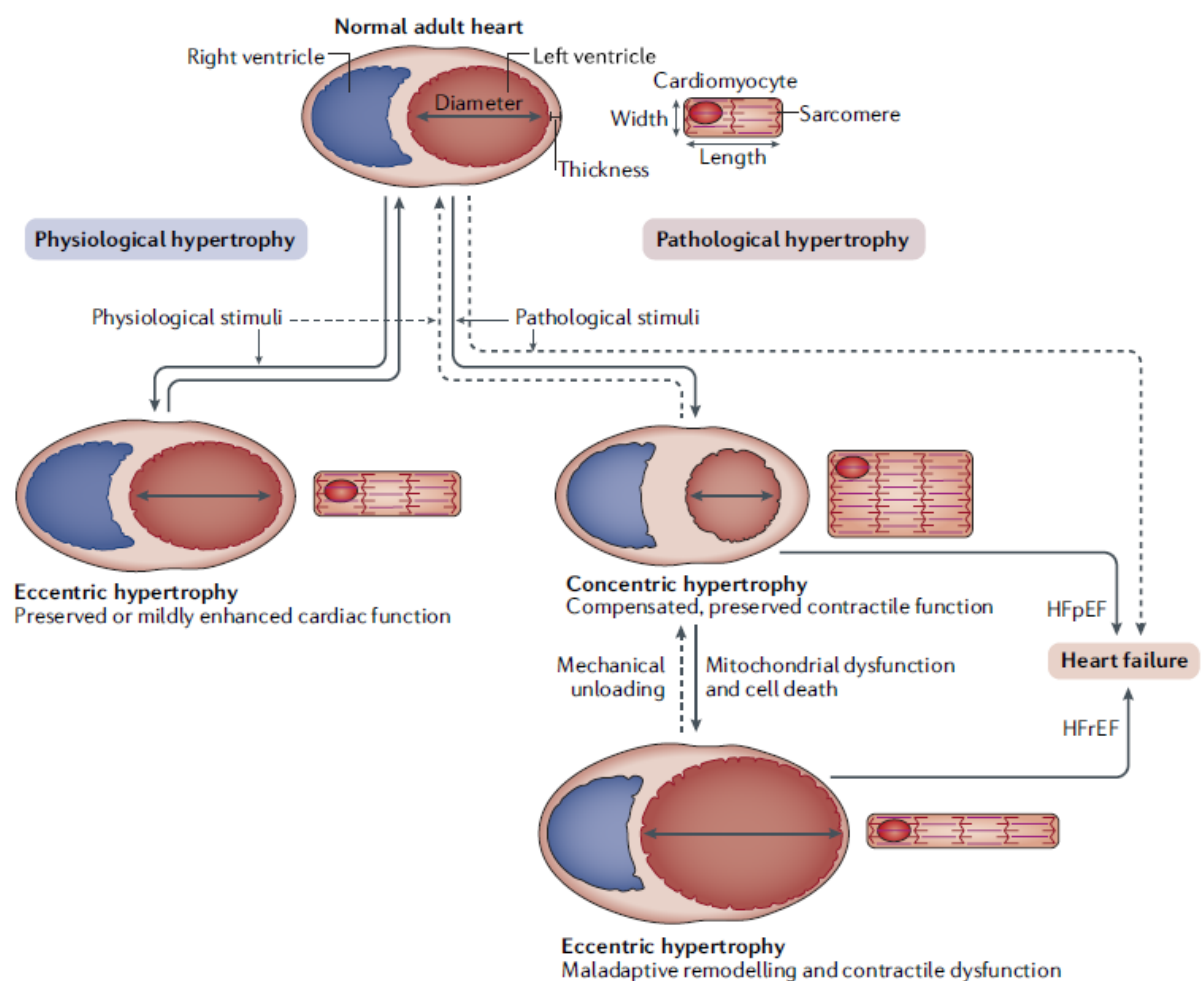


Figura 4 - Diferenças morfológicas da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica¹⁷.

A hipertrofia patológica se difere em diversos pontos da fisiológica, por se tratar de um processo adaptativo a um ambiente que ocorreu morte celular e inflamação¹⁷. As mudanças morfológicas nesse contexto são importantes para garantir que o coração mantenha sua

fração de ejeção em níveis compatíveis a vida mesmo com a perda de tecido contrátil. A hipertrofia patológica pode ser caracterizada por uma distribuição dos sarcômeros de forma mais proeminente no sentido vertical, fazendo com que os cardiomiócitos cresçam mais em altura do que em largura, favorecendo um processo hipertrófico concêntrico no coração (**Figura 4**)¹⁷. Esse processo pode ser denominado como hipertrofia compensada, uma vez que a função contrátil e fração de ejeção se encontram preservadas, sendo esse fenótipo comum em pacientes com a chamada insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (HFpEF)^{2; 17}. Em muitos casos esse remodelamento inicial evolui para um quadro de hipertrofia excêntrica, com disposição sarcomérica em paralelo, aumento da luz ventricular e afinamento das paredes cardíacas¹⁷. Nesse contexto, se tem um remodelamento mal adaptativo com disfunção contrátil e diminuição na fração de ejeção, estabelecendo um quadro de insuficiência cardíaca com redução da fração de ejeção (HFrEF)^{2; 17}. Os processos celulares na hipertrofia patológica se diferenciam da fisiológica em vários pontos, como ocorrência de morte celular, disfunção mitocondrial, aumento de EROs, prejuízo no manuseio de Ca^{2+} e fibrose (**Figura 5**)¹⁷.

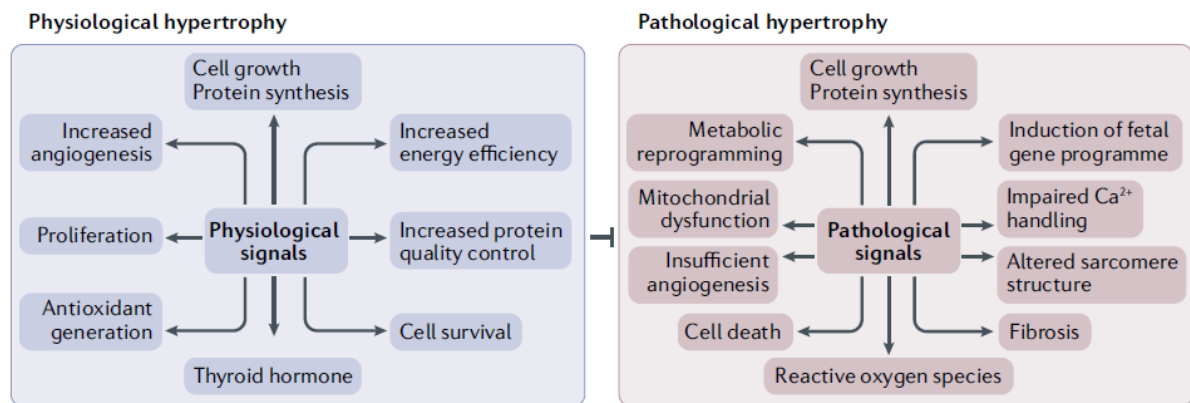


Figura 5 - Diferentes vias celulares ativadas no coração em contexto de hipertrofia fisiológica e patológica¹⁷.

1.5.1 Síntese proteica na hipertrofia cardíaca

A síntese proteica é um processo fundamental na fisiologia e homeostase celular, de forma que a magnitude desse processo muda de acordo com o tipo celular e o contexto¹⁸. A taxa de síntese proteica do coração adulto se mostra bem menor quando comparado a outros órgãos, como o fígado¹⁹. Em murinos, ao comparar corações neonatais com adultos, é notável que a taxa de síntese proteica se encontra maior em períodos imaturos, demonstrando que o decaimento na produção de proteínas no coração faz parte do processo maturacional¹⁹. Interessantemente, ao estimular camundongos ou cardiomiócitos em cultura com fármacos

que induzem a hipertrofia cardíaca a produção de proteínas aumenta consideravelmente, em um processo denominado de síntese proteica *de novo* ¹⁹. Para a ocorrência desse processo é necessário a ativação de diversas vias celulares que liberam a expressão de uma série de genes hipertróficos ¹⁷. Dentre essas vias temos o alvo mamífero do complexo rapamicina 1 (mTORC1), um complexo proteico fundamental na ativação de fatores de iniciação eucariotos, os chamados eIFs, que são responsáveis por recrutar subunidades ribossomais e RNA mensageiros para iniciar o processo de tradução proteica ²⁰. A atividade de mTORC1 é crucial para o acometimento da síntese proteica que resultara na hipertrofia cardíaca adaptativa ou mal adaptativa, sendo essa atividade crescente durante o processo hipertrófico (**Figura 5**) ²¹. Estímulos hipertróficos, como a hiperatividade adrenérgica via receptores α e β , são capazes de ativar a via mTORC1, sendo que a inibição de mTORC1 em cardiomiócitos submetidos a tratamento com agonistas adrenérgicos impediu o aumento de síntese proteica ^{22; 23}. Demonstrando que a hipertrofia cardíaca induzida por hiper atividade adrenérgica é dependente da atividade de mTORC1, recrutamento de eIFs e do aumento na síntese proteica resultante desse processo.

1.6 Fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1)

Como dito anteriormente, situações de doença cardíaca demandam uma adaptação do coração ao estresse. Devido à alta complexidade do ambiente intracelular, contextos de isquemia e hipoxia geram a formação de proteínas mal dobradas ²⁴. Esses peptídeos mal formados podem gerar agregados proteicos que podem interagir com proteínas de membrana e outros componentes celulares, gerando citotoxicidade e morte de cardiomiócitos ²⁴. Uma das maneiras que os cardiomiócitos e outros tipos celulares reagem a quebra da proteostase se dá através das moléculas chaperonas ²⁴. Proteínas de choque térmico (HSPs), como a HSP90 e HSP70, são chaperonas que atuam diretamente em proteínas mal dobradas tentando reestabelecer sua conformação ideal, quando isso não é possível as HSPs encaminham esses peptídeos para a degradação proteica via proteassoma ou autofagia ²⁴. As chaperonas HSP90 e HSP70 tem sua expressão aumentada em resposta a isquemia e demonstram ter papel protetor no infarto do miocárdio ^{25; 26}. É importante salientar que as chaperonas não atuam sozinhas, elas possuem moléculas auxiliadoras chamadas de co-chaperonas.

A fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1) foi descoberta em 1989 por Nicolet e colaboradores ²⁷. Sua descoberta se deu ao observar seu aumento de expressão em leveduras submetidas a choque térmico ²⁷. Futuramente, identificou-se que STIP1 ou seu homólogo humano a proteína organizadora de HSPs (HOP) atuavam como moléculas co-chaperona ²⁸. Sua função na proteostase se dá auxiliando o transporte de proteínas clientes da HSP70 para a HSP90, sendo esse processo fundamental para a maturação conformacional proteica (**Figura 6**) ²⁸. A STIP1 é constituída pelos domínios TPR1, TPR2A, TPR2B, DP1 e DP2, sendo os domínios TPR fundamentais para a ligação nas chaperonas HSP90 e HSP70 (**Figura 7**) ²⁸. A STIP1 pode ser fosforilada em diversos sítios, de forma que a fosforilação no sítio S189 pela caseína quinase 2 (CK2) favorece sua presença no núcleo e a adição de grupo fosfato no sítio T198 pela quinase dependente de ciclina (Cdc2) induz maior presença no citoplasma ²⁸. A modulação da localização nuclear de STIP1 por CK2 e Cdc2 pode estar relacionada a sua relevância na embriogênese, uma vez que a deleção completa de STIP1 não é compatível a vida, pois embriões murinos STIP1-Knockout não desenvolvem após a fase embrionária E10.5 com prejuízo na progressão de blastocistos ²⁹. Além da fosforilação, outra modificação pós traducional em STIP1 se dá pela sumoilação, onde a proteína inibidora de STAT1 ativada (PIAS1) pode catalisar a ligação de moléculas SUMO em diversos sítios de STIP1, modulando sua presença nuclear ²⁸. É comum encontrar a STIP1 no núcleo em condições de estresse celular, fenótipo esse que vai de encontro a sumoilação de STIP1 por se tratar de um evento que ocorre em resposta a dano ao DNA ²⁸. A função nuclear de STIP1 ainda não é bem elucidada, porem o fato de a HSP90 ser encontrada junto de STIP1 no núcleo faz possível hipotetizar que STIP1-HSP90 podem atuar na ligação e controle de proteínas nucleares.

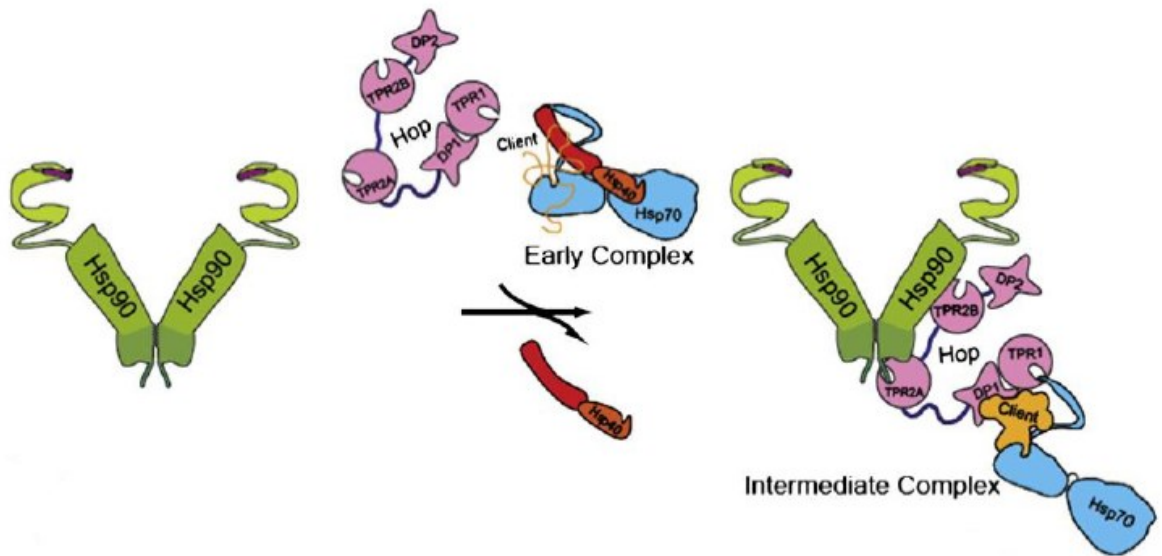


Figura 6 - Transporte de proteínas clientes da chaperona HSP90 para HSP70 de forma dependente de STIP1³⁰.

