

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Iara Pastor Nogueira

Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1)
desempenha função protetora na resposta ao estresse
cardíaco



Belo Horizonte

2020

Iara Pastor Nogueira

**Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1)
desempenha função protetora na resposta ao estresse
cardíaco**

Dissertação apresentado 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 Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Guatimosim

Belo Horizonte

2020

043

Nogueira, Iara Pastor.

Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1) desempenha função protetora na resposta ao estresse cardíaco [manuscrito] / Iara Pastor Nogueira. - 2020.

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca.

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

1. Fisiologia. 2. Cardiomegalia. 3. Insuficiência Cardíaca. 4. Isoproterenol. 5. Chaperonas Moleculares. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 527

**"Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1)
desempenha função protetora na resposta ao estresse cardíaco"**

IARA PASTOR NOGUEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **15 de junho de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Thiago Verano Braga, ICB/UFMG

Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, ICB/UFMG - Orientadora

Profa. Dra. Cibele Rocha Resende, Washington University in St. Louis, School of Medicine

Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 27/01/2021, às 10:44, 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 27/01/2021, às 11:06, 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 **Cibele Rocha Resende, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 13:18, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0539187** e o código CRC **F8D76DD5**.

Referência: Processo nº 23072.204262/2021-36

SEI nº 0539187

Agradecimentos

Realizar o meu mestrado no departamento de Fisiologia e Farmacologia do ICB-UFMG, foi um sonho concretizado. Uma paixão que começou nos livros de graduação e se concretizou na bancada do laboratório.

Agradeço à Deus, por me mostrar sempre o caminho. Por me confirmar em meio às borboletas azuis, que o meu sonho era o sonho Dele também. Por ser o meu sustento nos momentos difíceis e meu refrigerio em tanta correria. Agradeço à minha família por aguantarem o imenso mal humor depois de cada experimento frustrado. Por entenderem às ausências até no natal; por serem meu patrocínio para viver um sonho canadense e a razão para regressar dele. Agradeço em especial minha mãe por sustentar os meus braços, quando eu já não dava mais conta, e por me ajudar a chegar até aqui. Agradeço ao meu avô José Carlos, por ter vivido esse sonho comigo. Você me orientou ao longo de todo esse processo. Escutou minhas frustrações e me entendeu como só alguém que passou por tudo isso é capaz. Agradeço ao Dimitri por ter me apoiado no Canadá, uma etapa tão difícil. Por ter me escutado, me apoiado e incentivado.

Agradeço à minha chefe predileta, minha professora Silvia Guatimosim, por ter acreditado em mim sem me conhecer. Por ter me dado a chance de trabalhar em seu grupo (do qual tenho muito orgulho), de ter me colocado para frente, e confiado em mim e na ousadia de uma recém mestranda. Pela paciência, preocupação, e compreensão, nas falhas e dificuldades. Pelas explosões e pelos GAPDHs lindos.

Agradeço aos professores Vânia e Marco Prado (e agora em inglês porque ele sempre fez questão!) and Robert Gros (Western University) for accepting me in their laboratory, and give me the opportunity to began this academic journey with a huge experience from the research area. I have learned what research can be inside and outside the lab. Thank you for all support, for opening your home for me, for the motivational letters every morning in my desk. I am trully thankfull!

Aos amigos que a me ensinaram os macetes de experimentos (1,2,3,4 vezes), àqueles que se juntaram para os cálculos de renal; que ensaiaram inúmeras apresentações de posters; que roubei luvas coloridas para a coleção particular; ou àqueles (a) que ganharam dinheiro às minhas custas em apostas no meu horário de chegada; eu não tenho como agradecer. Foi no dia-a-dia que vocês se fizeram presente. Nos protocolos compartilhados e no cafezinho das 16h. Vocês fizeram esse caminho mais leve e sorridente. Não teria sido o mesmo sem vocês.

E por último, agradeço à mim! Por ter decidido viver o sonho da Fisiologia, e fazer o melhor que podia nesses anos. Por ter me superado, vivido dia após dia; por ter aprendido a me bastar, a me cobrar menos e a respeitar meu ritmo. Concluo esse mestrado não só com um título de mestre, e um SNC um pouco mais ansioso, mas como coração cheio de gratidão por tanto aprendizado e amadurecimento. O caminho é longo, mas o passo é um de cada vez. Que venha o próximo!

Resumo

Sti-1 (Stress inducible protein) é uma importante co-chaperona da maquinaria Hsp70/Hsp90 que desempenha um papel chave na maturação proteica e iniciação de cascatas intracelulares. Todavia, sua contribuição no coração permanece desconhecida. Esse projeto adquire uma alta relevância quando se observa que ensaios de Western Blot de corações humanos de pacientes com insuficiência cardíaca apresentaram expressão reduzida da proteína STI-1, quando comparadas a amostras de pacientes controles. Assim, modelos de estudo animal que apresentam a redução da expressão de STI-1 se fazem importantes na compreensão do papel dessa chaperona na fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Dessa forma, o objetivo desse projeto é investigar o impacto da redução da expressão da proteína STI-1 no coração durante a o desenvolvimento fisiológico e frente ao estresse cardíaco causado por agonista adrenérgico, isoproterenol. Foram, portanto, utilizados dois modelos geneticamente modificados, o camundongo STI-1^{+/-} e o Δ TPR, que apresentam redução global da STI-1. Inicialmente, o desenvolvimento corporal, estrutura e funcionamento cardíaco foi avaliado em camundongos selvagem Wild-type (C57BL) e geneticamente modificados com níveis reduzidos de STI-1, com idades entre 8-12 semanas. Em seguida, dois grupos, de cada genótipo, foram tratados por 7 dias; um com salina e outro com isoproterenol intraperitoneal (20mg/Kg/dia). No oitavo dia, após a realização de exame de ecocardiograma, os camundongos foram eutanasiados e os corações, coletados, pesados e usados para histologia, ensaios de Imuno-histoquímica, para isolamento de cardiomiócitos para análises de área celular; extração de proteínas e RNA para ensaios de Western Blot e qPCR, respectivamente. Após a comprovação de que a STI-1 é expressa não só em corações de pacientes humanos, mas também em cardiomiócitos de animais adultos, observou-se que todos os grupos de camundongos apresentaram desenvolvimento corporal e cardíaco semelhante no que tange ao nível molecular, estrutural e funcional. Seguindo o tratamento com isoproterenol, tanto os animais STI-1KO^{+/-} e Δ TPR tratados apresentaram aumento da razão peso do coração pelo comprimento da tibia quando comparado aos seus controles. No entanto, apenas cardiomiócitos provenientes de camundongos WT tratados com isoproterenol apresentaram hipertrofia celular, principalmente por aumento do diâmetro. Por meio de análises de morfometria, foi observado um significativo aumento na porcentagem de estroma e células inflamatórias, no tecido cardíaco dos animais STI-1KO^{+/-} e Δ TPR tratados com isoproterenol, justificando o ganho de peso cardíaco nesses modelos. Ao mesmo tempo, uma diminuição na porcentagem de cardiomiócitos foi observada com concomitante presença de caspase ativada no tecido e ausência de alterações na expressão da maquinaria Heat shock protein e de marcadores de estresse de retículo. Um ensaio de Western Blot revelou significativo aumento nos níveis de expressão da STI-1 após o tratamento nos animais WT, indicando que o Isoproterenol em um momento inicial recruta a maquinaria da STI-1. Achado equivalente foram vistos em camundongos submetidos à TAC (transverse aortic constriction), sugerindo que este efeito pode se estender à diferentes tipos de modelos de estresse cardíaco. De qualquer forma, o aumento da STI-1 não foi significativo nos animais STI-1KO^{+/-} e Δ TPR. Combinando esses resultados pode-se concluir que apesar da redução da expressão da STI-1 não comprometer a hipertrofia fisiológica que ocorre em resposta ao desenvolvimento cardíaco, ela impacta o processo de hipertrofia patológica. Além disso, corações com uma maquinaria STI-1 comprometida, são mais susceptíveis à desenvolver injúria cardíaca em resposta ao estresse cardíaco causado pelo aumento da atividade adrenérgica. Nossos dados apontam para um importante papel protetor da STI-1 no coração em condições de estresse.