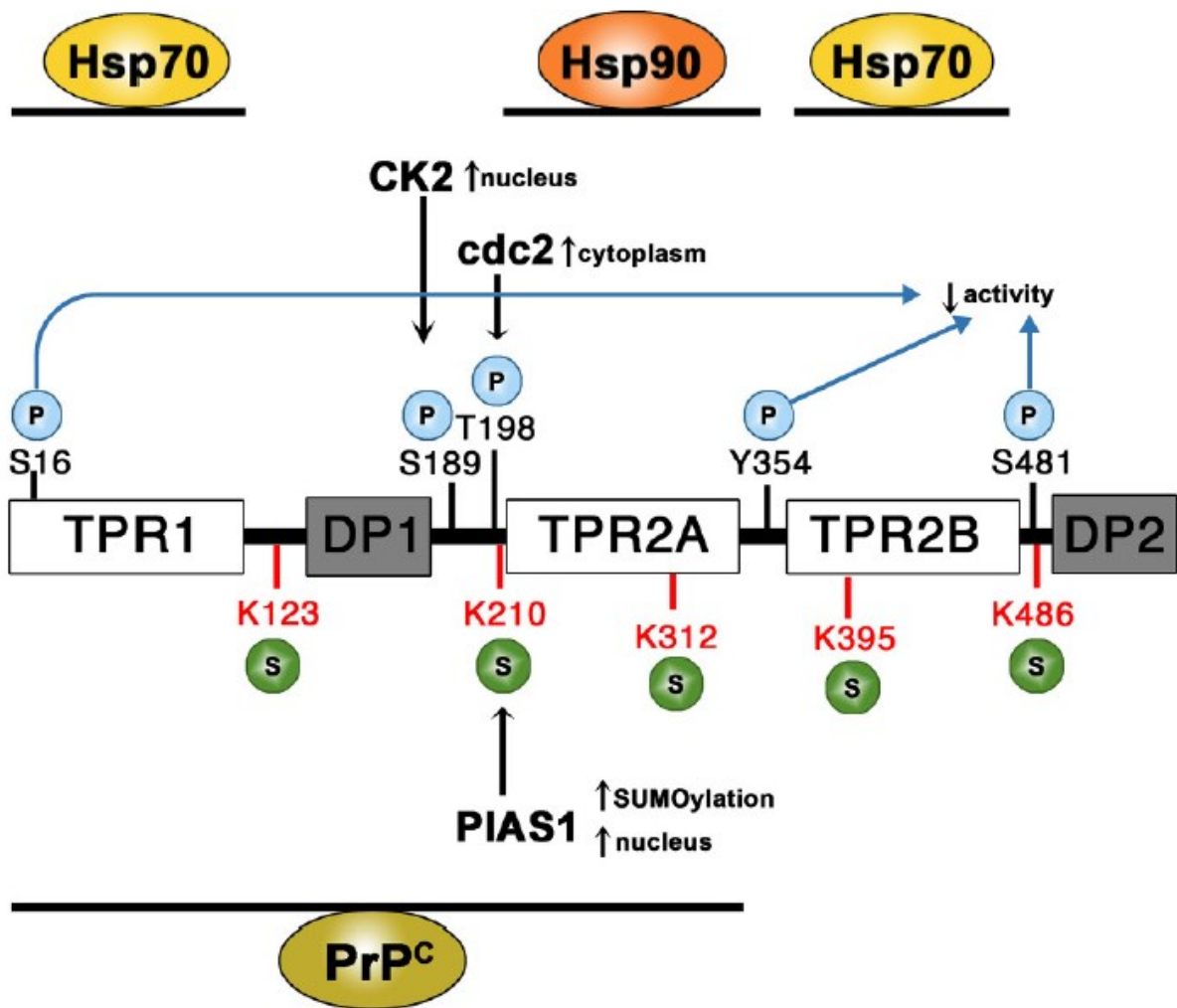


Figura 7 - Domínios da proteína STIP1 bem como seus sítios de fosforilação (em azul) e SUMOilação (em vermelho). Os domínios TPR1, 2A e 2B fundamentais para a ligação entre STIP1-HSP90-HSP70, bem como o TPR1 e 2A para a ligação STIP1-PrP^c ²⁸.

1.6.1 STIP1 na isquemia

Apesar de STIP1 ser expressa em vários tipos celulares, a maioria dos estudos sobre a proteína são no contexto do sistema nervo central ²⁸. Em contexto de isquemia cerebral em murinos e em neurônios submetidos a privação de oxigênio e glicose a STIP1 tem sua expressão aumentada ³¹. Shin-Da Lee e colaboradores demonstraram que esse aumento da expressão de STIP1 na hipoxia é dependente do fator induzível por hipoxia 1 α (HIF-1 α) ³¹. Utilizando um vetor de expressão de luciferase mediado pelo promotor de STIP1, foi demonstrado um aumento da atividade promotora em neurônios submetidos a hipoxia, de forma que a mutação no sítio de ligação de HIF-1 α na região promotora impede essa responsividade a baixa de oxigênio ³¹.

Além de ser induzível a hipoxia, ao realizar isquemia cerebral em murinos, Beraldo e colaboradores demonstraram que animais haploinsuficientes para STIP1 (*STIP1^{+/-}*) apresentavam maior área infartada e menor sobrevivência frente ao estímulo ²⁹. Além disso, foi demonstrado que neurônios *STIP1^{+/-}* morriam mais em resposta a privação de oxigênio e glicose quando comparado a um grupo do tipo selvagem (WT) ²⁹. Interessantemente, astrócitos e fibroblastos de origem cerebral secretam STIP1 em resposta a hipoxia, sendo que o tratamento com STIP1 exógena impede a morte celular de neurônios WT e *STIP1^{+/-}* submetidos a privação de oxigênio e glicose ²⁹. É conhecido que a STIP1 pode se ligar a proteína priônica celular (PrP^c) que se localiza na face extracelular da membrana plasmática de neurônios ³². Ao submeter neurônios PrP^c-Knockout a privação de oxigênio e glicose foi percebido que o tratamento com STIP1 exógena não impediu a morte celular, demonstrando a dependência de PrP^c na proteção a hipoxia gerada por STIP1 ^{29;33}. A proteção ao estresse celular mediada pela ligação entre STIP1-PrP^c em parte é dependente da ativação do influxo de Ca²⁺ pelos receptores nicotínicos $\alpha 7$ por esse complexo ³³. Além disso, STIP1-PrP^c também podem ativar a via AKT/mTOR/mTORC1 que culmina no aumento de síntese proteica em neurônios ³⁴.

1.6.2 STIP1 no coração

Apesar de se saber que STIP1 é expressa no coração, suas funções no órgão ainda não são bem elucidadas ³⁵. Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a investigar o papel dessa proteína no contexto cardíaco ³⁶. Inicialmente averiguamos e confirmamos a expressão de STIP1 em corações humanos e, interessadamente, identificamos uma redução da expressão em pacientes com insuficiência cardíaca (**Figura 8A**) ³⁶. Afim de averiguar mais afundo as consequências da redução de STIP1 para a função cardíaca, avaliamos diversos parâmetros funcionais e estruturais em camundongos *STIP1^{+/-}*, que apresentam redução na expressão de STIP1 em cerca de 50% (**Figura 8B**), sendo esses níveis similares a pacientes com insuficiência cardíaca ³⁶. Em parâmetros basais não identificamos nenhuma alteração na função cardíaca, medida por meio de ecocardiografia, bem como nos padrões histológicos ou no crescimento do órgão (**Figura 8C-G**), demonstrando que a expressão reduzida de STIP1 não impacta o desenvolvimento natural do coração bem como sua função ³⁶. No entanto, ao desafiar esses animais com um tratamento pelo isoproterenol (ISO), um agonista β -adrenérgico não seletivo, durante sete dias, foram identificadas diferenças importantes com relação a animais WT. Como já esperado, ambos os animais WT e *STIP1^{+/-}* aumentaram a relação peso do coração pelo tamanho da tibia em resposta ao ISO (**Figura 8C**), porem os animais *STIP1^{+/-}* apresentaram maior presença de células inflamatórias em seu tecido quando

comparado ao WT (**Figura 8D-E**)³⁶. Interessantemente, cardiomiócitos dos animais *STIP1*^{+/-} não hipertrofiaram em resposta ao ISO (**Figura 8F-G**), sendo esse um efeito clássico do fármaco e que ocorreu em animais WT. Este dado indica que o aumento do coração dos animais *STIP1*^{+/-} em resposta ao ISO não se dá pelo crescimento dos cardiomiócitos, mas sim pelo maior conteúdo inflamatório, edema e fibrose, este último não mostrado aqui³⁶.

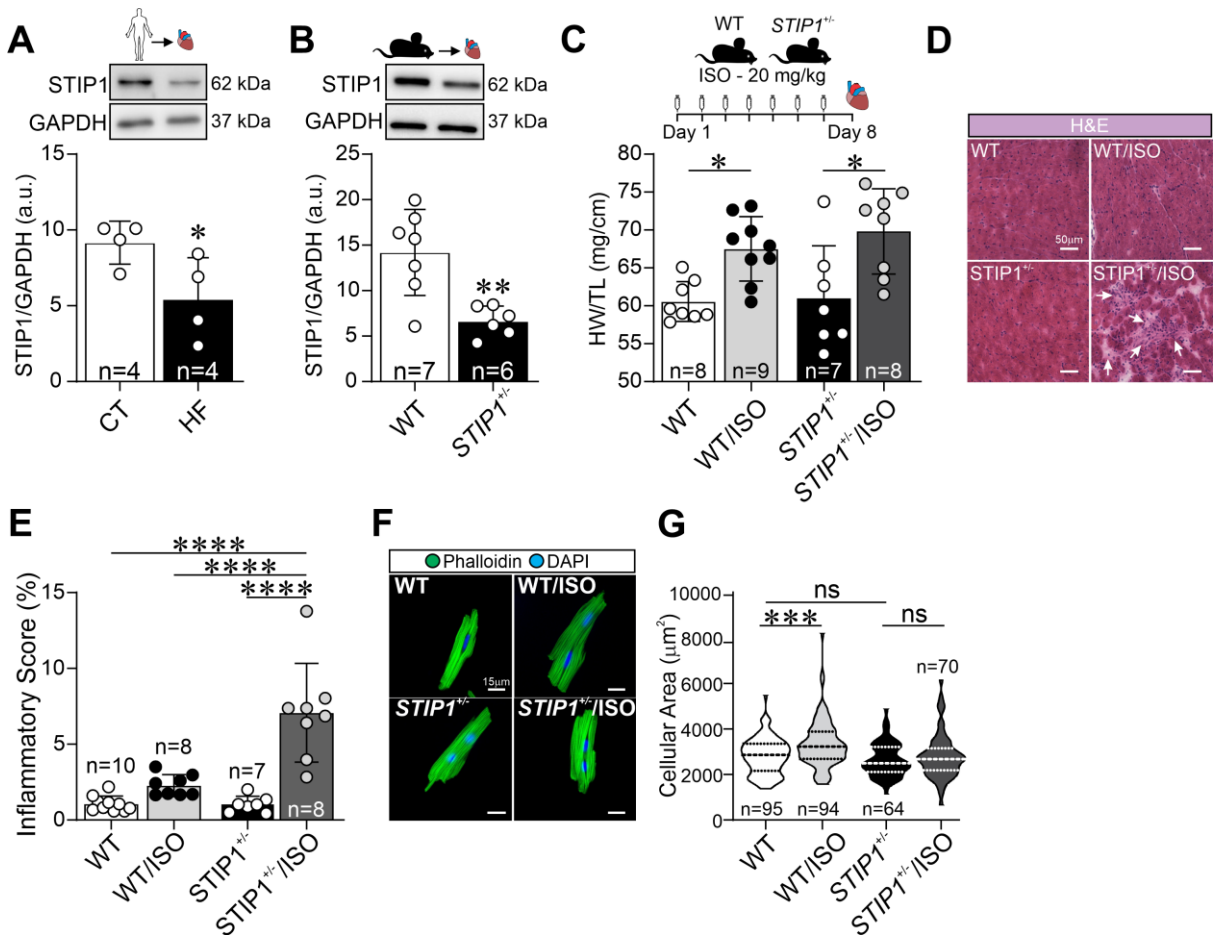


Figura 8 - Níveis reduzidos de STIP1 tornam os camundongos mais suscetíveis a lesões miocárdicas induzidas por adrenérgicos. A-B. Acima, imagens representativas de Western blot. Abaixo, quantificação mostrando níveis reduzidos da proteína STIP1 em tecido cardíaco de pacientes humanos com cardiomiopatia dilatada não isquêmica (A) e de camundongos *STIP1*^{+/-} (B). C. Acima, esquema do tratamento com ISO (20 mg/kg) por 7 dias e delineamento experimental para caracterização da amostra cardíaca. Abaixo, relação peso do coração/comprimento da tíbia (HW/TL). D. Corte representativo do coração corado com hematoxilina e eosina mostrando uma presença marcante de células inflamatórias (setas) em camundongos *STIP1*^{+/-}. E. Gráfico de barras mostrando a quantificação do score inflamatório em porcentagem do tecido. F. Imagens de miócitos ventriculares isolados corados com faloidina. G. Gráfico de violino mostrando aumento da área celular apenas em miócitos ventriculares de camundongos WT tratados com ISO. Em A, B, C e E: os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Em A e B, o teste t de Student foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas. **p*<0,05; ***p*<0,01. Em C, E e G: a ANOVA two way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, foi utilizada para determinar as diferenças estatísticas. **p*<0,05; ****p*<0,001; *****p*<0,0001. *n* = número de amostras ou células para todos os experimentos³⁶.

Durante meu mestrado, busquei averiguar quais vias celulares eram alteradas nesse contexto de estresse adrenérgico cardíaco nos camundongos *STIP1^{+/-}*, afim de identificar os mecanismos celulares por de trás dos fenótipos encontrados. Dessa forma, realizamos um experimento de proteômica em amostras cardíacas de camundongos WT e *STIP1^{+/-}* tratados com ISO por sete dias (**Figura 9A**)³⁷. Inicialmente, identificamos mais de 350 proteínas diferencialmente expressas, quando comparamos os dois grupos. Confirmando a acurácia da proteômica, STIP1 foi identificada como regulada negativamente (seta, **Figura 9B**)³⁷. Ao realizar uma análise de agrupamento de proteínas pelo software ingenuity pathway analysis- Quiagem (IPA), identificamos diversos grupos de proteínas relacionadas com processos patológicos, como hipertrofia cardíaca, morte celular, fibrose, estresse oxidativo e a resposta antioxidante do fator de transcrição NRF2 (**Figura 9C**)³⁷. Interessantemente foi identificado uma inibição da via celular de NRF2 através de análise z-score (**Figura 9D**)³⁷. Como dito anteriormente, o NRF2 é uma proteína sensível e protetora ao processo de estresse oxidativo, um fenótipo que acontece no coração em resposta ao estresse metabólico gerado pelo tratamento com ISO. Dessa forma, avaliamos a expressão de NRF2 no tecido cardíaco dos animais WT e *STIP1^{+/-}* tratados com ISO. Como esperado, NRF2 aumenta sua expressão em resposta ao ISO no coração de animais WT, fenótipo esse que não ocorre nos animais *STIP1^{+/-}* (**Figura 9E-F**), validando os achados da proteômica³⁷. Outro processo identificado na análise z-score foi a predição de ativação do processo de fibrose (**Figura 10A**), evento que foi validado ao identificarmos maior deposição de colágeno no tecido cardíaco dos animais *STIP1^{+/-}*, quando comparado ao WT/ISO (**Figura 10B-C**)³⁷. Ao agrupar as proteínas diferencialmente expressas na base de dados Reactome, identificamos uma série de proteínas reguladas negativamente, relacionadas ao processo de metabolismo de RNA, tradução proteica e pertencentes a via mTORC1(**Figura 10D-E**)³⁷. Esse fenótipo vai de encontro a deficiência de hipertrofia nos cardiomiócitos *STIP1^{+/-}* em resposta ao ISO, uma vez que o processo de síntese proteica é fundamental para o crescimento dos cardiomiócitos. Concluindo, esses resultados demonstram o papel relevante da STIP1 na adaptação cardíaca ao estresse adrenérgico, atuando no processo hipertrófico adaptativo e no combate ao estresse oxidativo. Apesar do avanço desses achados em demonstrar o papel da STIP1 no coração, ainda não é elucidado como e por quais vias a STIP1 modula a adaptação ao estresse em resposta a hiperatividade adrenérgica. Neste trabalho de tese nosso objetivo é identificar os mecanismos dependentes da STIP1 no coração durante situação de estresse.

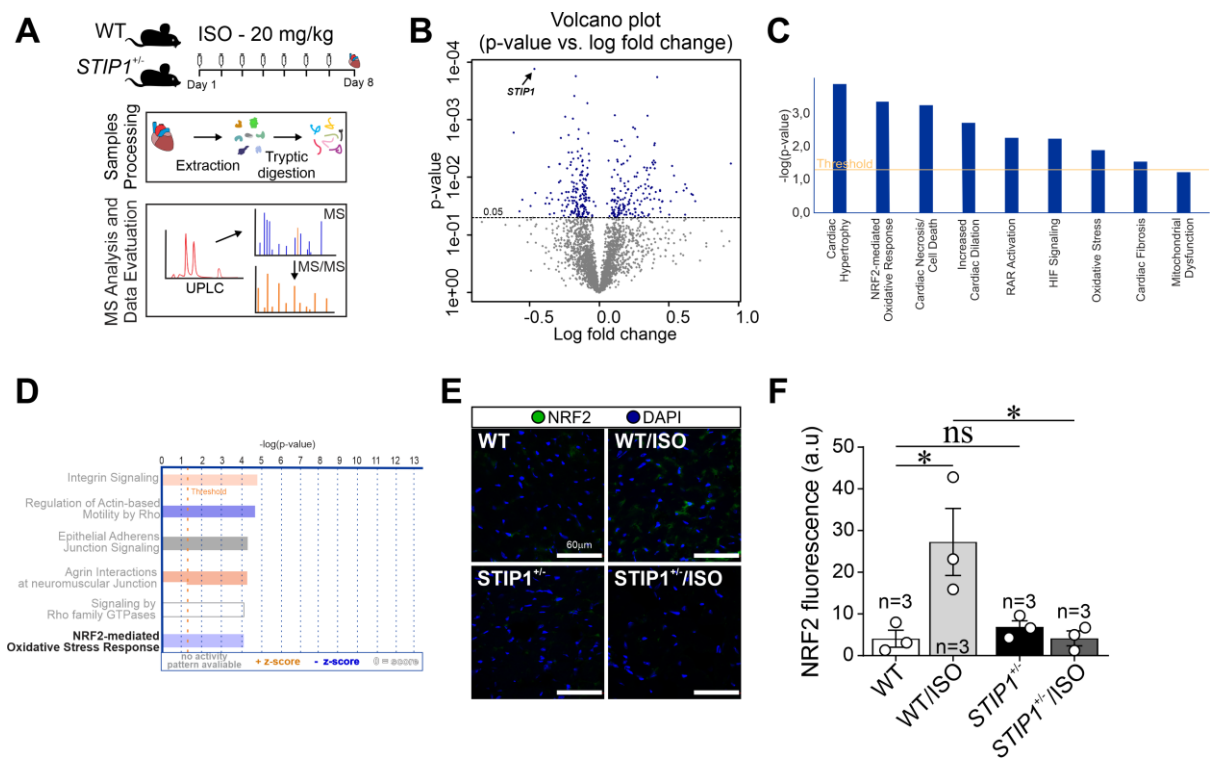


Figura 9 - O coração STIP1^{-/-}/ISO apresenta uma marcada regulação negativa das vias de sinalização relacionadas à tradução. A. Esquema do delineamento experimental proteômico para os experimentos com corações WT/ISO e STIP1^{-/-}/ISO. B. Gráfico de vulcão mostrando as proteínas desreguladas (azul) em corações STIP1^{-/-}/ISO versus WT/ISO, destacando 168 proteínas com expressão reduzida e 164 com expressão aumentada. STIP1 estava entre as proteínas com expressão reduzida no coração STIP1^{-/-}/ISO (seta). C. As proteínas com expressão diferencial no coração STIP1^{-/-}/ISO estavam principalmente relacionadas à remodelação cardíaca adversa, conforme identificado pela IPA. D. Predição da modulação de vias celulares de acordo com o perfil proteômico. Laranja: ativação; Azul: inibição; Branco: não modulado diferencialmente; Cinza: sem padrão de ativação disponível. E. Imunofluorescência de tecido cardíaco marcado para NRF2 (verde) e DAPI (azul). F. Gráfico de barras mostrando a intensidade de fluorescência de NRF2 entre os grupos. Em F: ANOVA two way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, foi utilizada para determinar as diferenças estatísticas. * $p < 0,05$. n = número de amostras ou células para todos os experimentos ³⁷.

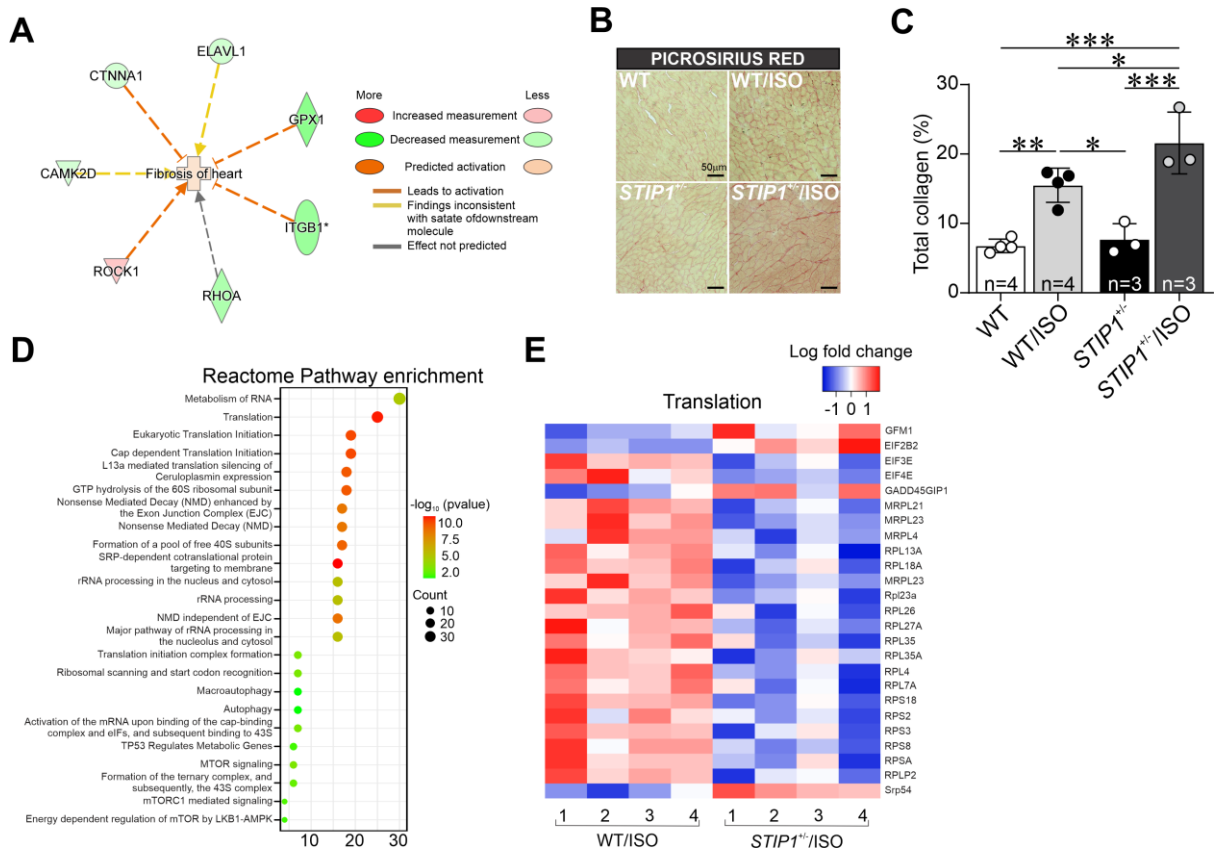


Figura 10 - Coração *STIP*^{-/-} apresenta maior fibrose e prejuízo na maquinaria de síntese proteica em resposta ao tratamento com ISO. A. A análise IPA mostrou a ativação (regulação positiva) da "fibrose" (escore $z = 0,15$, $p = 0,04$). B. Coloração representativa com vermelho picrosírio mostrando o conteúdo total de colágeno. C. Gráfico de barras mostrando a quantificação do colágeno total. D. Análise de enriquecimento de vias do Reactome. O metabolismo do RNA e diversas vias relacionadas à tradução foram alterados em *STIP*^{-/-}/ISO em comparação com WT/ISO. E. O heatmap dos alvos das vias de tradução indicou uma acentuada redução nos valores de log fold change de diversos fatores de elongação e proteínas ribossomais no coração *STIP*^{-/-}/ISO. Azul = redução; Vermelho = aumento. Em C: ANOVA two way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, foi utilizada para determinar as diferenças estatísticas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. n = número de amostras ou células para todos os experimentos³⁷.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o impacto da deleção da STIP1 no processo de síntese proteica *de novo* na hipertrófica cardíaca e em cardiomiócitos submetidos a hipoxia.

2.2 Objetivos específicos

- Averiguar a dependência de STIP1 na hipertrofia de cardiomiócitos em cultura.
- Avaliar a dependência de STIP1 na ativação da via mTORC1 e da síntese proteica em cardiomiócitos submetidos a hiperatividade adrenérgica.
- Avaliar o impacto da deleção de STIP1 em cardiomiócitos submetidos a hipoxia.
- Identificar a dependência de STIP1 na ativação de NRF2 em cardiomiócitos submetidos a hipoxia.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo animal

Camundongos neonatais com 0 a 3 dias e seus progenitores, heterozigotos para STIP1 (STIP1^{+/-}) e do tipo selvagens (WT) da mesma idade, foram utilizados neste estudo. Os animais foram alojados no biotério, mantidos sob fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro), com água e ração ad libitum. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da UFMG (CEUA 97/2022, 138/2018).

3.2 Cultura, transfecção, imunofluorescência e tratamento de cardiomiócitos

Cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) ou de camundongo (NMCMs) foram isolados de animais com 1 a 3 dias de idade como já descrito ³⁸, e foram transfectados com 50 nmol/L de siRNA (STIP1_ID: s140524; PrPc_ID: s128285 Thermofisher Scientific) diluído em reagente de transfecção Lipofectamine RNAiMAX (13778150; Thermofisher Scientific). Para a transfecção com DNA plasmidial, utilizamos Lipofectamine 3000 (L3000015; Thermofisher Scientific). O pSTIP1-GFP foi gerado conforme descrito anteriormente ³⁹ e o pZsGreen-N1 foi fornecido pela Addgene. Após 24 horas, as células foram tratadas com ISO (20 µmol/L) ou IGF-1 (50 nmol/L) uma vez ao dia durante 48 horas, ou com CoCl₂ (500 µmol/L) por até 12 horas. Para imunofluorescência, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) durante 15 minutos. Após permeabilização (PBS/Triton 0,5%) e bloqueio por 1 hora, as células foram incubadas com anticorpos primários durante a noite a 4 °C. Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram anti-STIP1 (1:200, anticorpo produzido internamente pela Bethyl Laboratories ²⁹), anti- α -actinina (1:150; Sigma-Aldrich; RRID: AB_476766) e anti-NRF2 (1:100; Abcan; RRID: AB_881705). Anticorpos secundários utilizados foram anti-coelho Alexa Fluor 488 (A11034, Thermo Fisher Scientific) e anti-camundongo Alexa Fluor 633 (A21052, Thermo Fisher Scientific). A coloração nuclear foi obtida em células incubadas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:500). As imagens foram adquiridas no sistema Cytation 5 ou confocal LSM 880 Airyscan na unidade CAPI (ICB/UFMG). Um grupo separado de células foi marcado com a sonda FM1-43FX (4 µmol/L, F35355; Thermo Fisher Scientific) por 60 minutos ou pela sonda di-hidroetídio (DHE) (5 µmol/L, 309800; Sigma) por 30 minutos, seguido de fixação com PFA a 4% por 15 minutos. Para a quantificação da taxa de síntese proteica, os cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) foram incubados com 1 µmol/L de puomicina (P8833, Sigma) por 30 minutos. A proteína total foi então extraída e submetida à análise por Western blot, conforme descrito abaixo.

3.3 Análise de Western blot

Um total de 7 a 30 µg do conteúdo proteico extraído de NRCMs foi separado por SDS-PAGE e posteriormente analisado por Western blotting. Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram anti-STIP1 (1:5000, Bethyl Laboratories ²⁹), anti-PrP^c (1:1000, Abcam, RRID: AB_882135) e anti-puromicina (1:5000, Sigma, MABE343, RRID: AB_2566826). Os anticorpos secundários foram aplicados de acordo com a espécie hospedeira dos anticorpos primários (1:15000, IgG anti-coelho de cabra, Sigma-Aldrich A3687; 1:15000, IgG anti-camundongo de cabra, Sigma-Aldrich A0545). A imunodeteccção foi realizada utilizando quimioluminescência aprimorada, detectada com o equipamento LAS 4000 (GE HealthCare Life Science). Os níveis de proteína foram expressos como uma razão de densidades ópticas.

3.4 Imunoprecipitação

A PrP^c foi imunoprecipitada de amostras de NRCM utilizando esferas magnéticas (LSKMAGA02, Millipore). 300 µg da amostra de proteína foram incubados durante a noite com 2 µg de anticorpo anti-PrPc (ab52604, Abcam, RRID: AB_882135) em PBS, conforme descrito anteriormente ⁴⁰. As amostras foram analisadas por Western blotting utilizando anticorpos direcionados contra PrP^c e STIP1 (1:5000, Bethyl Laboratories ²⁹). Amostras de NRCM com expressão de PrPc silenciada foram utilizadas para validar a especificidade da reação. Lisados de NRCM foram utilizados como controle positivo do immunoblotting (input).

3.5 Análises de qPCR

O RNA foi extraído de NRCMs isolados, e o cDNA foi sintetizado conforme descrito anteriormente ⁴¹. Os primers usados no estudo estão contidos na **Tabela 1**. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando a expressão do gene S26 para normalizar os dados.

Gene	Sentido	Sequência
S26	Fw	CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT
S26	Rev	CGATTCCTGACAACCTTGCTATG
STIP1	Fw	TGAGTGCTGGGAACATTGATG
STIP1	Rev	AGTCTCCTTTCTTGCGTAGG
ATF4	Fw	GGTTCTGTCTTCCACTCCA
ATF4	Rev	AAGCAGCAGAGTCAGGCTTTC
CHOP	Fw	CCACCACACCTGAAAGCAGAA
CHOP	Rev	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
PrPc	Fw	TGGCGAACCTTGCTACTG
PrPc	Rev	CTGAGGTGGGTAACGGTTGC

Tabela 1 - Primers usados no presente estudo.

3.6 Contratilidade de cardiomiócitos neonatais

A contratilidade dos cardiomiócitos foi registrada usando uma câmera digital CMOS de alta velocidade (SILICON VIDEO 642 M, EPIX, Inc.) a 100 quadros por segundo, produzindo imagens de 8 bits com resolução de 640×480 pixels e escala espacial de 0,25 µm/pixel, com uma objetiva de 40x. Os parâmetros de contratilidade foram quantificados de acordo com o protocolo descrito por Scalzo et al.⁴² usando o software CONTRACTIONWAVE⁴³.

3.7 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida pelo kit Live/Dead (L23101; ThermoFisher Scientific). As células vivas e mortas foram marcadas conforme as instruções do fabricante. Após a marcação, as células foram fixadas e as imagens foram adquiridas em um microscópio Bio Tek Cytation 5 na unidade CAPI (ICB/UFMG).

3.8 Fluorescência por Reflexão Interna Total (TIRF)

As imagens foram adquiridas em um microscópio Leica TIRF Infinity HP equipado com uma objetiva HC PL APO 63×/1,47 NA Oil CORR TIRF. A excitação foi realizada utilizando um laser de alta potência de 488 nm. O ajuste do ângulo de incidência para atingir o ângulo crítico de reflexão interna total foi realizado automaticamente pelo software LASX, que também controlou toda a aquisição. Para o modo TIRF, a separação espectral foi realizada com um filtro QWF-T (quádrupla banda), que abrange as seguintes faixas: excitação em 400/28, 490/20, 561/15 e 640/20 nm, e filtros de emissão em 448/48, 531/32, 598/40 e 705/90 nm. A fluorescência foi detectada com uma câmera CMOS PhotometricsPrime95B (1,4 MP, 95% QE, pixels de 11 µm). As amostras permaneceram no sistema de incubação do microscópio, mantido a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade controlada durante toda a aquisição. Após a calibração do módulo TIRF, as imagens foram registradas em três profundidades de campo evanescente: 250 nm, 150 nm e 90 nm. Além das imagens TIRF, também foram adquiridas imagens de fluorescência de campo amplo, utilizando uma lâmpada de mercúrio HXP para excitação e o cubo de fluorescência RHOD (ex.: 546/10 nm; em.: 585/40 nm) para separar os espectros de excitação e emissão.