Palavras chaves: STI-1; Hipertrofia cardíaca; Insuficiência cardíaca; Co-chaperona; Isoproterenol

Abstract

STI-1 (Stress inducible protein) is an important co-chaperone of Hsp70/Hsp90 machinery that plays a key role in protein maturation and intracellular cascades initiation. However, its role at heart physiology still unknown. This project becomes relevant when Western Blot assay of human heart samples from heart failure patients showed a reduction in STI-1 levels of expression, when compared to samples from control patients. Therefore, animal models that present a lower level of STI-1 are important to comprehend the role of this chaperone in the physiopathology of heart failure. This way, the main objective of this project is to investigate the impact of reduced STI-1 protein expression on heart during physiological development and in front of a cardiac stress induced by adrenergic agonist, isoproterenol. In this project were used two models of genetic engineering mice, the STI-1^{+/-} e o Δ TPR, with global reduction of STI-1 expression. Initially, body development, cardiac structure and function, were assessed for Wild-type (C57BL) and genetically engineered mice with reduced STI-1 levels, aging from 8-12 weeks. Afterwards two groups were treated for 7 days, one with saline and other with isoproterenol intraperitoneally (20mg/Kg/day). Mice were euthanized after proceeding an echocardiogram exam, and hearts weighted and used in histology for morphometric quantification; in cardiomyocyte isolation for cell imaging and cellular area analysis; in protein extraction for Western Blot analysis; and RNA extraction for qPCR techniques. After confirmation that not only human hearts, but also cardiomyocytes from adult mice express STI-1 protein, was noticed that all mice lines presented similar body and cardiac development, from a molecular, structural and functional aspect. After the treatment, both WT, STI-1KO^{+/-}, and Δ TPR mice treated with isoproterenol showed an increase in heart weight by Tibia length ratio, when compared to their controls. Nevertheless, only isoproterenol stimulated wild-type cardiomyocytes presented cellular hypertrophy, with increased diameter. Through morphometric analysis, a significant increase in stromal tissue and inflammatory cells percentage in STI-1KO^{+/-} and Δ TPR animals stimulated with isoproterenol was observed, justifying the gain in heart weight, without concomitant cellular hypertrophy in this model. At the same time, a decrease in cardiomyocytes was noticed with concomitant major presence of activated caspase in the tissue and no difference in the levels of Heat shock protein machinery and in ER stress markers. A Western Blot assay showed a significant increase of STI-1 level of expression after treatment in WT Animals; indicating that Isoproterenol in an initial moment recruits STI-1 machinery. Equivalent findings were seen in mice subjected to transverse aortic constriction, suggesting this effect can be extended to different cardiac stress models. However, this increased at STI-1 was not significant in STI-1KO^{+/-} and Δ TPR animals. Therefore, combining these results can be concluded that, the reduction in STI-1 protein expression do not affect the physiological hypertrophy from cardiac development, although it compromises the cardiac pathological process. Also hearts with an impaired response from the STI-1 machinery, are more susceptible to develop cardiac injury induced by a major adrenergic stimuli. The project results indicate an important protector role from STI-1 in hearts in front of stress conditions.

Key words: STI-1; Cardiac hypertrophy, Heart failure, Co-chaperone, Isoproterenol.

Lista de figuras

<i>Figura 1 - Esquematização da hipertrofia patológica:</i>	16
<i>Figura 2- Estrutura da STI-1:</i>	17
<i>Figura 3- Funcionamento da maquinaria chaperonina:</i>	18
<i>Figura 4- Estrutura da STI-1 de animais ΔTPR:</i>	21
<i>Figura 5- Genotipagem animais WT, STI-1+/- e ΔTPRhet:</i>	22
<i>Figura 6- Esquema experimental:</i>	23
<i>Figura 7- Ecocardiograma PSLAX B-Mode:</i>	29
<i>Figura 8- Ecocardiograma PSLAX M-Mode:</i>	29
<i>Figura 9- Ecocardiograma SAX B-Mode:</i>	30
<i>Figura 10- Ecocardiograma SAXM-Mode:</i>	31
<i>Figura 11- Amostras de coração de pacientes com insuficiência cardíaca apresentam redução na expressão da STI-1:</i>	31
<i>Figura 12- STI-1 está presente no sarcolema e região perinuclear de cardiomiócitos:</i>	32
<i>Figura 13- Coração de camundongos STI-1+/- não apresentam alteração no nível de expressão das HSP:</i>	33
<i>Figura 14- Maturação proteica do receptor de mineralocorticoide nos animais STI-1+/- não está comprometida:</i>	34
<i>Figura 15- Coração de camundongos STI-1+/- não apresenta alteração no nível de expressão do marcador de estresse reticular- GRP78:</i>	35
<i>Figura 16- Fosforilação da AKT está reduzida no sítio Ser473 e Thr 308 em amostras cardíacas de camundongos STI-1+/-:</i>	36
<i>Figura 17- Peso e comprimento corporal semelhante entre animais WT e STI-1+/-:</i>	37
<i>Figura 18- Animais STI-1+/- apresentam razão de peso cardíaco similar a animais WT, independente do normalizador:</i>	38
<i>Figura 19- O percentual de cardiomiócitos é semelhante entre corações provenientes de camundongos selvagens e STI-1+/-:</i>	39

Figura 20- Análise de cardiomiócitos isolados de animais STI-1+/ indica área celular equivalente ao de animais WT:-----	40
Figura 21- Parâmetros da função sistólica encontram-se normais em animais STI-1+/ com 1 mês de idade:-----	41
Figura 22- Coração de animais STI-1+/ adultos apresentam função sistólica e estrutura cardíaca similares aos animais WT:-----	42
Figura 23- Redução dos níveis de expressão da proteína STI-1 em animais ΔTPR, e presença da proteína STI-1 com sítio ΔTPR deletado na faixa dos 53 kDa:-----	43
Figura 24- Diminuição da fluorescência representativa para STI-1 no tecido cardíaco de animais ΔTPR:-----	44
Figura 25- Membros da maquinaria chaperonina não apresentam alteração nos animais ΔTPR:- -----	45
Figura 26- Animais ΔTPR apresentam desenvolvimento corporal normal, peso e morfometria cardíaca semelhante aos animais WT:-----	47
Figura 27- Ecocardiograma demonstra função sistólica e estrutura de paredes e câmaras de animais ΔTPR adultos sem alterações:-----	48
Figura 28- Amostras cardíacas de camundongos STI-1+/- não apresentam alteração na expressão do receptor β1:-----	49
Figura 29- Recrutamento da maquinaria STI-1 com aumento da sua expressão em animais WT, pós tratamento: -----	50
Figura 30- Animais WT submetidos à TAC apresentam aumento da expressão de STI-1:-----	51
Figura 31- Expressão da STI-1, em animais STI-1+/-, pós tratamento, com isoproterenol não se altera:-----	52
Figura 32- Expressão do complexo Heat shock protein não se altera pós tratamento nos grupos experimentais:-----	52
Figura 33- Ausência de indício de estresse reticular em animais STI-1^{+/-}-ISO, uma vez que a expressão de marcadores de ER stress se encontra semelhante entre os grupos experimentais: -----	54
Figura 34 - Nível de ubiquitinação proteica não apresenta diferença significativa entre todos os grupos experimentais:-----	54
Figura 35- Aumento significativo da expressão de ANP em animais STI-1+/--ISO, indicando estresse cardíaco:-----	55

Figura 36- Aumento da razão do peso cardíaco pelo peso corporal em camundongos tratados com isoproterenol:-----56

Figura 37- Cardiomiócitos provenientes de camundongos STI-1+/- não apresentam aumento da área celular em resposta ao tratamento com o isoproterenol:-----57

Figura 38- Aumento do comprimento e diâmetro de cardiomiócitos WT, pós tratamento com isoproterenol é compatível com um quadro de hipertrofia cardíaca concêntrica:-----58

Figura 39- Aumento da porcentagem de estroma e células inflamatórias no tecido cardíaco de animais STI-1+/- após tratamento com isoproterenol:-----59

Figura 40- Perda celular com diminuição da porcentagem de cardiomiócitos no tecido e aumento da caspase ativada nos animais STI-1+/-ISO: -----60

Figura 41- Expressão da STI-1 inalterada nos animais Δ TPR, assim como o nível de proteínas ubiquitinizadas e a expressão de marcadores de estresse reticular:-----61

Figura 42- Animais Δ TPR apresentam aumento da razão peso do coração/ peso corporal com concomitante aumento de estroma e células inflamatórias, e perda de cardiomiócitos:-----62

Figura 43- Animais Δ TPR apresentam indicativos de perda da função cardíaca, e padrão de expressão da STI-1 semelhante à pacientes com insuficiência cardíaca:-----64

Lista de abreviaturas

- Δ TPR.....Modelo animal com TPR1 deletado
- AKT.....Protein kinase B
- ANP.....Atrial natriuretic peptide
- ATF4.....Activating Transcription Factor 4
- ATF6.....Activating Transcription Factor 6
- a.u..... Arbitrary units- Unidades arbitrárias
- β 1-AR.....Receptores β 1 adrenérgicos
- Bip.....Binding Immunoglobulin protein
- BPPares de base
- Bpm.....Batimentos por minutos
- cDNA.....DNA complementar
- CHOP.....C/EBP Homologous *Protein*
- CO..... Cardiac output- Débito cardíaco
- CT.....Ciclo limiar
- CTRL.....Controle
- d.....Diástole
- DAB.....Diamino benzidina
- DB.....Solução de dissociação
- DNAÁcido desoxirribonucleico
- EDTA.....Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EF..... Ejection fraction- Fração de ejeção
- ER.....Retículo Endoplasmático
- ERAD.....Degradção de proteínas associada ao ER
- FS.....Fractional shortening- Fração de encurtamento

- GAPDH.....Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GR.....Receptores de glicocorticoides
- GRP78.....Glucose regulated protein
- HC.....Hipertrofia cardíaca
- HF..... Heart Failure- Insuficiência cardíaca
- HOP.....Human organizing protein
- HRP.....Horseadish Peroxidase
- Hsp.....Heat Schock protein
- IC.....Insuficiência cardíaca
- IP.....Intraperitoneal
- IsoIsoproterenol
- Kda.....Kilodaltons
- KO.....Knockout
- LV.....Ventrículo esquerdo
- LVID.....Left Ventricle internal diameter- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo
- LVPW.....Left Ventricle posterior wall- Parede posterior do ventrículo esquerdo na d
- Mode B.....Modo Bidimensional-2D
- Mode M..... Modo Unidimensional
- MR.....Receptores de mineralocorticoides
- mRNA.....RNA mensageiro
- ON.....Ontario
- PBS.....Tampão fosfato-salino
- PCR.....Reação em cadeia da polimerase
- PFA.....Paraformaldeído
- PH.....Potencial Hidrogeniônico
- PLAX.....Parasternal Long Axis- Eixo longo paraesternal
- PMSF.....Fluoreto de fenilmetilsulfonil