3.9 Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média \pm SD. No gráfico de violino, as linhas tracejadas grossas e finas indicam as medianas e os percentis 25 e 75, respectivamente. As formas coloridas mostram as estimativas de densidade dos dados. Os dados foram testados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados não normais foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA de uma via não paramétrica) ou o teste t de Mann-Whitney não paramétrico. A significância estatística entre dois grupos foi determinada usando um teste t de Student não pareado bicaudal. ANOVA de uma e duas vias foram usadas para avaliar a influência das variáveis em cada grupo experimental, seguidas por testes post hoc apropriados. Todas as análises foram realizadas usando o GraphPad Prism (versão 9.4.1). O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 A via celular STIP1-PrP^c é fundamental para a hipertrofia de cardiomiócitos induzida por ISO

Apesar de demonstrarmos a relevância da STIP1 para a adaptação ao estresse cardíaco em trabalhos anteriores, esse conjunto de dados apresenta algumas limitações. O animal *STIP1*^{+/-} apresenta a redução na expressão de STIP1 de forma sistêmica e não restrita ao coração, o que limita nosso conhecimento sobre o impacto direto e localizado da STIP1 em cardiomiócitos. Outro fato é que apesar dos dados proteômicos demonstrarem um prejuízo no processo proteico isso ainda não foi medido ou validado em cardiomiócitos. Dessa forma, buscamos vencer essas questões citadas com os resultados a seguir.

4.1.1 A STIP1 é relevante para a hipertrofia de cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) em resposta apenas ao ISO e não a IGF-1

Com o objetivo de investigar a relevância de STIP1 na hipertrofia de cardiomiócitos, realizamos o isolamento de cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs), transfectamos com um siRNA para STIP1, seguido de tratamento com ISO e IGF-1 afim de mediar a hipertrofia das células (**Figura 11A**). O siRNA foi capaz de reduzir a expressão de STIP1 em RNAm (**Figura 11B**) e em níveis proteicos (**Figura 11C-D**), tendo sido validado por PCR em tempo real, western blott e imunofluorescência respectivamente. O silenciamento de STIP1 não alterou o tamanho dos cardiomiócitos em níveis basais (**Figura 11E-F**), corroborando com os achados dos experimentos *in vivo*. Ao serem submetidos a 48 horas de tratamento com ISO os cardiomiócitos silenciados para a STIP1 não hipertrofiaram (**Figura 11E-F**), de forma que cardiomiócitos mock aumentaram seu tamanho como esperado (**Figura 11E-F**), validando mais uma vez os achados nos animais *STIP1*^{+/-}. Interessantemente, ao tratarmos os cardiomiócitos com IGF-1, ambos os contextos, mock ou silenciados, hipertrofiaram em resposta ao tratamento (**Figura 11G-H**). É importante salientar que, diferentemente do ISO, o IGF-1 é considerado um indutor de hipertrofia fisiológica, demonstrando que STIP1 aparenta ter uma relevância restrita ao contexto patológico.

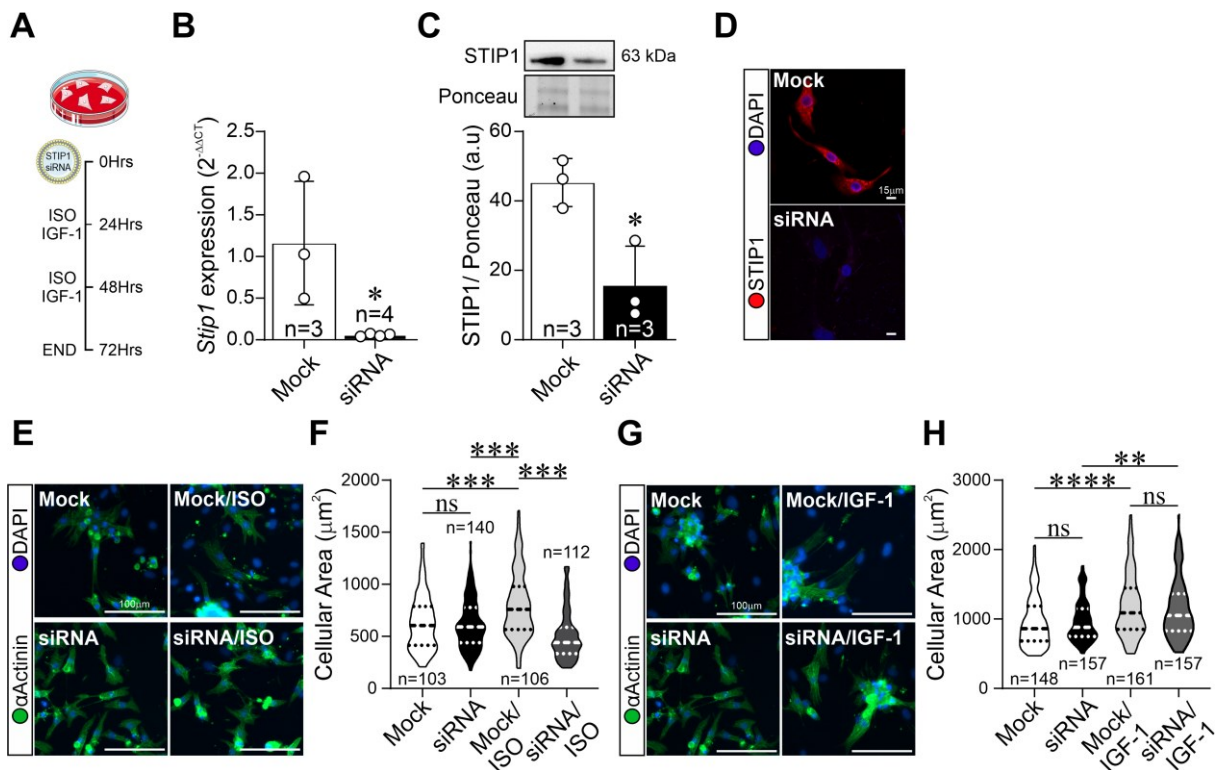


Figura 11 - O silenciamento de STIP1 prejudica a hipertrofia patológica em cardiomiócitos. A. Esquema da transfecção e tratamento *in vitro* de cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs). Os NRCMs foram transfectados com siRNA para STIP1 e submetidos a tratamento com ISO (20 μ M) ou IGF-1 (50 nmol/L) por 48 horas. O silenciamento de STIP1 foi confirmado por qPCR (B), western blott (C) e imunomarcação (D). Em D, as imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes. Vermelho = marcação para STIP1. Azul = DAPI. E. NRCMs representativos marcados com anti- α -actinina. F. Quantificação da área de superfície de NRCMs transfectados ou não com siRNA para STIP1, com ou sem tratamento com ISO. G. NRCMs representativos marcados com anti- α -actinina. H. Quantificação da área de superfície de NRCMs transfectadas ou não com STIP1-siRNA, com ou sem tratamento com IGF-1. B e C: Os dados são apresentados como média \pm SD. O teste *t* de Student foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas. * $p < 0,05$. Em F e H: O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. *n* = número de amostras ou células para todos os experimentos.

A não hipertrofia de cardiomiócitos com redução de STIP1 em resposta ao ISO poderia ser explicada por essas células, possivelmente, possuírem algum prejuízo na sinalização β -adrenérgica. Para testar essa possibilidade, averiguamos a modulação do ISO na contratilidade de NRCMs transfectados com siRNA para STIP1. Ambos os grupos de cardiomiócitos, mock e siRNA, aumentaram a frequência de contração (**Figura 12A**) e a área de encurtamento (**Figura 12B**) em resposta ao ISO, demonstrando que a baixa de STIP1 não altera a responsividade da sinalização β -adrenérgica em NRCMs.

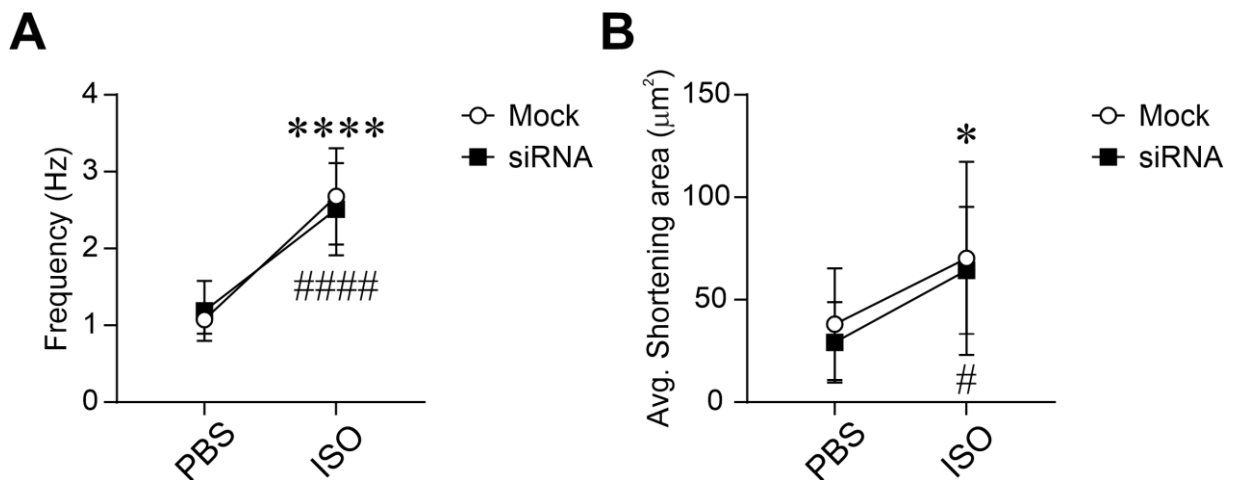


Figura 12 - Redução dos níveis de STIP1 não impacta alterações contráteis induzidas por ISO em NRCMs. O ISO aumentou a frequência de contrações (A) e a área de encurtamento (B) de forma semelhante em NRCMs transfectadas com o controle negativo (mock) e com siRNA para STIP1 (STIP1-siRNA). Os dados são apresentados como média \pm SD. A análise de variância (ANOVA) Two way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, foi utilizada para determinar as diferenças estatísticas. *= $p < 0,05$ ou ****= $p < 0,0001$ em Mock versus Mock/ISO; #= $p < 0,05$ ou ##### $p < 0,0001$ em células siRNA versus células siRNA/ISO. Os dados foram obtidos a partir de pelo menos 3 experimentos independentes.

4.1.2 A STIP1 é importante para a ativação da síntese proteica mediada por ISO

Como já descrito anteriormente, o processo de hipertrofia de cardiomiócitos precede uma ativação e aumento da síntese proteica, um fenômeno denominado de síntese proteica *de novo*. Como a STIP1 se mostra importante para o processo hipertrófico mediado pelo ISO, buscamos averiguar se essa relevância se estende ao processo de síntese proteica. Dessa forma, avaliamos a taxa de síntese proteica de cardiomiócitos com redução de STIP1 em resposta a 24 horas de ISO. Para a avaliação da taxa de síntese proteica, utilizamos do protocolo SUnSET, que consiste na marcação de peptídeos nascentes com o antibiótico puromicina, extração do conteúdo proteico das células e em seguida se é feito o experimento de western blott com as amostras e marcação das membranas com um anticorpo anti-puromicina⁴⁴. A puromicina se liga a peptídeos nascentes através do sítio de ligação de RNAt em ribossomos, fazendo ser possível mensurar a taxa de síntese proteica pela quantidade de puromicina ligada a proteínas de uma amostra. Como já esperado, cardiomiócitos mock aumentam sua taxa de síntese proteica em resposta ao ISO (**Figura 13A-B**), algo que não ocorreu no grupo siRNA, demonstrando um prejuízo nesse processo em cardiomiócitos com redução de STIP1. Além disso, foi identificado no experimento proteômico que proteínas relacionadas a via mTORC1 se apresentaram reguladas negativamente nos corações *STIP1*^{+/-} /isso, quando comparados ao WT/ISO, sendo um desses alvos o fator de alongamento eIF4E. Com o objetivo de validar esse achado, averiguamos a expressão proteica de eIF4E em NRCMs. Demonstramos que os cardiomiócitos silenciados para STIP1 tratados com ISO

apresentam menor expressão de eIF4E, quando comparados ao grupo mock/ISO (**Figura 13C-D**), validando os achados da proteômica e evidenciando que a STIP1 é relevante para o processo de indução e ativação da síntese proteica.

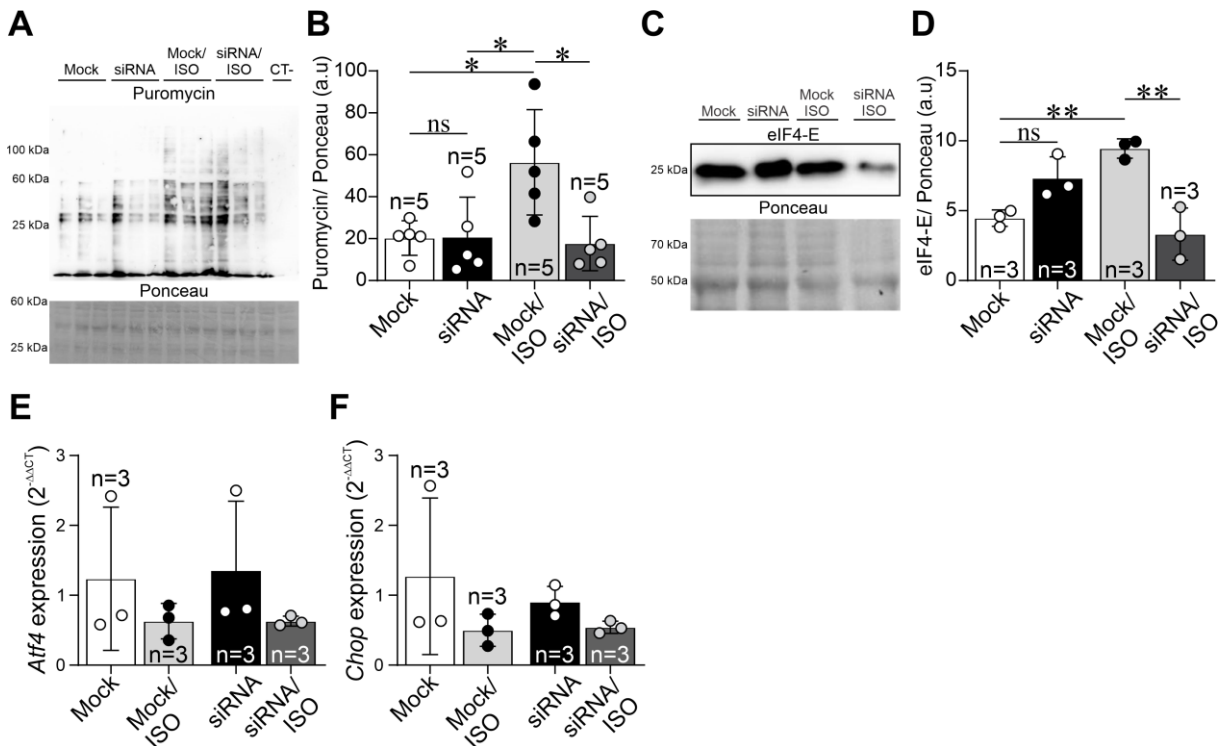


Figura 13 - O silenciamento de STIP1 prejudica a ativação da síntese proteica induzida por ISO em cardiomiócitos sem ativar estresse de retículo. A. Acima, imagem de Western blot. Abaixo, coloração com Ponceau confirmando a igualdade de quantidade de proteínas. B. A incorporação de puromicina foi elevada em NRCMs tratados com Mock/ISO em relação às células STIP1-siRNA/ISO, indicando que a depleção de STIP1 prejudica a síntese proteica induzida por ISO. C. Acima, coloração de Western blot. Abaixo, coloração com Ponceau confirmando a igualdade de quantidade de proteínas. D. O tratamento com ISO induz a regulação positiva da expressão de eIF4E em células transfectadas com o vetor de transfecção vazio (mock), uma resposta que é marcadamente prejudicada em cardiomiócitos sem STIP1. E. O silenciamento de STIP1 não gera aumento da expressão de Atf4 em contexto basal ou de hiperatividade adrenergica. F. O silenciamento de STIP1 não gera aumento da expressão de Chop em contexto basal ou de hiperatividade adrenergica. Em B, D, E e F: Os dados são representados como média \pm SD. Em B, E e F: ANOVA Two way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usada para determinar as diferenças estatísticas. Em D: ANOVA de Two way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak foi usada para determinar as diferenças estatísticas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Os dados foram obtidos de pelo menos 3 experimentos independentes. n = número de amostras para todos os experimentos.

O prejuízo no processo de síntese proteica pode ocorrer em resposta ao estresse de retículo endoplasmático (ER)⁴⁵. Esse evento é caracterizado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no ER seguido de aumento da expressão de fatores sensíveis a esse processo, como é o caso de ATF4 e CHOP, seguido de inibição da síntese proteica na célula⁴⁵. Com isso em mente, fomos averiguar a ocorrência de estresse de ER em NRCMs com baixa de STIP1 tratados com ISO através da expressão dos marcadores desse processo. Nenhum dos grupos apresentou qualquer alteração na expressão de ATF4 ou CHOP (**Figura 13E-F**),

evidenciando que o prejuízo no aumento da síntese proteica em cardiomiócitos com baixa de STIP1 não se deve ao processo de ER.

4.1.3 Eixo STIP1-PrP^c participa da regulação da hipertrofia de cardiomiócitos dependente do ISO

A STIP1 aparenta ser importante para o processo hipertrófico de cardiomiócitos em resposta a estímulo patológico, bem como na síntese proteica que precede essa resposta. Dessa forma nos perguntamos, como a STIP1 poderia modular a síntese proteica e a hipertrofia em cardiomiócitos? Como citado anteriormente, em modelos de acidente vascular encefálico, astrócitos secretam STIP1, que por sua vez se liga a PrP^c presente na face extracelular da membrana plasmática de neurônios, modulando vias neuroprotetoras e aumento de síntese proteica via mTORC1. Dessa forma, investigamos se NRCMs são capazes de secretar STIP1. Incubamos NRCMs com a sonda FM 1-43, que é capaz de se ligar a vesículas recicladas de exocitose e identificamos diversas áreas de co-localização entre STIP1 e vesículas (**Figura 14A**). Isso demonstra que cardiomiócitos são capazes de secretar STIP1, uma vez que essas vesículas fazem parte do sistema secretor. Além disso, transfectamos NRCMs com um vetor plasmidial que expressa STIP1 ligada a uma molécula verde fluorescente (pSTIP1-GFP), por meio desta estratégia foi possível averiguar a localização de STIP1 em tempo real em cardiomiócitos funcionalmente ativos. Ao averiguarmos a marcação de STIP1-GFP em microscópio TIRF, foi possível identificar a presença de STIP1 em uma distância de 250nm da membrana plasmática (**Figura 14B**). De forma interessante, o tratamento com ISO induziu alteração significativa do padrão de localização da STIP1-GFP, que mudou de um padrão difuso para uma marcação vesicular (**Figura 14B**). Este dado fortalece a ideia de que cardiomiócitos secretam STIP1 em resposta ao tratamento com ISO.

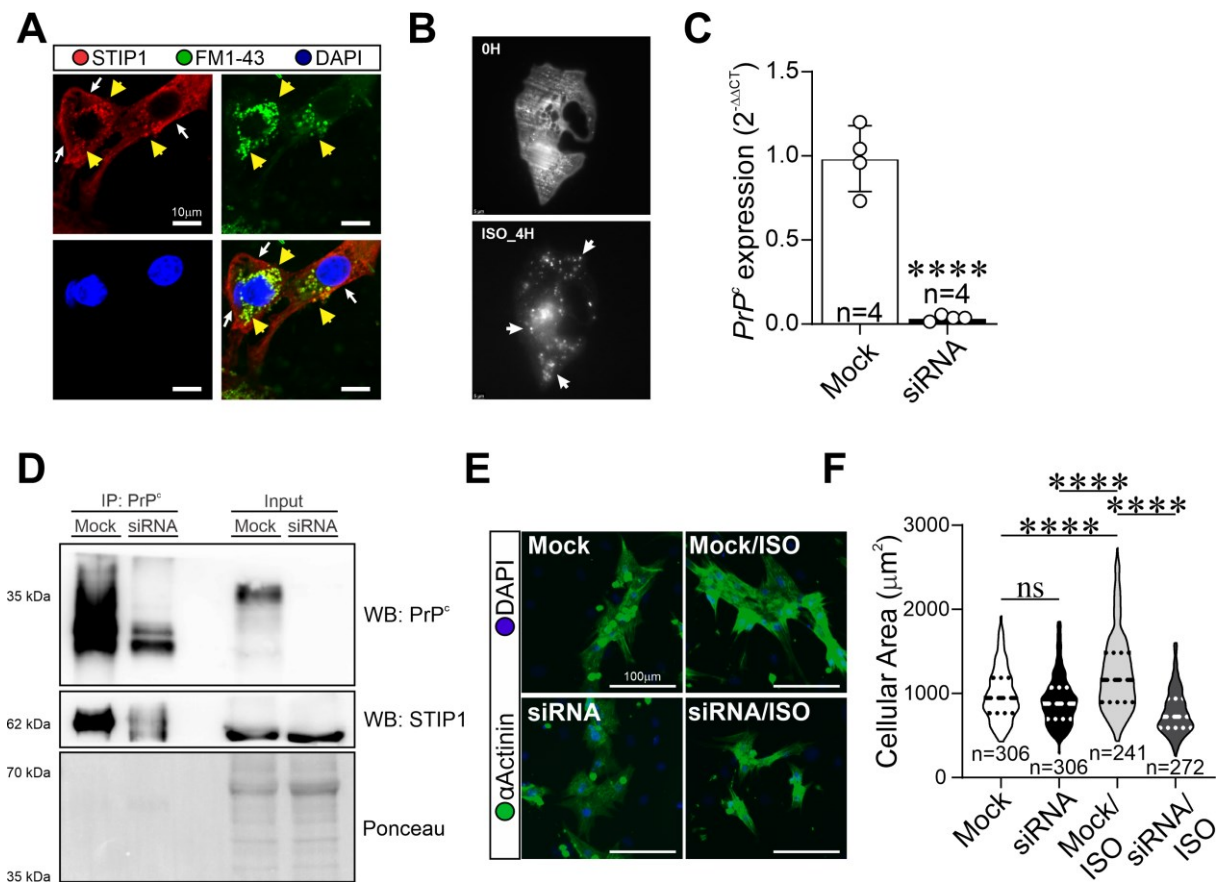


Figura 14 - A interação STIP1-PrP^c impulsiona a ativação dependente de ISO da hipertrofia em cardiomiócitos. A. Em NRCMs, STIP1 se localiza tanto na membrana plasmática (setas brancas) quanto no citosol, onde se co-localiza com vesículas exocitóticas marcadas com a sonda FM1-43FX (pontas de seta amarelas) B. Cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) transfectados com um plasmídeo STIP1-GFP e imagiados por microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRF) com uma profundidade de campo evanescente de 250 nm. Em cima, cardiomiócito controle. Abaixo, o mesmo cardiomiócito mostrado à cima, após 4 horas de estimulação com ISO. A estimulação com ISO promove a localização vesicular de STIP1. C. NRCMs foram transfectadas com siRNA para PrP^c e o silenciamento foi confirmado por qPCR. D. Western blot representativo de amostras imunoprecipitadas (IP) ou lisados de células inteiras (input). Acima, PrP^c aparece em ~35 kDa, exibindo seu padrão característico de bandas triplas. Uma amostra transfectada com siRNA para PrP^c foi usada para validar a imunoespecificidade do anticorpo anti-PrP^c. No meio, STIP1 co-imunoprecipita com PrP^c em NRCMs. Na parte inferior, coloração de Ponceau confirmando a quantidade igual de proteínas. E. Imagens representativas de NRCMs marcadas com anti- α -actinina. F. Quantificação da área de superfície de NRCMs transfectados ou não com siRNA para PrP^c, tratados ou não com ISO. Em C: Os dados são representados como média \pm SD. O teste t de Student foi usado para determinar as diferenças estatísticas. **** $p < 0,0001$. Em F: O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, foi usado para determinar as diferenças estatísticas. **** $p < 0,0001$. Os dados foram obtidos de pelo menos 3 experimentos independentes. n = número de amostras ou células para todos os experimentos.

Em seguida, fomos averiguar a influência de PrP^c no processo hipertrófico em cardiomiócitos, bem como a capacidade de STIP1 e PrP^c de se ligarem nessas células. Para isso, utilizamos de um siRNA que foi capaz de reduzir a expressão do RNAm de PrP^c de forma significativa (**Figura 14C**). Em seguida, fomos averiguar se, assim como acontece em neurônios, STIP1 pode se ligar a PrP^c em cardiomiócitos. Para isso realizamos um ensaio de imunoprecipitação, onde precipitamos a PrP^c do lisado celular de NRCMs e em seguida

realizamos um experimento de western blot do precipitado. Como já esperado, a PrP^c está presente em seu precipitado e se mostra reduzida em amostras transfectadas com siRNA (**Figura 14D**), demonstrando que a reação do anticorpo anti-PrP^c é seletiva para precipitar a proteína. A STIP1 se encontra presente no precipitado de PrP^c (**Figura 14D**), confirmando o fato de que STIP1 se liga a PrP^c em cardiomiócitos. Ao silenciar a expressão de PrP^c observamos menor ligação entre STIP1-PrP^c (**Figura 14D**), evidenciando um prejuízo dessa via em cardiomiócitos com baixa de PrP^c. Ao tratarmos com ISO os NRCMs transfectados com siRNA para PrP^c observamos que os mesmos não hipertrofiaram em resposta ao tratamento (**Figura 14E-F**), copiando o mesmo fenótipo de STIP1 já descrito anteriormente. Este dado demonstra fortemente um envolvimento da via STIP1-PrP^c no processo hipertrófico de cardiomiócitos em resposta a hiperatividade adrenérgica.

4.2 A STIP1 é relevante para a adaptação ao contexto de hipóxia em cardiomiócitos

Outro fenótipo apontado pelo experimento proteômico foi um prejuízo dos corações *STIP1^{+/-}* em se adaptar ao estresse oxidativo gerado pela hiperatividade adrenérgica, um dado que ainda carece de validação. Com o objetivo de entender a relevância de STIP1 no estresse oxidativo em cardiomiócitos, nós utilizamos o indutor de hipóxia química CoCl₂, que é capaz de gerar estresse mitocondrial, aumento de EROs e regulação positiva do fator de transcrição HIF1 α ⁴⁶.

4.2.1 CoCl₂ é capaz de induzir hipóxia e modular a expressão de STIP1

Tratamos NRCMs com 500 μ M de CoCl₂ e avaliamos dois fenótipos clássicos relacionados a hipóxia em cardiomiócitos, geração de EROs e prejuízo na contratilidade. A partir de 3 horas de exposição ao CoCl₂ já é possível identificar um aumento significativo na produção EROs que persiste por 6 e 12 horas (**Figura 15A-B**). Já quando avaliamos a contratilidade de cardiomiócitos na presença de CoCl₂ identificamos prejuízo na frequência (**Figura 15C**) e área de encurtamento (**Figura 15D**) evidente a partir de 6 horas. Ambos os fenótipos suportam o CoCl₂ como um bom indutor de hipóxia em cardiomiócitos. Em seguida, avaliamos a expressão de STIP1 na presença de CoCl₂. Apesar de se ter um ligeiro aumento na expressão de RNAm de STIP1 no tempo de 6 horas de exposição ao CoCl₂, apenas com 12 horas esse aumento foi significativo (**Figura 15E**). Ao avaliarmos a expressão proteica de STIP1 através de imunofluorescência, identificamos um aumento expressivo da proteína nos

tempos de 6 e 12 horas (**Figura 15F-G**), demonstrando que o ambiente de hipoxia modula a expressão de STIP1 tanto em RNAm quanto em proteína. Interessantemente, observamos que o CoCl_2 modula a migração de STIP1 para o núcleo celular (**Figura 15H**), sendo esse um fenótipo já reportado previamente para a STIP1 em contextos de estresse celular.

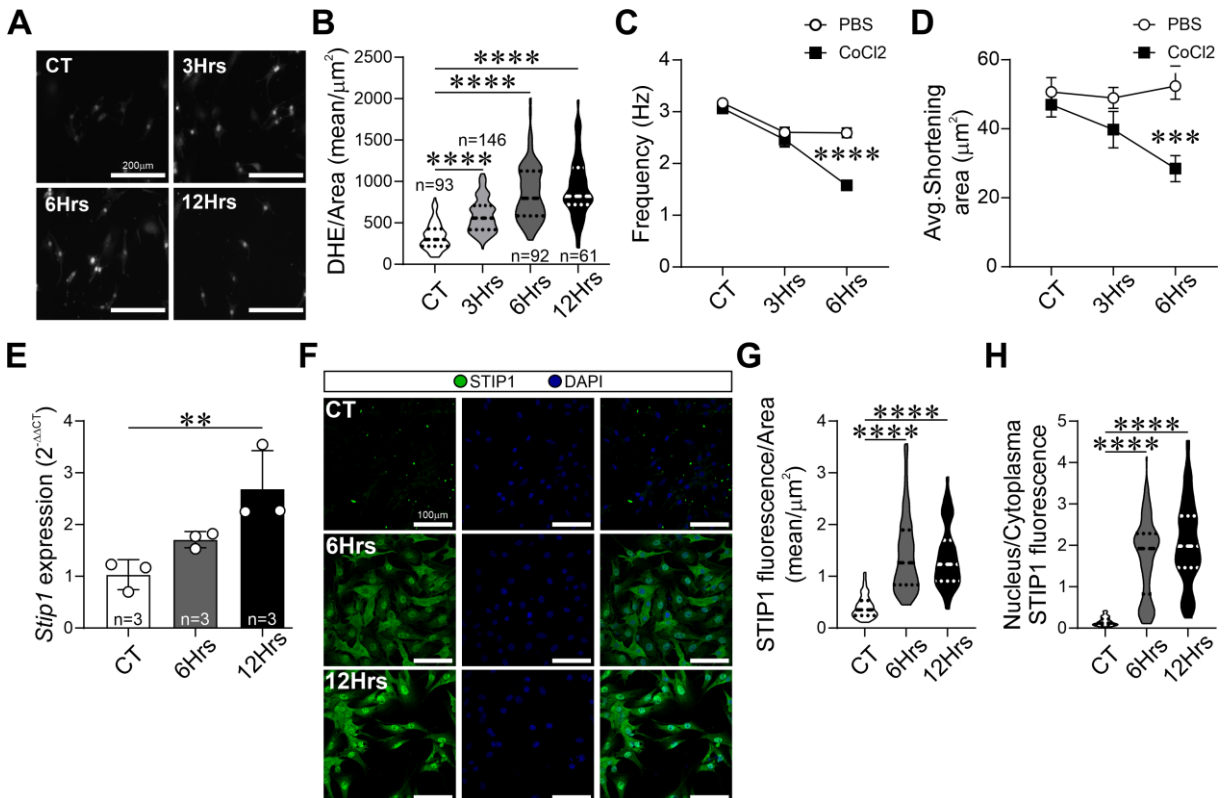


Figura 15 - O CoCl_2 mimetiza a hipóxia e induz STIP1 promovendo sua expressão e translocação nuclear em cardiomiócitos. A-B. Quantificação de ROS por fluorescência de DHE (intensidade por área) em NRCMs tratados com 500 μM de CoCl_2 por 3, 6 e 12 horas. C. CoCl_2 diminui a frequência de contração em NRCMs a partir de 6 horas. D. CoCl_2 diminui a área de encurtamento em NRCMs a partir de 6 horas. E. A expressão de mRNA de STIP1 aumenta após o tratamento com CoCl_2 em NRCMs por 12 horas. F. Imagens de imunofluorescência de NRCMs após tratamento com CoCl_2 . STIP1 em verde e DAPI em azul. G. A marcação de STIP1 aumenta em NRCMs tratados com CoCl_2 por 6 e 12 horas. H. Observou-se um aumento na translocação nuclear de STIP1 em NRCMs após 6 e 12 horas de tratamento com CoCl_2 . Todos os experimentos foram realizados utilizando pelo menos três culturas celulares independentes. Em B, G e H: O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, foi usado para determinar as diferenças estatísticas. Em C e D: amostras representadas em média \pm SEM, de forma que ANOVA Two way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usada para determinar as diferenças estatísticas. Em E: amostras representadas em média \pm SD, de forma que ANOVA Two way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usada para determinar as diferenças estatísticas. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

4.2.2 CoCl_2 modula a secreção de STIP1 em cardiomiócitos

Como já descrito anteriormente, STIP1 pode ser secretada de astrócitos em respostas a privação de oxigênio. Além disso, demonstramos em resultados acima, que NRCMs possuem a capacidade de secretar STIP1. Dessa forma, investigamos se o CoCl_2 é capaz de modular a secreção de STIP1 em cardiomiócitos. Inicialmente, transfectamos NRCMs com o

vetor de expressão STIP1-GFP e tratamos as células com CoCl_2 nos tempos de 3, 6 e 12 horas (**Figura 16A-B**). A partir do tempo de três horas identificamos um padrão vesicular de STIP1 em cardiomiócitos, como indicado pelas setas brancas (**Figura 16A**), e nos tempos de 6 e 12 horas identificamos uma redução global na presença de STIP1 na célula (**Figura 16A-B**). Uma explicação plausível é que essa redução de STIP1-GFP em resposta a hipoxia poderia estar relacionada a secreção. Dessa forma, realizamos experimentos de microscopia TIRF em cardiomiócitos STIP1-GFP tratados com CoCl_2 , afim de averiguar a presença de STIP1 em regiões próximas a membrana plasmática, com o objetivo de inferir sua secreção. Inicialmente, adquirimos a intensidade de fluorescência em resposta a 3 horas de exposição ao CoCl_2 em campo amplo (WF) sem o modo TIRF, onde não identificamos diferença (**Figura 16C-D**). Ao avaliarmos a fluorescência em modo TIRF na distância de 250nm de profundidade da membrana plasmática, identificamos um aumento da presença de STIP1-GFP em células tratadas com CoCl_2 (**Figura 16E**), bem como maior prevalência de um padrão vesicular da proteína (**Figura 16A**). Também avaliamos regiões mais próximas da membrana plasmática, como 150nm (**Figura 16F**) e 90nm (**Figura 16G**), em todos os casos identificamos maior presença de STIP1-GFP em resposta a hipoxia.