- qPCR.....PRC quantitativo
- RNA.....Ácido ribonucleico
- RS.....Retículo sarcoplasmático
- RV.....Ventrículo direito
- s.....Sístole
- SALSalina
- SAX.....Short axis- Eixo curto
- SER.....Serina
- STI-1.....Stress inducible protein
- STI-1^{+/-}Modelo animal KO heterozigoto
- SV.....Stokr volum- Volume de ejeção
- TAC.....Constricção da aorta transversa
- TBS-T.....Soro fisiológico tamponado com tris e
tween
- THR.....Treonina
- TRP's.....Tetratricopeptídeos
- UPR.....Resposta a proteínas mal enoveladas
- WT.....Wild Type

Lista de símbolos

- ΔDelta do alfabeto grego
- mg.....Miligramas
- Kg.....Quilogramas
- βBeta do alfabeto grego
- Ca^{2+}Íon cálcio
- mm.....Milímetros
- M.....Molar
- μmMicrometros
- mM.....Milimolar
- LLitro
- KCl.....Cloreto de potássio
- NaCl.....Cloreto de sódio
- MgCl_2Cloreto de Magnésio
- NaH_2PO_4Fosfato monossódico
- CaCl_2Cloreto de Cálcio
- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$Pirofosfato de sódio
- H_2OÁgua
- NaF.....Fluoreto de sódio
- Na_3VO_4Ortovanadato de sódio
- μgMicrograma
- μMMicromolar
- nm.....Nanómetro
- h.....Hora
- min.....Minuto
- n.....Número experimental

INDÍCE

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1- Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
2.2.1 Caracterização do modelo Knockout	19
2.2.2. Caracterização da resposta ao estímulo hipertrófico patológico do modelo Knockout	19
2.2.3. Confirmação do fenótipo apresentado na resposta hipertrófica pelo modelo Δ TPR	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.1.1 Linhagem STI-1 Knockout	20
3.1.2 Linhagem STI-1 Δ TPR	20
3.2. Genotipagem dos animais	21
3.3. Tratamento com isoproterenol	22
3.4. Medida do peso dos órgãos	23
3.5. Análise histológica	23
3.6. Isolamento de cardiomiócito ventricular de animais adultos	24
3.7. Western Blotting	25
3.8. Extração de RNA, Transcrição Reversa e PCR em tempo real	26
3.9. Imunohistologia	26
3.9.1 Imunofluorescência dos cardiomiócitos	26
3.9.2 Imunofluorescência do tecido	27
3.10 Ecocardiograma	27
3.10.1 Preparação do animal	27
3.10.2 Aquisição de imagens	28
3.10.3 Análise das imagens	28
3.11 Análises estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1- Avaliação do impacto da redução da STI-1 na hipertrofia fisiológica do desenvolvimento	31
4.1.1- Avaliação da maquinaria chaperonina STI-1	31
4.1.2- Avaliação do desenvolvimento corporal	36
4.1.3- Avaliação do desenvolvimento cardíaco	38
4.1.4- Avaliação do desenvolvimento cardíaco à nível morfológico	38
4.1.5- Avaliação do desenvolvimento cardíaco à nível funcional	40

4.2- Avaliação do impacto da redução da STI-1 em um modelo de estresse cardíaco causado pela injeção de isoproterenol	49
4.2.1 Avaliação da maquinaria chaperonina STI-1 pós tratamento	49
4.2.2- Avaliação da resposta cardíaca ao estímulo estressor	56
4.2.3- Avaliação da resposta cardíaca à nível morfológico	57
4.2-4- Avaliação da resposta cardíaca à nível funcional	63
5.DISSCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

Considerando o equilíbrio como princípio fundamental do nosso organismo, de forma não diferente o coração responderá às demandas corporais buscando sempre a homeostasia. Em algumas situações, fisiológicas e patológicas, há um aumento da atividade ou de sobrecarga funcional cardíaca, como no:

- Aumento da demanda metabólica e do débito cardíaco: durante o crescimento fisiológico do indivíduo; exercícios físicos; quadros anêmicos.
- Aumento da carga pressórica como: na hipertensão arterial; estenose ou insuficiência da aorta
- E ainda por condições idiopáticas relativos à natureza genética.

Em circunstâncias como essas, é exigido do coração um maior desempenho para contrapor os desequilíbrios. Caso essa demanda se apresente de forma crônica ou permanente, o coração buscará alternativas para se adaptar, e este aumento de trabalho cardíaco será traduzido em aumento de massa do coração, tanto pela hipertrofia celular do cardiomiócito quanto pelo o aumento da porcentagem de estroma conjuntivo (Mill and Vassallo, 2001) (Pereira, 1993).

A hipertrofia considerada fisiológica, por exemplo aquela que se dá durante o desenvolvimento cardíaco do crescimento ou em atletas pelo exercício físico; está relacionada ao aumento concomitante e proporcional do comprimento e diâmetro celular. Por sua vez, a hipertrofia considerada patológica, se dá pela formação de novos sarcômeros adicionados ou em paralelo, resultando em um aumento do diâmetro celular que caracteriza a hipertrofia concêntrica, ou em série no caso de um quadro de hipertrofia excêntrica com um aumento maior do comprimento celular (Hunter and Chien, 1999), como ilustrado na Figura 1 abaixo.

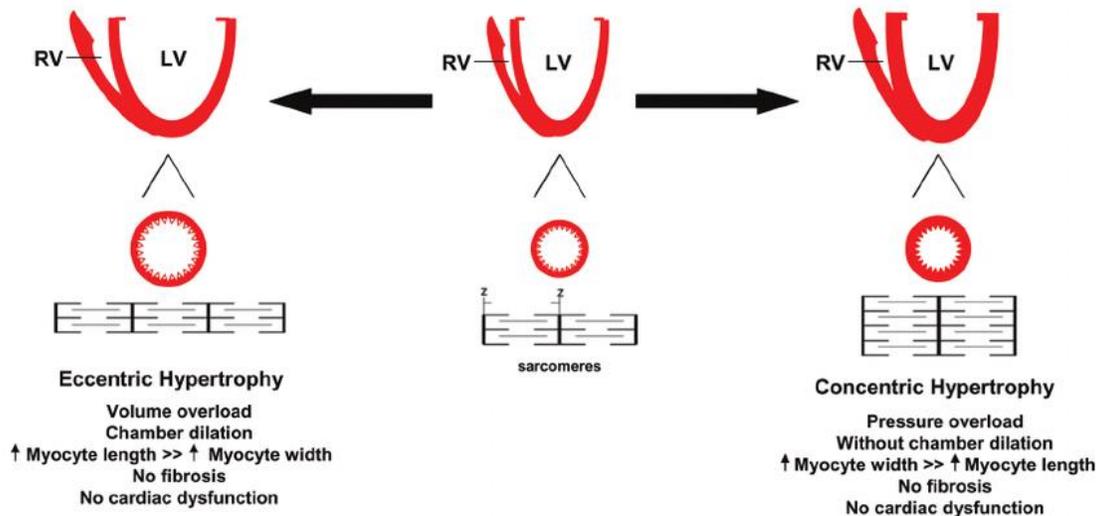


Figura 1 – Esquematisação da hipertrofia patológica: Modelos de hipertrofia cardíaca e representação das alterações à nível histológico (Fernandes et al., 2011). No centro tem-se a disposição de sarcômeros em um coração saudável. À direita, representação da hipertrofia excêntrica com a adição de sarcômeros em série e à esquerda a ilustração de um coração em hipertrofia concêntrica, com adição de sarcômeros em paralelo.

A hipertrofia cardíaca se torna importante num contexto patológico, uma vez que está associada às principais causas de mortes no mundo (Lloyd-jones et al., 2010), elevando a predisposição a arritmias ventriculares; isquemia do miocárdio; disfunções ventriculares sistólica e diastólica; insuficiência cardíaca e assim à morte súbitas. Dessa forma, é essencial compreendermos as bases moleculares que desencadeiam a hipertrofia cardíaca, buscando sempre novos alvos terapêuticos no combate à falência cardíaca.

A proteína STI-1 (Stress inducible protein), STIP1 (stress-inducible phosphoprotein 1), ou HOP (Hsp organizing protein) (Lackie et al., 2017a) é uma co-chaperona da maquinaria de chaperonas Heat Shock Protein: HSP90, HSP70; e tem o aumento da sua expressão, como o próprio nome já indica, relacionado à fatores de estresse. Foi identificada nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em experimentos de indução a estresse térmico, e estudos já mostraram que o seu gene codificador está bem conservado entre leveduras, camundongos, ratos e humano (MENDONÇA, 2007).

As chaperonas tem um papel muito bem caracterizado no que se diz respeito à maturação proteica com o enovelamento de proteínas recém traduzidas, para que estas alcancem sua forma terciária funcional. Já se sabe também, que as chaperonas participam de diversas vias de sinalização intracelular, permitindo que proteínas clientes encontre estabilidade em uma conformação adequada na qual poderão ser ativadas, por processos pós-traducionais, como por exemplo a fosforilação (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

A STI-1 apresenta três domínios de repetição tetratricopeptídeos (TRP's) em sequência denominadas (TRP1, TRP2A, TRP2B) (Lackie et al., 2017a), como ilustrado na Figura 2, abaixo. Estes domínios permitem a ligação simultânea de STI-1 nas chaperonas, facilitando a transferência física das proteínas clientes entre da HSP70 para HSP90, contribuindo, portanto, para a funcionalidade e estabilidade desse complexo (Figura 3). Dessa forma, concluímos que a STI-1 está relacionada à síntese e maturação proteica e à ativação de vias de sinalização intracelulares.

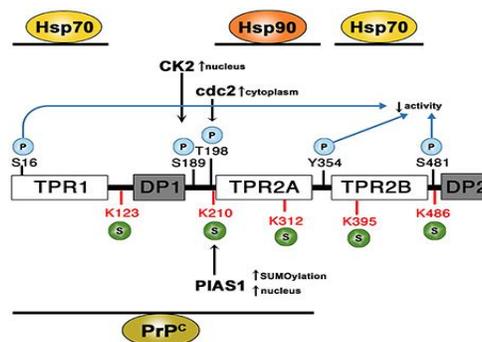


Figura 2- Estrutura da STI-1: Esquema da estrutura da co-chaperona STI-1 com os domínios Tpr's de ligação para as HSPs. O domínio TPR1 e TRPR2b são redundantes por ambos realizarem a ligação com a chaperona Hsp70. Por sua vez o sítio TPR2 é o alvo para a ligação com a chaperona Hsp90. (Lackie et al., 2017a)

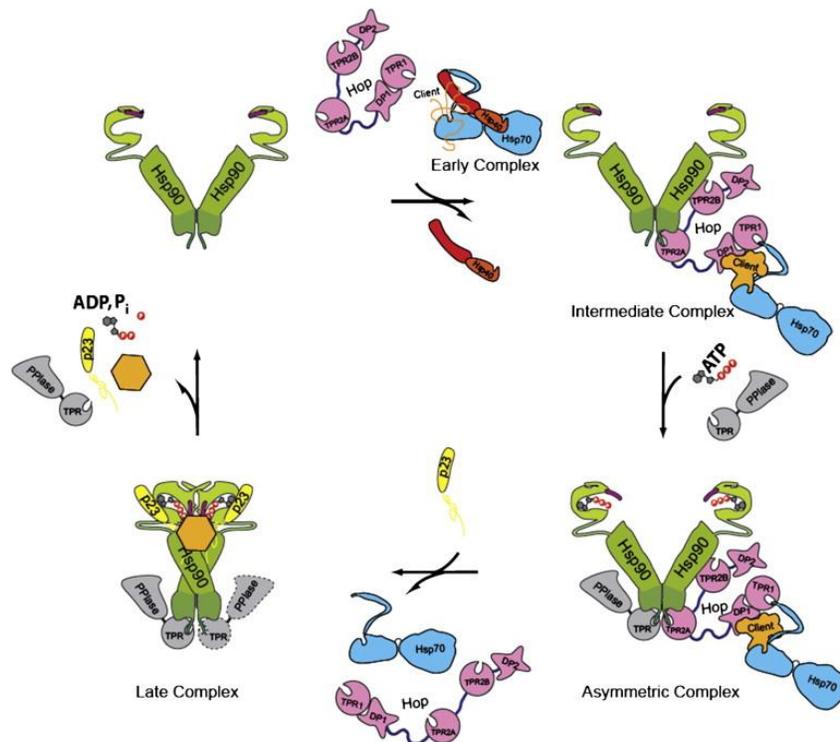


Figura 3- Funcionamento da maquinaria chaperonina: Interação maquinaria de chaperona HSP90-HSP70-STI-1 (Li et al., 2012). Proteínas clientes ligadas à Hsp70 são transferidas, com auxílio da co-chaperona STI-1, para a chaperona Hsp90. Nessa, a proteína cliente alcança uma estabilidade para ser maturada ou ativada e em seguida liberada do complexo.

Até hoje pouco se sabe sobre a função da co-chaperona STI-1 no coração. Sua expressão em corações foi descrita apenas em embriões com 10 dias de vida, e que em animais knockout (KO), com completa privação embrionária desta, não se desenvolvem normalmente, e morrem (Beraldo et al., 2013). Seu estudo tem sido muito bem direcionado para o sistema nervoso e as doenças neurodegenerativas (Zanata et al., 2002) mas o seu papel na hipertrofia cardíaca permanece, ainda, obscuro.

Considerando que para a ocorrência da hipertrofia cardíaca, é necessário a ativação de cascatas de sinalização intracelular de hipertrofia, culminando na síntese de proteínas estruturais para o aumento de diâmetro das células, também temos a importância de compreender a participação e contribuição da STI-1 neste processo hipertrófico.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivos Gerais

Investigar o impacto da redução da STI-1 no processo de hipertrofia fisiológica e patológica

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Caracterização do modelo Knockout

- Avaliação dos níveis de expressão da proteína STI-1 nos modelos geneticamente modificados

- Avaliação do Desenvolvimento fisiológico corporal e cardíaco

- Avaliação da morfologia do tecido cardíaco

- Avaliação da área, comprimento e diâmetro do cardiomiócito

- Avaliação da Função cardíaca

- Avaliação da expressão da maquinaria de chaperonas e proteínas clientes

- Avaliação do estresse reticular

2.2.2. Caracterização da resposta ao estímulo hipertrófico patológico do modelo Knockout

Realizar os mesmos objetivos propostos no item 2.2.1

2.2.3. Confirmação do fenótipo apresentado na resposta hipertrófica pelo modelo Δ TPR

- Avaliação da resposta corporal e cardíaca ao estímulo hipertrófico patológico

-Avaliação da estrutura e constituição do tecido cardíaco, buscando indícios de remodelamento cardíaco

- Avaliação da perda de cardiomiócitos

- Avaliação do remodelamento cardíaco

- Avaliação dos níveis de estresse reticular

- Avaliação dos níveis de degradação proteica
- Avaliação da função cardíaca

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos de 8-12 semanas, selvagens (C57BL/6 wild type), STI-1^{+/-} (heterozigotos), e Δ TPR (heterozigotos) mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG sob condições de temperatura e foto período (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas. Ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada foram oferecidos ad libitum. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o número de protocolo 57 / 2013. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após serem sedados com o isoflurano.

3.1.1 Linhagem STI-1 Knockout

Os camundongos geneticamente modificados dessa linhagem foram gerados a partir do silenciamento do gene *Stip I* em um dos alelos. A deleção do gene em ambos os alelos é tolerada em leveduras e na espécie *C. elegans*. No entanto, a ausência total de expressão da proteína STI-1 compromete o desenvolvimento embrionário de camundongos e se torna, portanto, letal (Beraldo et al., 2013).

3.1.2 Linhagem STI-1 Δ TPR

Para que seja possível uma interação simultânea entre a HSP90 e HSP70 através da co-chaperona STI-1, esta possui três domínios de ligação, como explicado na introdução. Sabe-se que os domínios TPR2A e TPR2B são indispensáveis para seu funcionamento adequado. No entanto, em algumas espécies mais primitivas pode haver a ausência do domínio TPR1, redundante ao TPR2B, por se ligar também à HSP70. Há então uma perda de função da proteína, mas sem o comprometimento letal.

Considerando que a expressão de domínios TPR1 se manteve bem preservada ao longo da evolução, pode-se supor que este tenha alguma relevância para o funcionamento ideal da STI-1 em mamíferos. Com o objetivo de determinar, então, a importância do domínio TPR1 e o funcionamento ideal da co-chaperona, camundongos Δ TPR heterozigotos foram criados pelo sistema crê-los, apresentando um alelo hipomórfico para o gene Stip 1 com a deleção do sítio de ligação TPR1 como apresentado na Figura 4 (Lackie et al., 2017b).

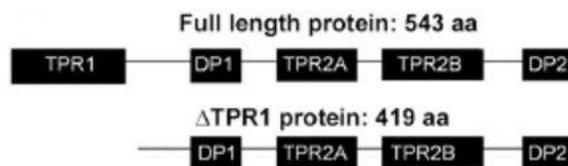


Figura 4- Estrutura da STI-1 de animais Δ TPR: Modelo da estrutura da proteína STI-1 de animais selvagens (WT- acima), com todos os sítios de ligações, e de animais geneticamente modificados (Δ TPR- abaixo) com a deleção do sítio TPR1.

Ao contrário do que ocorre com os animais KO homozigotos, a deleção no gene do domínio TRP1 em ambos os alelos não se faz letal. A ausência do domínio leva à uma evidente perda de eficiência da STI-1, mas uma vez que se trata de um sítio de ligação que tem a mesma função que o sítio TPR2B, o animal Δ TPR homo ainda é capaz de sobreviver. Uma notável diferença é observada entre o animal Δ TPRHET, e HOMO. Este é bem menor e possui um desenvolvimento bem mais lento que animais WT e Δ TPRHET. No entanto, como o fenótipo cardíaco que era desejado a este projeto foi bem evidente no animal Δ TPRHET, não nos preocupamos em avaliar os animais Homozigotos nesse primeiro momento.

3.2. Genotipagem dos animais

A genotipagem dos camundongos C57BL/6 – WT e STI-1^{+/-} e Δ TPR foi realizada a partir do DNA genômico extraído da cauda ou orelha dos animais. O procedimento padrão para a extração do DNA genômico foi realizado pela digestão do tecido com proteinase K e precipitação do DNA com isopropanol. A genotipagem foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de um termociclador, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para STI-1. Presença de uma banda à 241 bp indica animal WT, enquanto duas bandas uma 240 e outra à 400 bp indicam um animal

KO heterozigoto. Para os animais Δ TPR heterozigotos observa-se também duas bandas uma a 240 bp e outra à 170 bp como pode ser observado na Figura 5.