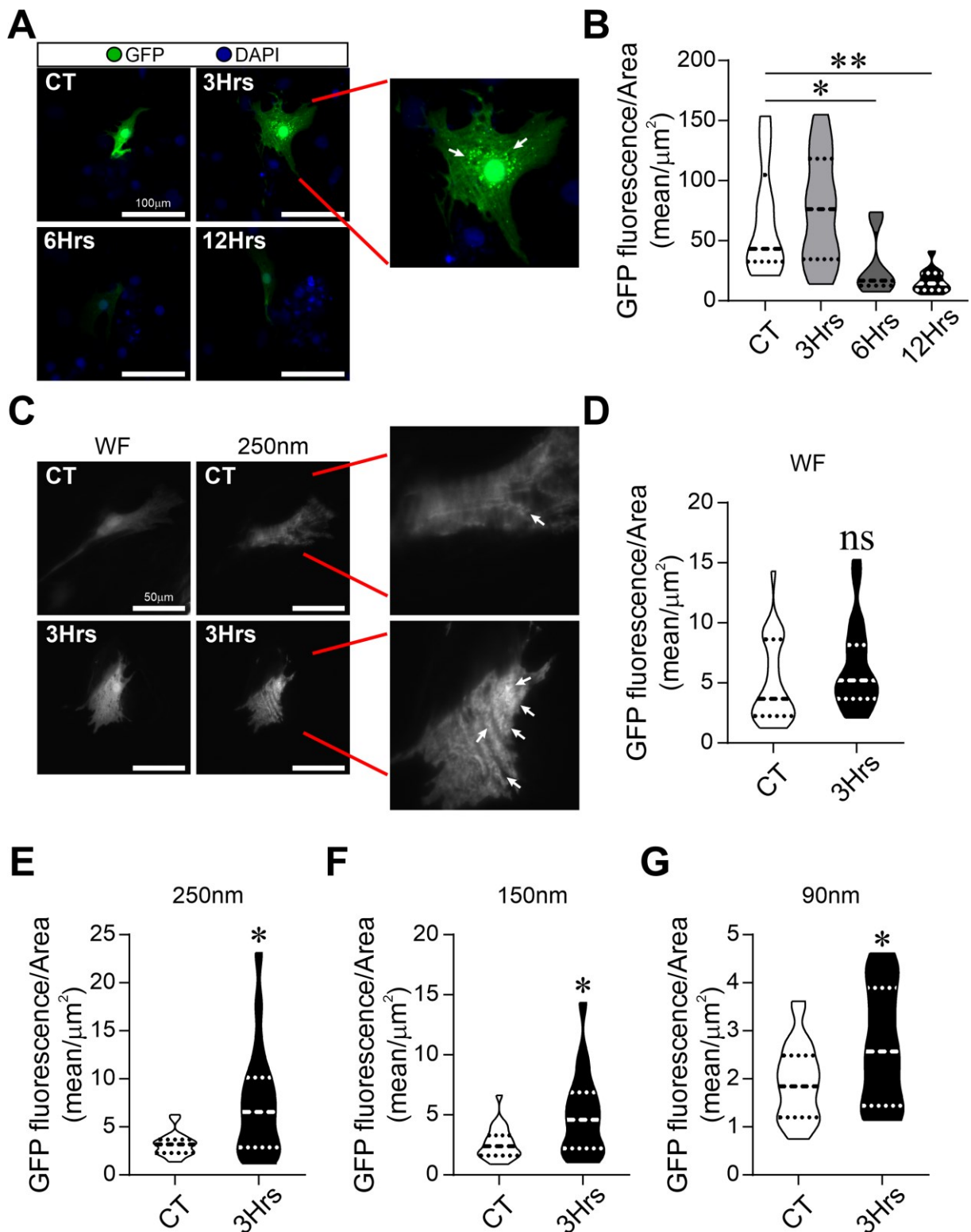


Figura 16 - STIP1 é secretada em resposta à hipoxia. A–B. Cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) foram transfectados com o plasmídeo STIP1-GFP. A. Imagens mostram a localização de STIP1-GFP em células tratadas com CoCl₂ por 3, 6 e 12 horas. As setas apontam para STIP1-GFP presente em um padrão vesicular. B. A fluorescência de STIP1-GFP foi quantificada por área em NRCMs individuais. C–G Medidas de microscopia de Fluorescência por Reflexão Interna Total (TIRF) referente a localização de STIP1 em NRCMs após 3 horas de

tratamento com CoCl_2 . A fluorescência de STIP1-GFP foi quantificada por área nas imagens de TIRF. A fluorescência de STIP1 em NRCMs tratados com CoCl_2 não apresenta diferença em campo amplo (WF, D), mas aumenta sua intensidade a 250nm (E), 150nm (F) e 90nm (G) próximo da membrana celular em resposta ao CoCl_2 . Em B: O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, foi usado para determinar as diferenças estatísticas. Em D, E, F e G: O teste t de Student foi usado para determinar as diferenças estatísticas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Esse fenótipo de migração de STIP1 para regiões próximas a região da membrana celular poderia estar relacionado ao seu repórter fluorescente GFP. Dessa forma, repetimos os mesmos experimentos citados acima com o vetor de expressão pZsGreen-N1, um plasmídeo que codifica a proteína ZsGreen (uma variante de GFP). Avaliamos a intensidade de fluorescência de GFP na presença de diferentes tempos de exposição ao CoCl_2 e não identificamos nenhuma diferença (Figura 17A-B). Além disso, também realizamos a microscopia TIRF nesses NRCMs transfectados com pZsGreen-N1 e não identificamos nenhuma diferença na fluorescência de GFP em resposta ao CoCl_2 em nenhuma das regiões próximas a membrana plasmática (Figura 17C-J). Estes dados corroboram o fenótipo de secreção de STIP1 por cardiomiócitos em resposta ao CoCl_2 .

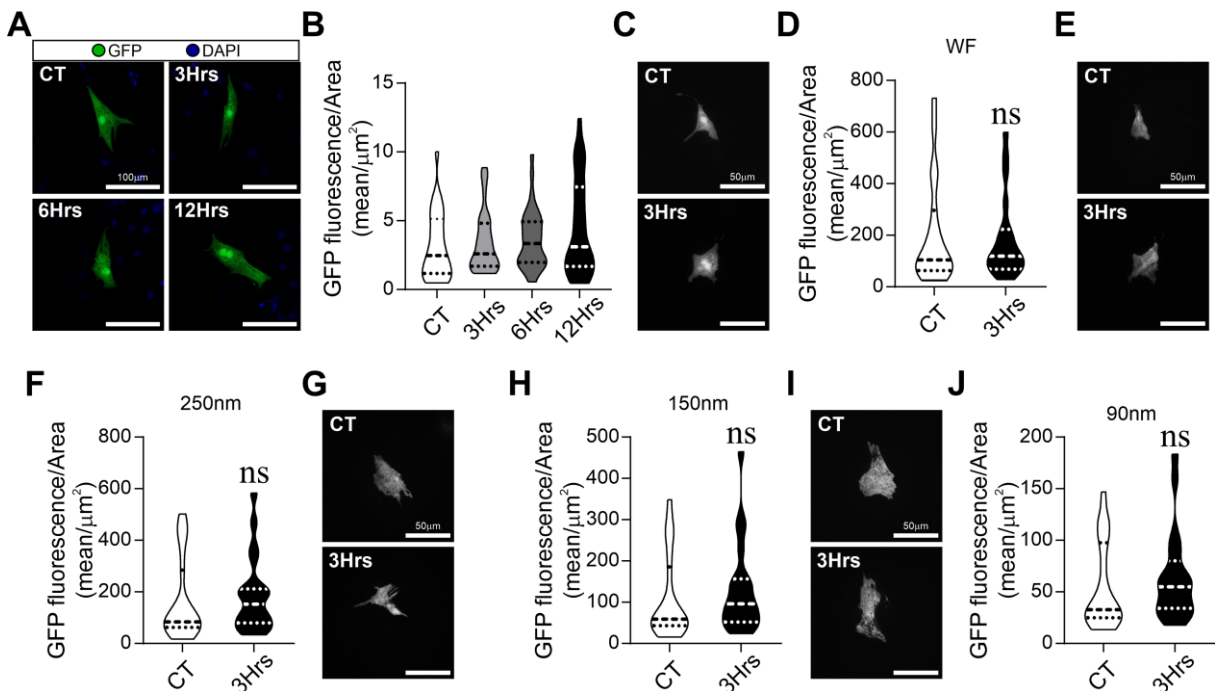


Figura 17 - A localização da GFP não é alterada pelo tratamento com CoCl_2 em NRCMs. A. Imagens de amostra de NRCMs transfectadas com um plasmídeo pZsGreen-N1 e submetidas a tratamento com CoCl_2 . (B) Quantificação da intensidade de fluorescência GFP (GFP/Área², média/mm²) expressa por pZsGreen-N1 medida ao longo do tempo (0, 3, 6 e 12 horas) em células tratadas em condições de controle (CT) ou expostas ao tratamento com CoCl_2 . C. Imagens de amostra de NRCMs transfectadas com GFP e submetidas à fluorescência TIRF de campo amplo. D. Quantificação dos dados em campo amplo. E, G e I: Imagens de amostra de NRCMs transfectadas com GFP e submetidas à microscopia TIRF em profundidades de 250, 150 e 90 nm. F, H e J: Os gráficos de violino mostram a quantificação da intensidade de fluorescência da GFP (GFP/Área², média/mm²) expressa por pZsGreen-N1 3 horas após o tratamento com CoCl_2 em diferentes profundidades. Nenhuma

diferença significativa (*ns*) foi observada em diversas comparações. Os dados foram obtidos de pelo menos 3 experimentos independentes.

4.2.3 Redução dos níveis de STIP1 impactam a sobrevivência de cardiomiócitos em resposta a hipoxia

Uma vez que identificamos que o ambiente de hipoxia gerado por CoCl_2 induz a expressão e secreção de STIP1 por cardiomiócitos, é possível inferir que esses fenótipos são relevantes para a adaptação ao esse contexto de estresse. Com isso, avaliamos o impacto da deleção de STIP1 na geração de EROs e na sobrevivência a hipoxia em cardiomiócitos. Interessantemente, o silenciamento da expressão de STIP1 por siRNA foi capaz de aumentar os níveis de EROs em NRCMs (**Figura 18A-B**). Também avaliamos a produção de EROs em cardiomiócitos neonatais de camundongo (NMCMs) isolados dos animais WT e $STIP1^{+/-}$, onde observamos o mesmo resultado, ou seja, aumento de EROS nos cardiomiócitos de camundongos $STIP1^{+/-}$ (**Figura 18C-D**). Estes dados evidenciam que o fenótipo de aumento de EROs em contexto de baixa de STIP1 acontece independente do modelo experimental avaliado. Em seguida, avaliamos como a redução dos níveis de STIP1 afeta a sobrevivência de cardiomiócitos ao contexto de hipoxia. Para isso, tratamos NRCMs mock e transfectados com siRNA para STIP1 com CoCl_2 e averiguamos a morte celular por meio da sonda Live/Dead. Como esperado, cardiomiócitos mock apresentam aumento na morte celular em resposta a exposição por CoCl_2 . Evento que foi amplificado nos cardiomiócitos com diminuição da expressão de STIP1 (**Figura 18E-F**). Repetimos esse mesmo experimento em NMCMs WT e $STIP1^{+/-}$ e identificamos o mesmo resultado (**Figura 18G-H**), onde a redução de STIP1 agrava a morte celular gerada por CoCl_2 . Demonstramos assim, mais uma vez, um fenótipo que se repete em diferentes modelos experimentais de redução de STIP1.

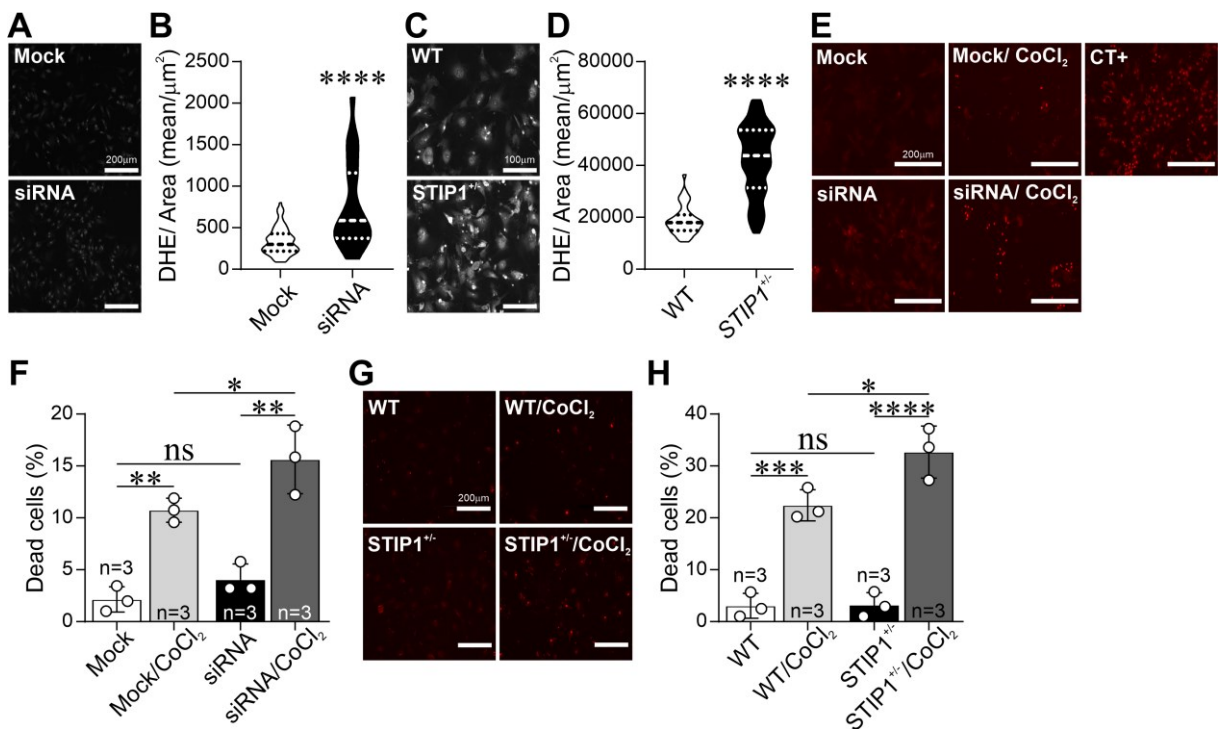


Figura 18 – A diminuição de STIP1 leva a níveis elevados de ROS e aumenta a susceptibilidade de NRCMs à morte celular induzida por hipóxia. A. Imagens de amostras de NRCMs transfectadas com siRNA para STIP1 e células controle (mock) marcadas com sonda DHE. B. Quantificação de ROS pela intensidade de fluorescência de DHE em NRCMs transfectadas ou não com siRNA para STIP1. C. Imagens de amostras de cardiomiócitos neonatais de camundongos isolados de camundongos haploinsuficientes para STIP1 (STIP1^{+/-}) marcados com DHE. D. Quantificação de ROS por fluorescência de DHE (intensidade por área) em NRCMs WT e STIP1^{+/-}. E. Imagem de amostra de NRCMs submetidos à marcação com sonda Live/Dead. F. Quantificação da viabilidade celular (% de células mortas) em NRCMs transfectados ou não com siRNA para STIP1 submetidos ou não a tratamento com CoCl₂. DMSO foi usado como controle positivo de morte celular. G-H: marcação e quantificação de NRCMs em processo de morte celular. Os dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes. Em B e C: O teste t de Student foi usado para determinar as diferenças estatísticas. Em F e H: o teste ANOVA Two way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usada para determinar as diferenças estatísticas; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns = não significativo.