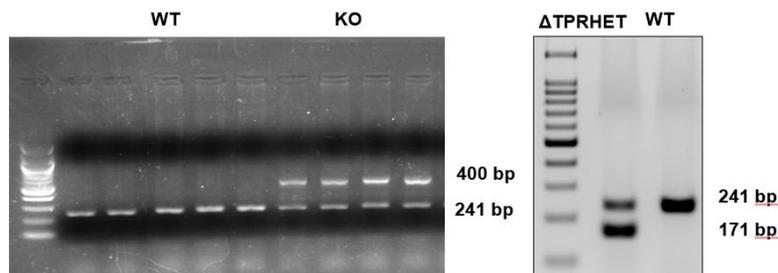


Figura 5- Genotipagem animais WT, STI-1^{+/-} e Δ TPRhet: Demonstrativo da genotipagem dos animais STI-1^{+/-}, à esquerda, com a presença de duas bandas no gel (200 e 400 bp) e à direita, dos animais Δ TPRhet também, com duas bandas (240 e 170 bp).

3.3. Tratamento com isoproterenol

Camundongos machos selvagens (WT), e geneticamente modificados com redução da expressão da STI-1 (STI-1^{+/-} e Δ TPRhet) foram tratados com a administração intraperitoneal de isoproterenol (Iso) (Sigma) na dose de 20mg/kg/dia diluído em salina durante sete dias consecutivos. Os animais controles receberam tratamento similar com a substituição da droga por salina, como esquematizado na Figura 6.

A ativação dos receptores adrenérgicos (β 1-AR) leva à uma ação coordenada de proteínas envolvidas no manejo do cálcio, provocando seu extravasamento do retículo sarcoplasmático (RS) durante a diástole. Um efeito crônico dessa estimulação resulta na depleção dos estoques internos Ca^{2+} culminando em um quadro conhecido como estresse do RS, que hoje é sabidamente conhecido como um fator que predispõe ao desenvolvimento da IC e outras patologias. Além disso o modelo de indução de hipertrofia cardíaca por isoproterenol via receptor β -AR já está muito bem descrito, sendo de fácil replicabilidade e prático. Tem ainda a vantagem de não causar outras alterações corporais como ganho de peso e desenvolvimento de hipertensão associada a HC; dissociando desta forma o componente cardíaco do vascular (Mill and Vassallo, 2001).

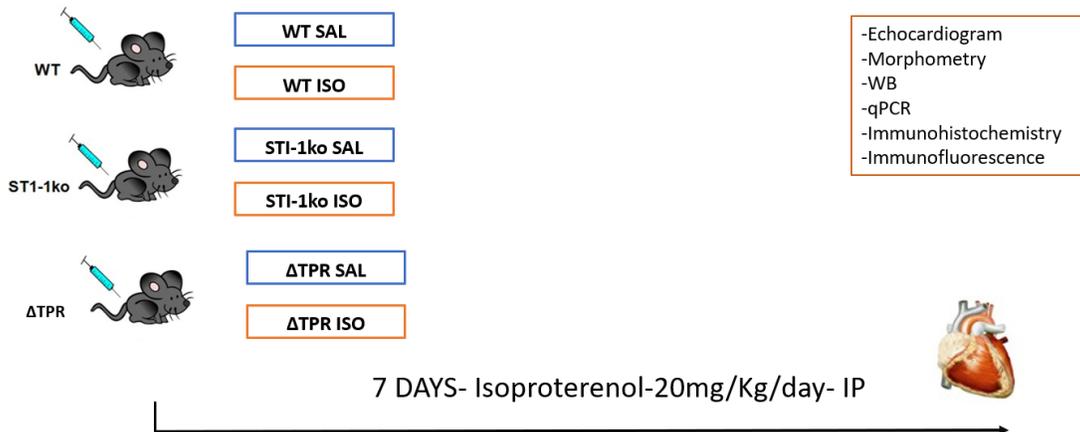


Figura 6- Esquema experimental: Esquema da organização do experimento como Isoproterenol. Animais das linhagens WT, STI-1+/- e Δ TPRhet foram divididos em grupos tratados com isoproterenol por 7 dias e grupos controles.

3.4. Medida do peso dos órgãos

Foi utilizada a razão entre o peso do coração submerso em solução DB (mg) por comprimento da tíbia (mm) ou peso corporal (mg) para comparação da dimensão do coração entre os grupos experimentais. Além disso, foi obtida também a dimensão do ventrículo esquerdo em conjunto com o septo interventricular (mg) normalizados pelo comprimento da tíbia (mm) ou peso corporal (mg) para a avaliação da ocorrência de hipertrofia ventricular esquerda.

3.5. Análise histológica

Camundongos WT, KO, Δ TPR, foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina e, em seguida, realizou-se uma incisão na região do pescoço do animal para inoculação de solução de KCl 10% na artéria carótida direita de maneira a induzir a parada do coração em diástole. Após este procedimento, os corações foram removidos e os ventrículos cardíacos fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) durante 48 horas. Dado esse período, os ventrículos foram imersos em álcool em uma série crescente de concentração (70, 80, 95 e 100%), sendo mantidos durante 30 minutos em cada solução. A imersão por 30 minutos em álcool absoluto foi

realizada três vezes. Em seguida, os ventrículos foram incubados também durante 20 minutos em solução de xilol, sendo esse procedimento realizado duas vezes. Os ventrículos foram, então, incluídos em paraplast (Sigma) e cortados, com auxílio de micrótomo, em secções de 5µm de espessura. Três secções por amostra, a intervalos de 25 µm, foram depositadas em lâminas para coloração com hematoxilina-eosina. Após coloração, as lâminas foram levadas para análise ao microscópio óptico de campo claro (Zeiss, Germany), aumento 40X, no qual registram fotos de 30 áreas distintas do ventrículo cardíaco esquerdo (software AxioVision da Zeiss), resolução de 1300 x 1030 pixels, de cada camundongo analisado. As imagens foram examinadas através do programa Image J para análise do diâmetro das fibras cardíacas e da porcentagem volumétrica de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório.

3.6. Isolamento de cardiomiócito ventricular de animais adultos

Cardiomiócitos de camundongos adultos foram isolados de acordo com a metodologia previamente descrita por (Guatimosim et al., 2001). Resumidamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de Ca²⁺ (em mmol/L: NaCl, 130; KCl, 5,4; HEPES, 25; MgCl₂, 0,5; NaH₂PO₄, 0,33; glicose, 22 e insulina 100U/mL; pH=7,40). Posteriormente, o coração foi perfundido com solução de Tyrode contendo 50 µmol/L de CaCl₂ e colagenase (tipo 2 -1 mg/mL). Após a etapa de digestão química, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de Ca²⁺ foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 µmol/L ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em meio 199. As células isoladas foram utilizadas em experimentos de morfometria celular, Western Blot e imunofluorescência.

3.7. Western Blotting

Cardiomiócitos de camundongos e ratos foram macerados por 40 minutos em tampão de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5; Na₄P₂O₇ x10 H₂O, 50; MgCl₂, 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na₃VO₄, 1). Ao fim do procedimento, seguiu-se a centrifugação do material (12 minutos, 8000 rpm, 4°C), coleta do sobrenadante e acondicionamento em freezer -80°C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford, 1976. 40-50 µg de proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida cuja concentração varia entre 10 e 12% dependendo da massa molecular da proteína-alvo. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120V e tempo máximo de 2 horas. A transferência foi realizada utilizando-se o aparato de transferência semi-dryer (BioRad), com voltagem fixa em 20V e tempo de transferência variando entre 25 e 30 minutos. Todas as membranas foram coradas em solução de Ponceau para monitorar a qualidade da transferência. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (do inglês, Tris-Buffered Saline; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas por 16 a 20 horas, a 4°C, com anticorpos primários diluídos em solução de leite 1% com TBS-T. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado a peroxidase (HRP) por 1 hora. Após este período, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant TL®. Foi utilizado o GAPDH como normalizador da expressão proteica.

3.8. Extração de RNA, Transcrição Reversa e PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica dos mRNAs de interesse dos cardiomiócitos o RNA total dos cardiomiócitos ventriculares foi extraído pelo reagente de isolamento de RNA PureZOL(BioRad) com o uso do Aurum Total Fatty and FibrousTissue Kit (Biorad). O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C até o uso posterior. Em seguida foi realizada a transcrição reversa, e o cDNA foi utilizado como molde para as análises de PCR em tempo real, utilizando Primers específicos. Para cada experimento, a reação sem cDNA foi usada como controle negativo. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e os dados normalizados pela expressão gênica do s26. Para síntese de cDNA e experimentos de PCR em tempo real foram utilizados reagentes da Biorad.

3.9. Imunohistologia

3.9.1 Imunofluorescência dos cardiomiócitos

Os cardiomiócitos foram fixados com solução 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS 1x por 15 min à temperatura ambiente. Logo após, procedeu-se à lavagem para remoção do PFA e permeabilização da membrana celular utilizando solução de PBS/Triton 0,5%. Após o bloqueio por 1h, os cardiomiócitos foram incubados overnight a 4°C com os seguintes anticorpos: anti-STI-1 (1:100, REF) e anti- α -actinina (1:150, Sigma-Aldrich). No dia seguinte, procedeu-se a lavagem das células durante 30 minutos com solução PBS e então as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluo 488 (1:500, Invitrogen) ou Alexa Fluo 633 (1:500, Invitrogen) por 1h a 4°C. A marcação nuclear foi obtida incubando as células com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 mg/mL, 1:25). As lâminas foram observadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 880 (CAPI, ICB, UFMG) com aumento de 63x.