4.2.4 STIP1 é relevante para a responsividade de NRF2 a hipóxia em cardiomiócitos

O motivo do descontrole na produção de EROs, bem como o agravamento da morte celular de cardiomiócitos em resposta a hipóxia pode estar relacionado a inibição de NRF2, evidenciada tanto na proteômica, quanto nos dados de imunofluorescência do tecido cardíaco nos animais STIP1^{+/-}/ISO, apresentados anteriormente. Com o objetivo de validar esses achados, realizamos uma imunofluorescência para NRF2 em NRCMs transfectados com siRNA para STIP1 tratados com CoCl₂. Como esperado, NRF2 tem sua expressão proteica aumentada em resposta a hipóxia gerada por CoCl₂ em cardiomiócitos, o que não acontece em células com baixa de STIP1 (Figura 19A-B), repetindo o fenótipo evidenciado através dos experimentos *in vivo*. Interessantemente, além do prejuízo na abundância proteica de NRF2 em contexto de hipóxia, o silenciamento de STIP1 também impediu a translocação de NRF2

para o núcleo em resposta a presença de CoCl_2 (**Figura 19C**). Demonstrando que baixos níveis de STIP1 em cardiomiócitos impedem a abundância e a responsividade de NRF2 em contextos de hipoxia.

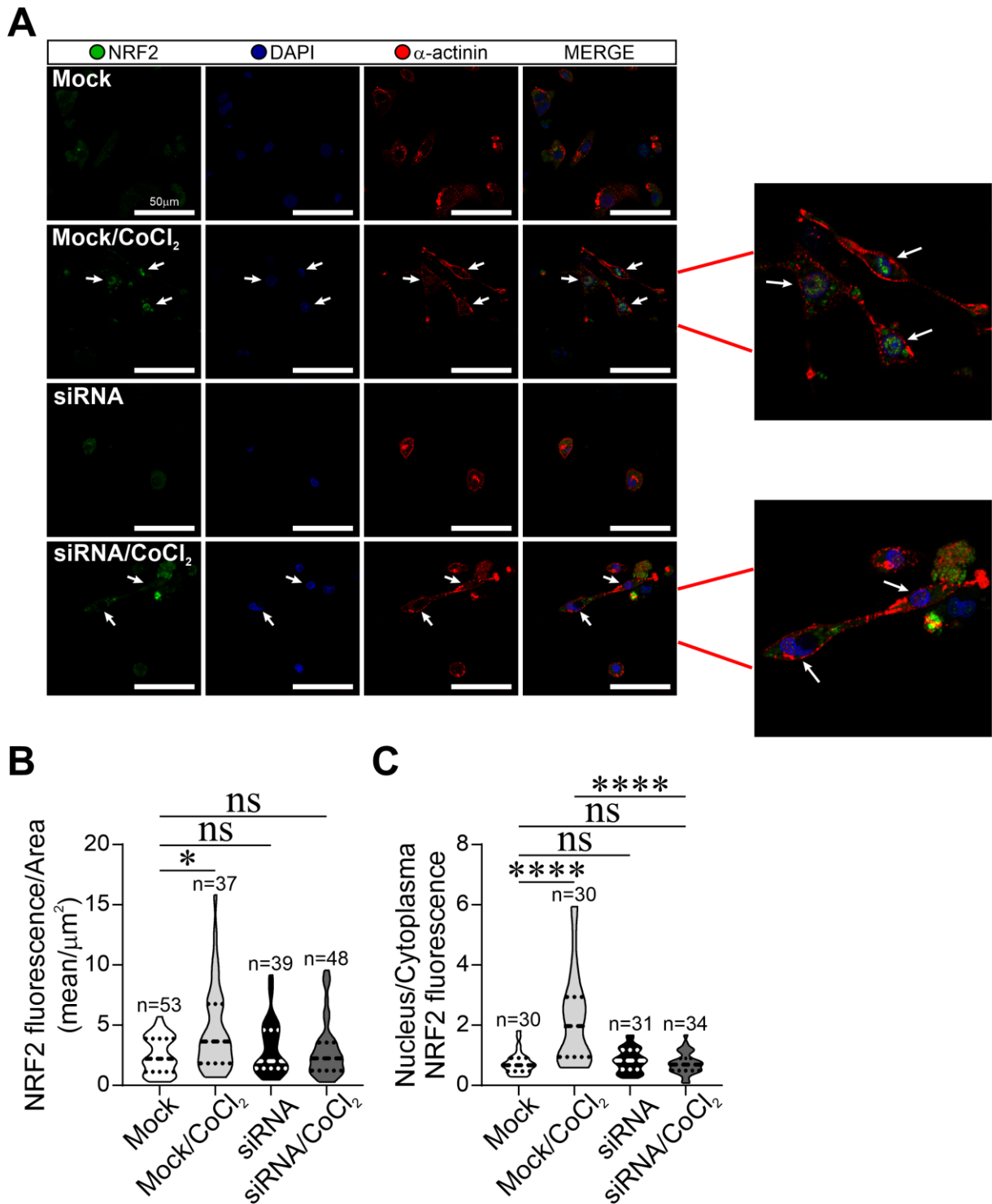


Figura 19 - A STIP1 desempenha um papel crucial na regulação da expressão de NRF2 e na promoção de sua translocação nuclear em condições de hipóxia. A-B. Quantificação por imunofluorescência da intensidade de NRF2 em cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) controle e deficientes em STIP1 sob tratamento com CoCl₂. A e C. Quantificação da fluorescência e localização nuclear de NRF2 em células tratadas com CoCl₂. As setas indicam a marcação nuclear de NRF2 em NRCMs. Os dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como média ± SEM; **p* < 0,05; *****p* < 0,0001; ns = não significativo.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstra que a STIP1 interage com a PrP^c em cardiomiócitos para formar um eixo regulatório, que impulsiona a tradução de proteínas durante a hipertrofia patológica modulada por hiperatividade adrenérgica. Ao utilizarmos de modelos *in vitro*, foi demonstrado que a deficiência de STIP1 atenua a resposta hipertrófica adaptativa. De forma mecanística, a STIP1 se localiza em vesículas de reciclagem em cardiomiócitos, facilitando sua secreção e interação extracelular com a PrP^c para impulsionar a hipertrofia patológica. Além disso, também estabelecemos a STIP1 como uma molécula induzível em resposta a hipoxia em cardiomiócitos, assim como importante para o controle de EROs, sobrevivência celular e garantidora da resposta de NRF2 a hipoxia.

Para avaliar como a redução de STIP1 afeta a hipertrofia de cardiomiócitos, utilizamos de cardiomiócitos neonatais de rato (NRCMs) transfectados com siRNA para STIP1, que é capaz de reduzir os níveis da proteína bem como seu RNAm. De forma bem interessante, a diminuição da expressão de STIP1, não alterou a área de cardiomiócitos no estado basal, sugerindo que a redução de STIP1 é tolerada em condições fisiológicas, embora potencialmente insuficiente em situações de estresse cardíaco. Esse fenótipo também foi observado *in vivo* realizados anteriormente em nosso grupo, onde não identificamos alterações no tamanho de cardiomiócitos dos camundongos *STIP1*^{+/−}, assim como não houve mudanças no tamanho do coração nem em aspectos teciduais, quando comparado a animais WT. O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), é considerado um indutor de hipertrofia fisiológica de cardiomiócitos por mediar um aumento de síntese proteica de forma direta, sem a presença da ativação de genes fetais ou morte celular^{17; 47}. Ao se ligar a seu receptor do tipo tirosina quinase, se tem uma ativação da via AKT/mTOR/mTORC1, que culmina na ativação de eIFs e aumento na síntese proteica^{17; 47}. A hipertrofia induzida por IGF-1 permaneceu intacta em cardiomiócitos deficientes em STIP1, corroborando ainda mais a ideia de STIP1 se restringir em sua função hipertrófica a estímulos de ordem patológica. Estudos futuros devem explorar se a hipertrofia dependente de STIP1 em cardiomiócitos se estende a outros contextos fisiológicos relacionados a hipertrofia, como gravidez ou exercício físico.

Cardiomiócitos com baixa de STIP1 falharam em aumentar a área celular e síntese proteica em resposta ao tratamento com ISO, bem como apresentaram prejuízo na expressão de eIF4E. Aqui é importante mencionar, que a falha na indução da síntese proteica nos

cardiomiócitos com baixa de STIP1, não tem relação com prejuízo na atividade de receptores adrenérgicos nem com estresse de retículo, demonstrando que STIP1 modula a síntese proteica induzida por ISO através de outro caminho celular. Os dados obtidos em cardiomiócitos vão de encontro com resultados obtidos em neurônios, onde o tratamento com STIP1 exógena induz o aumento de síntese proteica bem como a ativação da via mTOR/mTORC1³⁴. A hiperestimulação β -adrenérgica, inicialmente, leva a massiva ativação de receptores β 1 e β 2 acoplados a proteína Gs, que induzem o aumento citoplasmático de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA), gerando aumento de cálcio citoplasmático e contratilidade^{17; 47; 48}. Posteriormente, receptores β 2 podem ser fosforilados e se acoplar a proteína Gi, que leva a ativação da via AKT/mTOR/mTORC1, gerando ativação de eIFs e aumento de síntese proteica^{17; 47; 48}. A não hipertrofia de NRCMs com baixa de STIP1 em resposta ao ISO pode ser explicada por falha na ativação do processo de síntese proteica *de novo* dependente da via mTORC1, uma vez que esse processo se mostra fundamental para a hipertrofia de cardiomiócitos¹⁹. É importante salientar que a hipertrofia de cardiomiócitos induzida por ISO se difere de IGF-1 por ser induzida de forma indireta, após desordem na função mitocondrial e ativação de proteína Gi em receptores β 2^{17; 48}.

Interessantemente, o tratamento com STIP1 exógena é incapaz de induzir aumento de síntese proteica em neurônios PrP^c-Knockout, demonstrando a dependência de PrP^c para essa função de STIP1³⁴. Esse dado prévio vai de encontro aos nossos resultados mostrando a ausência de hipertrofia em cardiomiócitos transfectados com siRNA para PrP^c ou STIP1 em resposta ao ISO, uma vez que ambas as proteínas podem estar atuando em conjunto para o acometimento desse processo. O fato de encontrarmos a STIP1 no precipitado de PrP^c em cardiomiócitos, também favorece essa ideia, de que ocorre ação conjunta de STIP-PrP^c em cardiomiócitos. Por fim, também identificamos a capacidade de cardiomiócitos secretarem STIP1 ao encontrarmos a mesma co-localizada com vesículas extracelulares de reciclagem e em regiões próximas a membrana plasmática. Dessa forma é possível compreender que a ligação entre STIP1-PrP^c se mostra importante para a modulação da síntese proteica e hipertrofia de cardiomiócitos no contexto de hiperatividade adrenérgica. Ainda não foi possível identificar como e por qual mecanismo celular o braço STIP1-PrP^c é modulado no contexto patológico em cardiomiócitos, mas levando em consideração a capacidade da PrP^c de transativar diferentes receptores, é possível hipotetizar que esse fenômeno também esteja presente na sinalização STIP1-PrP^c⁴⁹ (**Figura 20**).

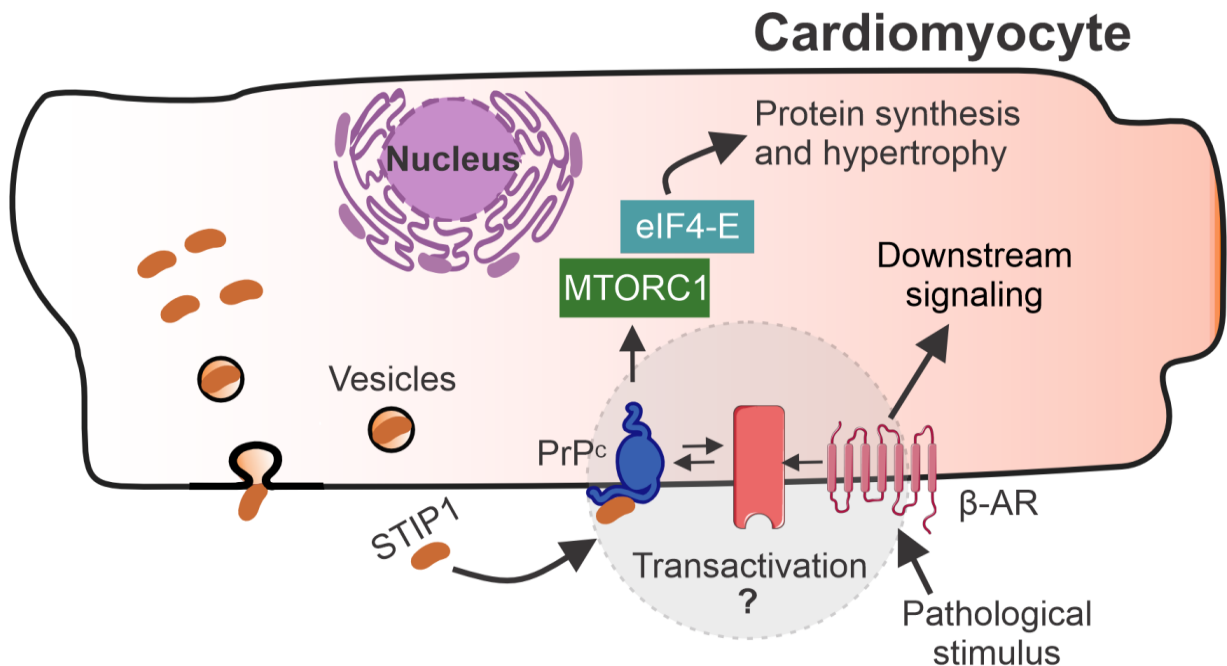


Figura 20 - Modelo proposto de regulação da hipertrofia patológica em cardiomiócitos pelo eixo STIP1-PrP^c. A proteína STIP1, secretada pelos cardiomiócitos, liga-se à PrP^c. Após estimulação com ISO, o eixo STIP1-PrP^c ativa a maquinaria de tradução a jusante, incluindo mTORC1 e eIF4, promovendo a síntese proteica e o crescimento hipertrófico. A interrupção desse eixo STIP1-PrP^c abole a ativação da tradução e atenua a resposta hipertrófica. Embora o mecanismo preciso pelo qual o eixo STIP1-PrP^c interage com as vias hipertróficas canônicas permaneça desconhecido, a transativação da PrP^c surge como uma possibilidade plausível, que justifica investigações adicionais.

A ideia que STIP1 é modulada em resposta a hipoxia não é nova, uma vez que já foi demonstrado que esse fenômeno acontece em neurônios quando o fator de transcrição HIF1 α se liga ao sítio ARE no promotor de STIP1³¹. Aqui demonstramos que a STIP1 também é modulada em resposta a hipoxia em cardiomiócitos, de forma que estudos futuros investigando a influência de HIF1 α nesse processo se mostram necessários. Além disso, também identificamos que STIP1 migra para o núcleo de cardiomiócitos em resposta a hipoxia. A localização nuclear de STIP1 acontece em contexto de estresse celular e já foi sugerida sua função na resposta ao dano genômico³⁹. Experimentos futuros devem investigar qual a relevância da função nuclear de STIP1 em cardiomiócitos, bem como se essa translocação é resultado direto do estresse oxidativo ou mediada de forma indireta por mecanismos de dano ao DNA/morte celular.

Também identificamos que a STIP1-GFP possui um decaimento de sua marcação em resposta a hipoxia gerada pelo CoCl₂. É importante salientar que nestes experimentos a expressão de STIP1-GFP não é modulada por seu promotor canônico, em vez disso, o vetor utilizado contém um promotor de citomegalovírus (CMV), evidenciando que essa diminuição

de STIP1-GFP não se dá por uma inibição na expressão, mas sim por algum efeito pós transcricional. Dentre esses efeitos, temos a possibilidade de degradação de seu RNAm, da proteína e/ou da secreção, sendo os dois primeiros menos prováveis, uma vez que observamos que o CoCl_2 induz o aumento do RNAm e da proteína STIP1 por qPCR e imunofluorescência respectivamente. Outro fator que corrobora a ideia de que a STIP1 é secretada por cardiomiócitos em resposta a hipoxia se dá pelos experimentos com microscopia TIRF, onde observamos que o CoCl_2 modula a translocação de STIP1 para regiões próximas da membrana plasmática, bem como maior presença de um padrão vesicular da proteína. Quando realizamos os mesmos experimentos de microscopia com cardiomiócitos transfectados com pZsGreen-N1, não identificamos nenhuma diferença estatística na intensidade e fluorescência em nenhum dos parâmetros avaliados, o que fortalece ainda mais o fenótipo de secreção de STIP1. Beraldo e colaboradores demonstraram que STIP1 é secretada de astrócitos e fibroblastos no sistema nervoso central em resposta a privação de oxigênio, apresentando menor quantidade de STIP1 intracelular quando comparada a abundância no meio de cultura ²⁹. Dessa forma, demonstramos que STIP1 possui, potencialmente, um papel extracelular na hipoxia em cardiomiócitos de forma similar ao que acontece no sistema nervoso central.

Nós encontramos um aumento de EROs em cardiomiócitos com baixa de STIP1 em dois modelos experimentais distintos, o que fortalece a reprodutibilidade desse fenótipo. É possível hipotetizar que a razão desse fenótipo se dá pela relação íntima que STIP1 possui com a atividade da proteína antioxidante SOD ⁵⁰. Neste sentido, quando utilizado um vetor de superexpressão de STIP1 em células H9c2 (um tipo de célula cardíaca imortalizada), foi encontrado uma maior ativação de SOD ⁵⁰. Além disso, também demonstramos, que independente do modelo utilizado, a redução de STIP1 agrava a morte celular de cardiomiócitos em resposta a hipoxia. Esses dados vão de encontro a experimentos com neurônios em contexto de privação de oxigênio, onde a baixa expressão de STIP1 agrava a morte celular e o tratamento com STIP1 exógena atenua o fenótipo de forma dependente da presença de PrP^c e do receptor nicotínico $\alpha 7$ ^{29; 33}. Com isso, se faz relevante experimentos futuros avaliando a influência de PrP^c e do receptor $\alpha 7$ na resposta protetora a hipoxia da STIP1 em cardiomiócitos.

Nos apresentamos nesse estudo, pela primeira vez, uma relação íntima entre STIP1 e a atuação de NRF2 na hipoxia em cardiomiócitos, sendo demonstrado por experimento proteômico, *in vivo* e *in vitro* uma inibição de NRF2 em contexto de estresse oxidativo e baixa

de STIP1. Analisando os caminhos celulares em que NRF2 é ativado em resposta a hipóxia podemos hipotetizar que STIP1 poderia atuar de duas maneiras nesse processo. Uma delas seria por sua função extracelular em conjunto com PrP^c, uma vez que demonstramos a capacidade de cardiomiócitos de secretar STIP1 em resposta a hipóxia. Como já citado, STIP1 interage com PrP^c em neurônios, o que leva a uma fosforilação de AKT ³⁴. Essa ativação de AKT conduz a uma cascata celular que culmina na fosforilação de GSK3 β , que por sua vez impede a degradação de NRF2 e induz seu acúmulo citoplasmático (**Figura 3**) ¹². A baixa de STIP1 em contexto de hipóxia geraria menos STIP1 sendo secretada, logo menor interação com a PrP^c e menor ativação da sinalização de AKT no contexto de hipóxia. Além da atuação extracelular de STIP1, essa proteína também possui um papel co-chaperona, auxiliando a HSP90 em suas funções. Recentemente foi demonstrado que HSP90 se liga a ao complexo Keap1-NRF2, sendo esse processo importante para estabilidade de NRF2 ⁵¹, evidenciando um outro caminho celular pelo qual STIP1 poderia influenciar as funções de NRF2 na hipóxia. Utilizando-se de leveduras como modelo experimental, se observou que a superexpressão de NRF2 bem como de sua subunidade Nhe2 prejudica o crescimento de colônias ⁵¹. Esse prejuízo em leveduras se deve a subunidade Neh2, que é considerada um domínio intrinsecamente desordenado que pode favorecer seu dobramento errado e indução de citotoxicidade por quebra da proteostase ⁵¹. Vy Ngo e colaboradores demonstraram nesse estudo que a ligação entre HSP90 e NRF2 impede a citotoxicidade da proteína em leveduras, sugerindo que esse processo é importante para a estabilidade de NRF2 ⁵¹. Além disso, foi identificado que a deleção de STIP1 em leveduras agrava a citotoxicidade de NRF2, evidenciando a participação de STIP1 na estabilidade de NRF2 ⁵¹. Uma vez que observamos um prejuízo na responsividade de NRF2 a hipóxia em cardiomiócitos com baixa de STIP1, é possível hipotetizar que STIP1 em conjunto a HSP90 atuam para estabilizar NRF2 nesse contexto gerando um complexo proteico entre STIP1/HSP90/NRF2/Keap1, garantindo sua responsividade e papel protetor à hipóxia cardíaca. Experimentos futuros de imunoprecipitação de NRF2 afim de averiguar a ligação entre STIP1 e HSP90, bem como a influência da sinalização celular modulada por STIP1-PrP^c na ativação de NRF2, se mostram relevantes para entender a dependência de STIP1 na responsividade a hipóxia de NRF2. Futuramente também é válido averiguar a influência de NRF2 na cardioproteção mediada por STIP1 em contexto de estresse oxidativo, onde experimentos de superexpressão ou modulação de NRF2 em contextos de baixa expressão de STIP1 se mostram relevantes para esse entendimento. Esse conjunto de dados apresentaria potencial para estabelecer a STIP1

como um alvo terapêutico para assegurar as funções antioxidantes de NRF2 em contexto de isquêmica e reperfusão cardíaca.

6. CONCLUSÃO

Com o presente estudo, estabelecemos a STIP1 como uma molécula relevante para a adaptação ao estresse patológico cardíaco, tanto em resposta a hipoxia quanto na hiperatividade adrenérgica. Demonstramos o papel crucial da sinalização STIP1-PrP^c na hipertrofia de cardiomiócitos em resposta ao ISO bem como sua influência na modulação e ativação do processo de síntese proteica *de novo*. Também validamos a STIP1 como uma molécula que responde a hipoxia, bem como um alvo relevante no controle de EROs, na resiliência a morte de cardiomiócitos em resposta a hipoxia e na preservação da ativação de NRF2 nesse contexto. Nossos dados apontam o papel promissor da STIP1 como um alvo terapêutico em contextos de doença cardíaca hipertrófica e isquêmica.

REFERÊNCIAS

- 1 ROTH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. **J Am Coll Cardiol**, v. 76, n. 25, p. 2982-3021, Dec 22 2020. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33309175> >.
- 2 BLOOM, M. W. et al. Heart failure with reduced ejection fraction. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17058, Aug 24 2017. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28836616> >.
- 3 KRITTANAWONG, C. et al. Acute Myocardial Infarction: Etiologies and Mimickers in Young Patients. **J Am Heart Assoc**, v. 12, n. 18, p. e029971, Sep 19 2023. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37724944> >.
- 4 YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Myocardial reperfusion injury. **N Engl J Med**, v. 357, n. 11, p. 1121-35, Sep 13 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855673> >.
- 5 HEUSCH, G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. **Nat Rev Cardiol**, v. 17, n. 12, p. 773-789, Dec 2020. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32620851> >.
- 6 XIANG, Q. et al. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Trends Endocrinol Metab**, v. 35, n. 3, p. 219-234, Mar 2024. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37981501> >.
- 7 JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Lethal myocardial ischemic injury. **Am J Pathol**, v. 102, n. 2, p. 241-55, Feb 1981. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7008621> >.
- 8 HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 12 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048727> >.
- 9 BULLUCK, H. et al. Residual Myocardial Iron Following Intramyocardial Hemorrhage During the Convalescent Phase of Reperfused ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction and Adverse Left Ventricular Remodeling. **Circ Cardiovasc**

- Imaging**, v. 9, n. 10, p. e004940, Oct 2016. ISSN 1942-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894068> >.
- 10 BABA, Y. et al. Protective effects of the mechanistic target of rapamycin against excess iron and ferroptosis in cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 314, n. 3, p. H659-H668, Mar 01 2018. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29127238> >.
- 11 OERLEMANS, M. I. et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. **Basic Res Cardiol**, v. 107, n. 4, p. 270, Jul 2012. ISSN 1435-1803. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553001> >.
- 12 CHEN, Q. M.; MALTAGLIATI, A. J. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. **Physiol Genomics**, v. 50, n. 2, p. 77-97, Feb 01 2018. ISSN 1531-2267. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29187515> >.
- 13 CHOWDHRY, S. et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3765-81, Aug 08 2013. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964642> >.
- 14 XU, B. et al. Myocardial ischemic reperfusion induces de novo Nrf2 protein translation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1638-47, Sep 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915518> >.
- 15 COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. **J Am Coll Cardiol**, v. 35, n. 3, p. 569-82, Mar 01 2000. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716457> >.
- 16 AZEVEDO, P. S. et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arq Bras Cardiol**, v. 106, n. 1, p. 62-9, Jan 2016. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26647721> >.
- 17 NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nat Rev Cardiol**, v. 15, n. 7, p. 387-407, 07 2018. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29674714> >.

- 18 BUSZCZAK, M.; SIGNER, R. A.; MORRISON, S. J. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 242-51, Oct 09 2014. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25303523> >.
- 19 CHORGHAE, S. et al. Poly(A) tail length regulates PABPC1 expression to tune translation in the heart. **Elife**, v. 6, 06 27 2017. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28653618> >.
- 20 GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 913-63, 1999. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872469> >.
- 21 SCIARRETTA, S. et al. The complex network of mTOR signalling in the heart. **Cardiovasc Res**, v. 118, n. 2, p. 424-439, Jan 29 2022. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33512477> >.
- 22 SIMM, A. et al. Activation of p70(S6) kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 10, p. 2059-67, Oct 1998. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9799659> >.
- 23 WANG, L.; PROUD, C. G. Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 91, n. 9, p. 821-9, Nov 01 2002. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411397> >.
- 24 RANEK, M. J. et al. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 373, n. 1738, Jan 2018. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29203715> >.
- 25 KNOWLTON, A. A.; BRECHER, P.; APSTEIN, C. S. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. **J Clin Invest**, v. 87, n. 1, p. 139-47, Jan 1991. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1985091> >.
- 26 NISHIZAWA, J. et al. Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart. **Circulation**, v. 94, n. 9, p. 2185-92, Nov 1996. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901670> >.

- 27 NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 3638-46, Sep 1989. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2674681> >.
- 28 LACKIE, R. E. et al. The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. **Front Neurosci**, v. 11, p. 254, 2017. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28559789> >.
- 29 BERALDO, F. H. et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB J**, v. 27, n. 9, p. 3594-607, Sep 2013. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729591> >.
- 30 LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-35, Mar 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951723> >.
- 31 LEE, S. D. et al. Role of stress-inducible protein-1 in recruitment of bone marrow derived cells into the ischemic brains. **EMBO Mol Med**, v. 5, n. 8, p. 1227-46, Aug 2013. ISSN 1757-4684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836498> >.
- 32 ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**, v. 21, n. 13, p. 3307-16, Jul 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093732> >.
- 33 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**, v. 285, n. 47, p. 36542-50, Nov 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837487> >.
- 34 ROFFÉ, M. et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 29, p. 13147-52, Jul 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615969> >.
- 35 HAJJ, G. N. et al. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **J Comp Neurol**, v. 517, n. 3, p. 371-84, Nov 20

2009. ISSN 1096-9861. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19760599> >.
- 36 NOGUEIRA, I. P. **Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1) desempenha função protetora na resposta ao estresse cardíaco.** Programa de pós graduação em fisiologia e farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais: 78 p. 2020.
- 37 MOURA, V. **VIAS DE SINALIZAÇÃO ALTERADAS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DA PROTEINA INDUZIDA POR ESTRESSE (STI1) TRATADOS COM ISOPROTERENOL** 2021.
- 38 GUATIMOSIM, S. et al. Nuclear Ca²⁺ regulates cardiomyocyte function. **Cell Calcium**, v. 44, n. 2, p. 230-42, Aug 2008. ISSN 0143-4160. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18201761> >.
- 39 SOARES, I. N. et al. Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 11, p. 3253-70, Nov 2013. ISSN 1535-9484. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938469> >.
- 40 ROCHA-RESENDE, C. et al. Absence of suppressor of cytokine signaling 2 turns cardiomyocytes unresponsive to LIF-dependent increases in Ca. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 312, n. 4, p. C478-C486, Apr 01 2017. ISSN 1522-1563. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122728> >.
- 41 LARA, A. et al. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 7, p. 1746-56, Apr 2010. ISSN 1098-5549. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123977> >.
- 42 SCALZO, S. et al. Microscopy-based cellular contractility assay for adult, neonatal, and hiPSC cardiomyocytes. **STAR Protoc**, v. 3, n. 1, p. 101144, Mar 18 2022. ISSN 2666-1667. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35199028> >.
- 43 _____. Dense optical flow software to quantify cellular contractility. **Cell Rep Methods**, v. 1, n. 4, p. 100044, Aug 23 2021. ISSN 2667-2375. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35475144> >.

- 44 RAVI, V. et al. Systematic evaluation of the adaptability of the non-radioactive SUnSET assay to measure cardiac protein synthesis. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4587, Mar 15 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545554> >.
- 45 RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565364> >.
- 46 KONG, H. L. et al. Ginsenoside Rb1 protects cardiomyocytes against CoCl₂-induced apoptosis in neonatal rats by inhibiting mitochondria permeability transition pore opening. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 6, p. 687-95, Jun 2010. ISSN 1745-7254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523339> >.
- 47 BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, v. 128, n. 1, p. 191-227, Oct 2010. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438756> >.
- 48 SPADARI, R. C. et al. Role of Beta-adrenergic Receptors and Sirtuin Signaling in the Heart During Aging, Heart Failure, and Adaptation to Stress. **Cell Mol Neurobiol**, v. 38, n. 1, p. 109-120, Jan 2018. ISSN 1573-6830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29063982> >.
- 49 LINDEN, R. et al. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 673-728, Apr 2008. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391177> >.
- 50 AN, L. et al. The potential roles of stress-induced phosphoprotein 1 and connexin 43 in rats with reperfusion arrhythmia. **Immun Inflamm Dis**, v. 11, n. 10, p. e852, Oct 2023. ISSN 2050-4527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37904692> >.
- 51 NGO, V. et al. A novel yeast model detects Nrf2 and Keap1 interactions with Hsp90. **Dis Model Mech**, v. 15, n. 4, Apr 01 2022. ISSN 1754-8411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35088844> >.