3.9.2 Imunofluorescência do tecido

Os cardiomiócitos cortados com 10 μm , foram fixados com solução 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS 1x por 15 min à temperatura ambiente. Logo após, procedeu-se à lavagem para remoção do PFA e permeabilização da membrana celular utilizando solução de PBS/Triton 0,5%. Após o bloqueio por 1h, os cardiomiócitos foram incubados overnight a 4°C com os seguintes anticorpos: anti-STI-1 (1:200, REF). No dia seguinte, procedeu-se a lavagem das lâminas durante 30 minutos com solução PBS e então foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluor 647 (1:200- 1:400) por 1h a 4°C. A marcação nuclear foi obtida incubando as células com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 mg/mL, 1:25). As lâminas foram observadas usando o microscópio Evos com aumento de 40x.

3.10 Ecocardiograma

Ecocardiografia, em estado basal, foi realizada em camundongos ao completarem 30 dias e ao alcançarem a idade adulta. Em seguida, após o tratamento realizado por 7 dias com isoproterenol ou salina, os mesmos animais foram submetidos novamente ao processo.

3.10.1 Preparação do animal

Os camundongos foram anestesiados com Isoflurano 1.5% em oxigênio através do cone nasal e permaneceram respirando livremente durante todo o experimento. As patas foram fixadas aos eletrodos e em seguida os tórax dos animais foram depilados com o auxílio de creme depilatório Veet. A temperatura corporal foi monitorada e mantida entre 36°C e 37°C com auxílio do suporte térmico, e as imagens capturadas com batimentos entre 400-500 bpm aproximadamente.

3.10.2 Aquisição de imagens

As imagens capturadas na ecocardiografia foram obtidas pelo aparelho Vevo 2100 (Visual Sonics) com o transdutor MS250 e o pacote de cardiologia. Após o adequado posicionamento do animal e transdutor, imagens de cortes do eixo curto (sax- short axis) e longo (pslax- parasesternal long axis) do coração foram coletadas, em modo “M” (unidimensional) e “B” (Bidimensional-2D) pelo LV-trace.

3.10.3 Análise das imagens

As imagens foram analisadas como software VevoLab, versão 3.1. Nelas foram realizadas medidas do modo M e B em ambos os cortes, sendo calculado os valores dos seguintes parâmetros:

- SAX B-Mode
 - Frequência cardíaca (Heart Rate-bpm)
- SAX M-Mode
 - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole (LVID;d- mm)
 - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sistole (LVID;s- mm)
 - Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVPW;d- mm)
 - Parede posterior do ventrículo esquerdo na sistole (LVPW;s- mm)
 - Fração de ejeção (EF %)
 - Fração de encurtamento (FS %)
- PSLAX B-Mode
 - Frequência cardíaca (Heart Rate- bpm)
 - Volume de ejeção (SV- μ l)
 - Fração de ejeção (EF- %)
 - Fração de encurtamento (FS-%)
 - Débito cardíaco (CO- ml%min)
- PSLAX M-Mode
 - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole (LVID;d- mm)
 - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sistole (LVID;s- mm)
 - Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVPW;d- mm)
 - Parede posterior do ventrículo esquerdo na sistole (LVPW;s- mm)
 - Fração de ejeção (EF- %)
 - Fração de encurtamento (FS-%)
 - Débito cardíaco (CO- ml%min)

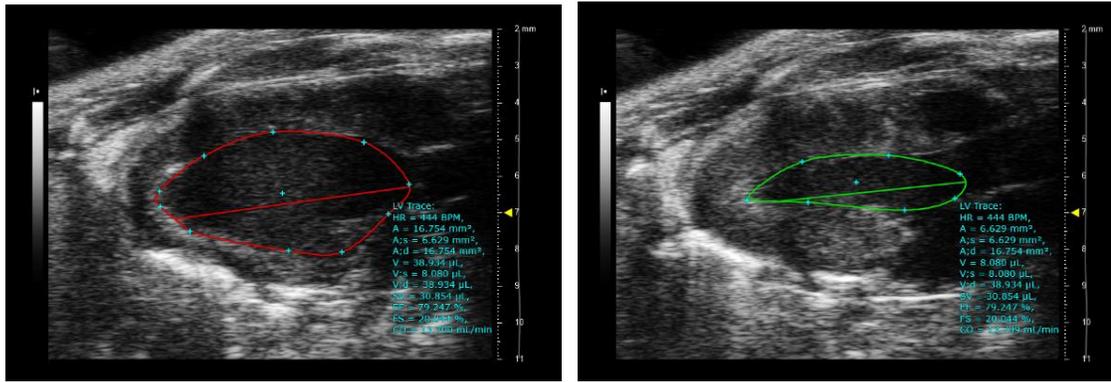


Figura 7- Ecocardiograma PSLAX B-Mode: Captura do eixo longitudinal no momento da diástole (vermelho) e sístole (verde) e avaliação do diâmetro da câmara interna do ventrículo esquerdo.

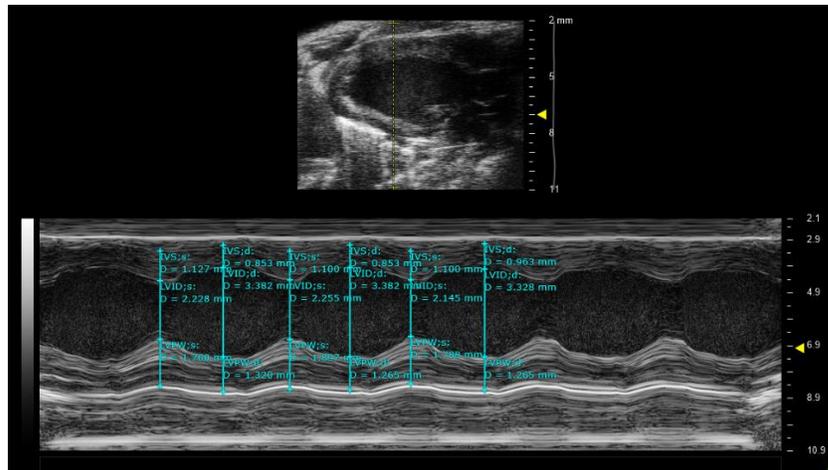


Figura 8- Ecocardiograma PSLAX M-Mode: Captura do eixo longitudinal com visualização das paredes anterior e posterior e avaliação da espessura.

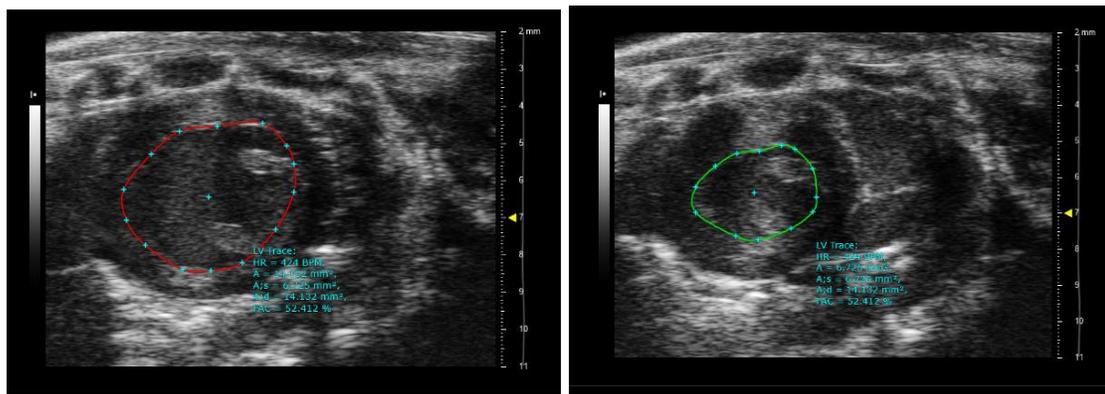


Figura 9- Ecocardiograma SAX B-Mode: Captura do eixo transversal no momento da diástole (vermelho) e sístole (verde) e avaliação do tamanho da câmara interna do ventrículo esquerdo.

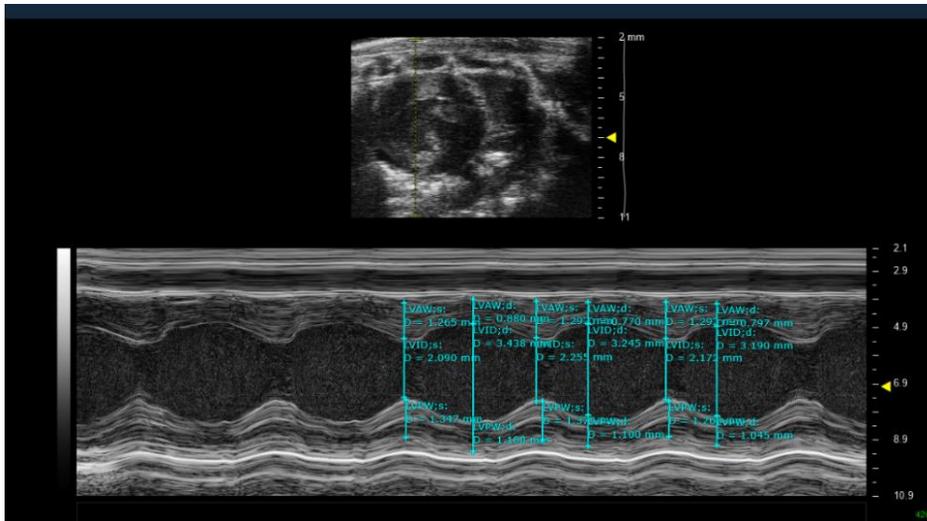


Figura 10- Ecocardiograma SAXM-Mode: Captura do eixo transversal com visualização das paredes anterior e posterior e avaliação da espessura.

3.11 Análises estatística

As análises dos resultados foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism 8.3.0. Para análises entre dois grupos realizou-se Teste t, não pareados considerando mesmo desvio padrão entre os grupos. Como probabilidade de significância considerou-se valor de $p < 0.05$. Para analisar experimentos que envolvem diferentes linhagens e tratamentos decidiu-se que comparar linhagens geneticamente modificados aos mesmos animais controles e analisar as suas respostas em relação a estes, seria mais coerente do que analisar todos os grupos ao mesmo tempo e camuflar possíveis diferenças significativas. Dessa forma, analisou-se genótipos WT com KO, e WT com Δ TPR separadamente, através do teste One-way Anova com Pós teste Turkey.

4. RESULTADOS

4.1- Avaliação do impacto da redução da STI-1 na hipertrofia fisiológica do desenvolvimento

4.1.1- Avaliação da maquinaria chaperonina STI-1

Muito pouco se tem descrito na literatura sobre a STI-1 em corações, sabendo-se apenas que esta está presente em embriões de camundongos (Beraldo et al., 2013). Nosso primeiro passo, foi avaliar a presença da STI-1 em corações de humanos e se existe alteração de sua expressão em amostras de pacientes com insuficiência cardíaca. A Figura 11, confirma a presença da STI-1 no tecido cardíaco de humanos e mostra que há uma redução dos seus níveis em pacientes com insuficiência cardíaca. Tendo esse resultado em mente e com o objetivo de melhor compreender o impacto da redução dessa proteína para a fisiologia cardíaca, utilizou-se nos próximos experimentos, dois modelos murinos geneticamente modificados que apresentam diminuição na expressão da STI-1, os camundongos STI-1^{+/-} e Δ TPR.

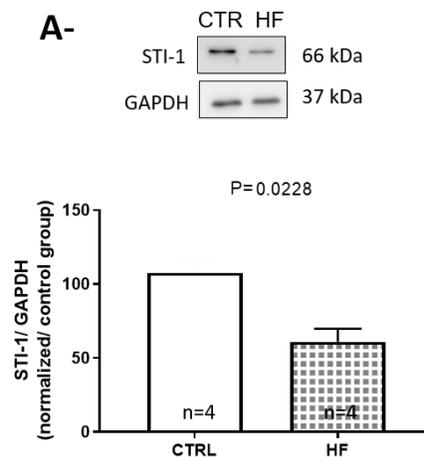


Figura 11- Amostras de coração de pacientes com insuficiência cardíaca apresentam redução na expressão da STI-1: A- representativo de Western Blot para STI-1, no tecido cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca, e pacientes controles; com respectivo gráfico com a análise semiquantitativa. N= número de amostras cardíacas. O gráfico ilustra o aumento significativo da expressão de STI-1 em pacientes humanos com insuficiência cardíaca, quando comparados com pacientes controle.

Camundongos STI-1^{+/-} apresentam redução de 50% na expressão de STI-1 em cardiomiócitos como apresentado na Figura 12-A. Além disso, utilizando-se da técnica de imunofluorescência para detectar a localização da STI-1 na célula cardíaca (marcação em verde), pode-se observar na Figura 12-B, que a expressão da STI-1 ocorre principalmente no sarcolema do cardiomiócito e em região perinuclear. Cardiomiócitos provenientes de animais STI-1^{+/-} apresentaram redução na marcação de STI-1 no sarcolema e ausência da marcação perinuclear.

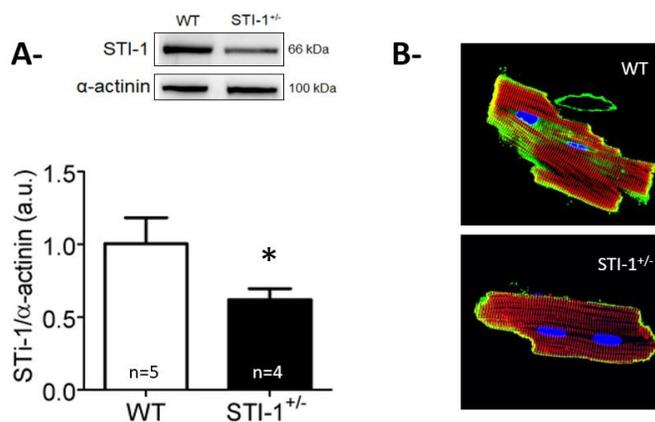


Figura 12- STI-1 está presente no sarcolema e região perinuclear de cardiomiócitos:

A- representativo de Western Blot para cardiomiócitos de animais WT e STI-1^{+/-} e respectivo gráfico com análise semiquantitativa do Western Blot, n= número de animais. P<0.05. As bandas e o gráfico ilustram a redução de quase 40% na expressão da STI-1 em animais STI-1^{+/-}. **B-** Imagens adquiridas através de microscopia confocal, mostrando a expressão da STI-1 no sarcolema e região perinuclear de cardiomiócitos provenientes de animais WT e STI-1^{+/-}. Em verde STI-1, em vermelho alpha-actina, em azul núcleo celular.

Dessa forma os resultados confirmam a redução dos níveis de STI-1 no coração de animais STI-1^{+/-}, de forma semelhante ao de pacientes com insuficiência cardíaca. Compreendendo-se que a STI-1 está inserida em uma maquinaria de chaperonas, as Heat shock proteins, foi avaliado o nível de expressão destas. Como apresentado na Figura 13, a redução nos níveis de expressão da STI-1 não altera a expressão da Hsp90 e da Hsp70.

A-

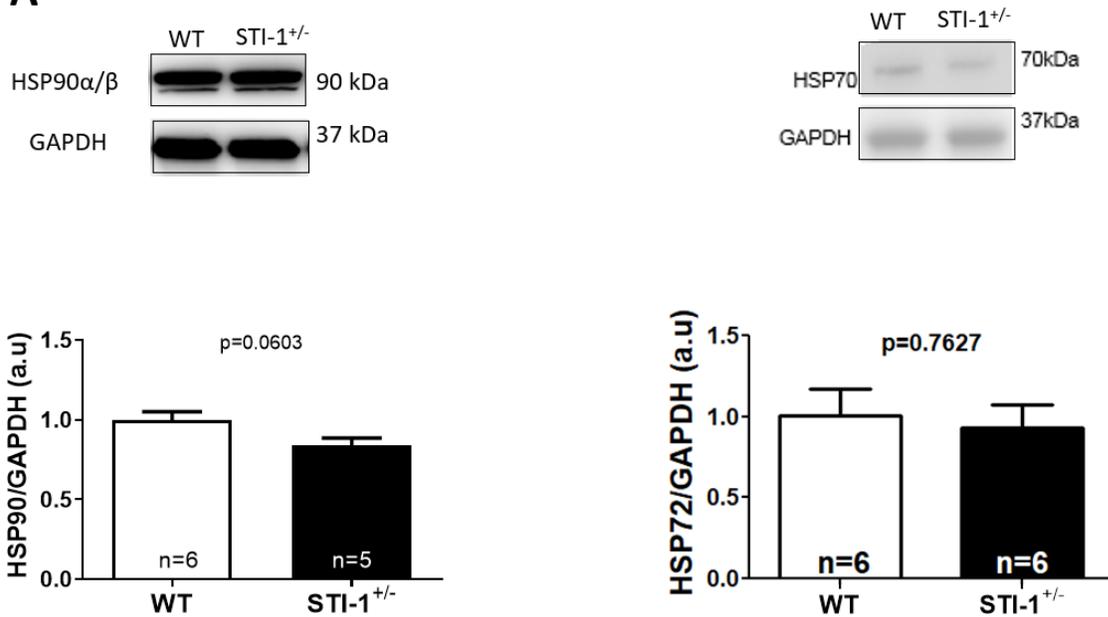


Figura 13- Coração de camundongos STI-1^{+/-}-não apresentam alteração no nível de expressão das HSP: A- Representativo de Western Blot para HSP90 e HSP70 em animais WT e STI-1^{+/-}, com seus respectivos gráficos de análise semiquantitativa. N= Número de animais. As bandas do gel e os gráficos ilustram um mesmo nível de expressão das proteínas Hsp90 e 70 nos grupos controle e STI-1^{+/-}.

Outra forma de se avaliar a funcionalidade da maquinaria Heat shock, é pela avaliação dos níveis de expressão de seus clientes. Esta desempenha um papel importante não só na maturação de proteínas, mas também em modificações pós traducionais, como a fosforilação de proteínas que ativam de cascatas intracelulares. Para tanto foram avaliadas proteínas que já são reconhecidamente clientes da maquinaria nessas categorias.

Nesta etapa foram avaliados os receptores de hormônios esteroidais, como por exemplo o de mineralocorticoide, que são tradicionais clientes de maturação dessa maquinaria. (Young, 2000); (Sahasrabudhe et al., 2017) (Alvira et al., 2014). Como o Western Blot da Figura 14, e sua análise quantitativa mostra, não há alteração nos níveis de expressão da proteína MR.

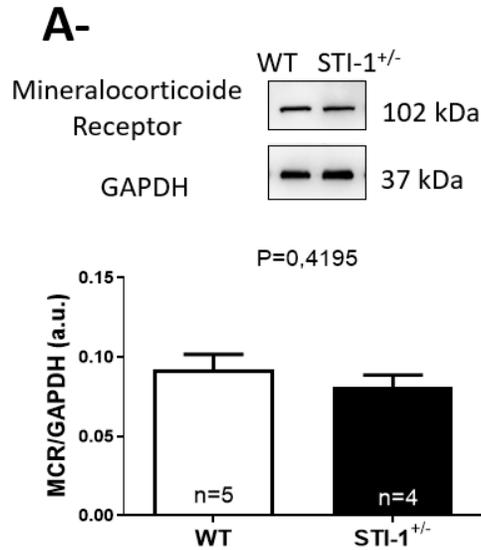


Figura 14- Maturação proteica do receptor de mineralocorticoide nos animais STI-1^{+/-} não está comprometida: A- Representativo de Western Blot para receptores de mineralocorticoides (MR) em animais WT e STI-1^{+/-}, com seu respectivo gráfico de análise semiquantitativa. N= número de animais. A amostra do gel apresenta duas bandas semelhantes e o gráfico ilustra o índice de expressão do MR estatisticamente similar.

Proteínas recém traduzidas são entregues ao Retículo Endoplasmático em sua forma linear, e a partir deste ponto poderão seguir dois caminhos: maturação sendo enoveladas; ou degradação (ERAD/ ER- associated degradation), (Hampton, 2000). Portanto, o ER é uma organela rica em chaperonas e co-chaperonas envolvidas na maturação proteica, como por exemplo a proteína GRP78 (glucose regulated protein), ou Bip (Binding Immunoglobulin protein) (Lee, 2005). No caso de uma sobrecarga com aumento da entrega de proteínas lineares, ou de um comprometimento na maquinaria dessas chaperonas, seria observado uma maior expressão de proteínas como o GRP78. Este é, portanto, reconhecido como um marcador de estresse do retículo endoplasmático (Zheng et al., 2014). Como a Figura 15 mostra, não há aumento da expressão da proteína GRP78 nos animais STI-1^{+/-}, corroborando o resultado anterior de que não há comprometimento na maturação proteica, no estado basal desses animais.

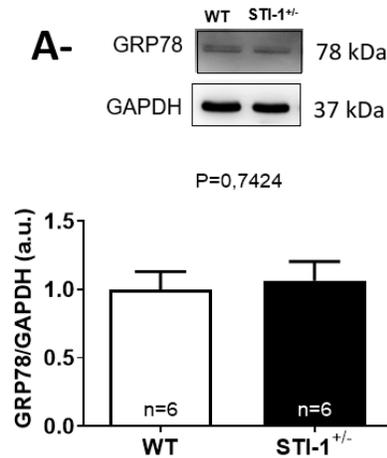


Figura 15- Coração de camundongos STI-1^{+/-} não apresenta alteração no nível de expressão do marcador de estresse reticular- GRP78: A- Representativo de Western Blot para a proteína GRP78 (marcador de estresse reticular) apresenta bandas semelhantes para os animais WT e STI-1^{+/-}. O respectivo gráfico de análise semiquantitativa indica índices estatisticamente semelhantes de expressão para o GRP78. N= número de animais.

Em continuidade à avaliação das proteínas clientes, a AKT, outra proteína já validada como cliente da maquinaria HSP, foi escolhida, para avaliar se as transformações pós-traducionais, como a fosforilação, ou sua expressão total estariam ocorrendo adequadamente (Zhang and Burrows, 2004); (Basso et al., 2002). Como apresentado na Figura 16, há uma redução nos índices de fosforilação da AKT, indicando um possível comprometimento dessa maquinaria no aspecto de ativação de proteínas por meio de transformações pós traducionais.

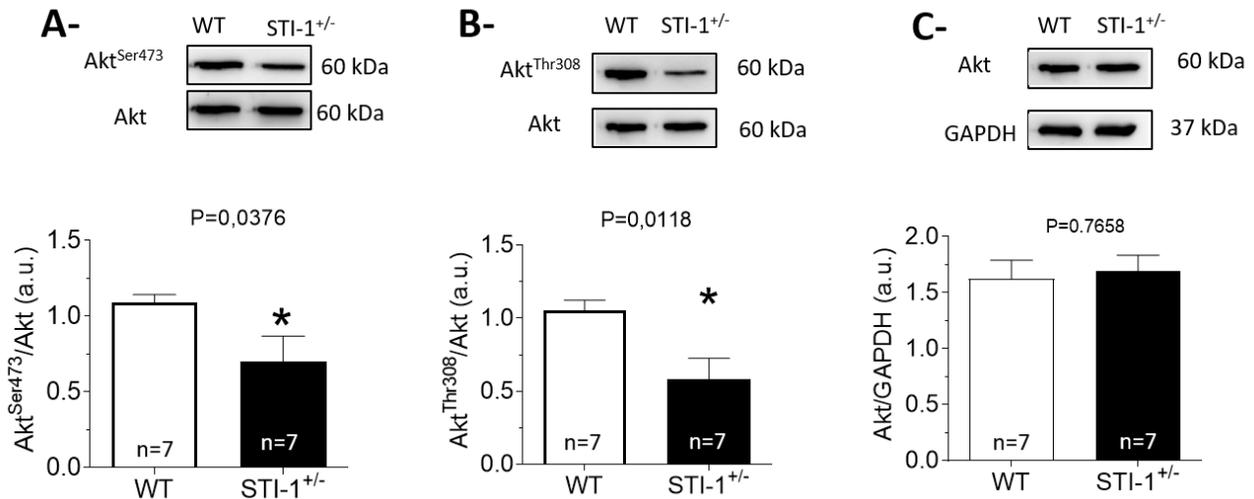


Figura 16- Fosforilação da AKT está reduzida no sítio Ser473 e Thr 308 em amostras cardíacas de camundongos STI-1^{+/-}: **A-** Representativo de Western Blot para a proteína AKT fosforilada no sítio Ser473 de animais WT e STI-1^{+/-} demonstrando redução na fosforilação do sítio Ser473. **B-** Representativo de Western Blot para a proteína AKT fosforilada no sítio Thr308 de animais WT e STI-1^{+/-} também apresenta diminuição nos índices de fosforilação no sítio. **C-** Representativo de Western Blot para a proteína AKT total, com seus respectivos gráficos de análise semi quantitativa. A figura “C” comprova que a proteína AKT está sendo normalmente produzida em animais WT e STI-1^{+/-}, e assim a redução da fosforilação apresentada nos sítios Ser 473 e Thr308 não é por menor quantidade de AKT, mas sim por perda de função da maquinaria. N= número de animais.

4.1.2- Avaliação do desenvolvimento corporal

Tendo, então, sido confirmada a expressão de STI-1 em corações de animais adultos, e seu impacto na maquinaria chaperonina, o segundo passo foi avaliar se o desenvolvimento físico e cardíaco dos animais geneticamente modificados estaria comprometido, diante da redução da expressão da STI-1. Para isso parâmetros como: Peso corporal e tamanho corporal foram avaliados.

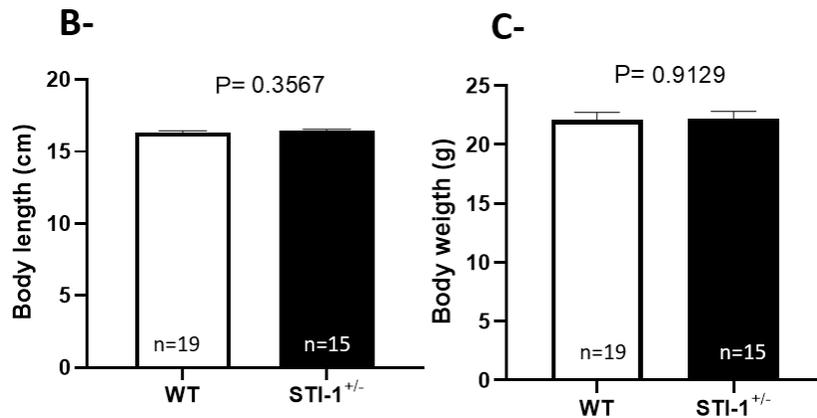


Figura 17- Peso e comprimento corporal semelhante entre animais WT e STI-1^{+/-}: **A-** Imagem demonstrativa e comparativa do tamanho corporal de animais WT e STI-1^{+/-} em diferentes fases do desenvolvimento; animais P0 (dia do nascimento); 1 mês de idade e 3 meses de idade. **B, C-** Gráficos de tamanho e peso corporal dos animais adultos aos animais aos 3 meses de idade. N= número de animais. Nos diferentes estágios representados os animais apresentam tamanho e estrutura corporal semelhante, sem diferenças significativas.

Pode ser observado na Figura 17, que não há diferença entre o tamanho e o peso corporal e assim pode-se concluir que desenvolvimento corporal não se encontra comprometido no genótipo com diminuição da expressão de STI-1.

4.1.3- Avaliação do desenvolvimento cardíaco

Em seguida faz-se primordial elucidar o desenvolvimento do órgão em foco, o coração, do neonato ao animal adulto, e se há algum comprometimento na hipertrofia fisiológica que ocorre em resposta ao desenvolvimento. Para tanto, foi avaliado não só a estrutura física do coração do macro ao micro, mas também sua capacidade funcional.

Começando a análise cardíaca pelo o aspecto macroscópico, foi avaliado o peso do coração, e como se pode ver nos gráficos apresentados na Figura 18, não há diferença significativa.

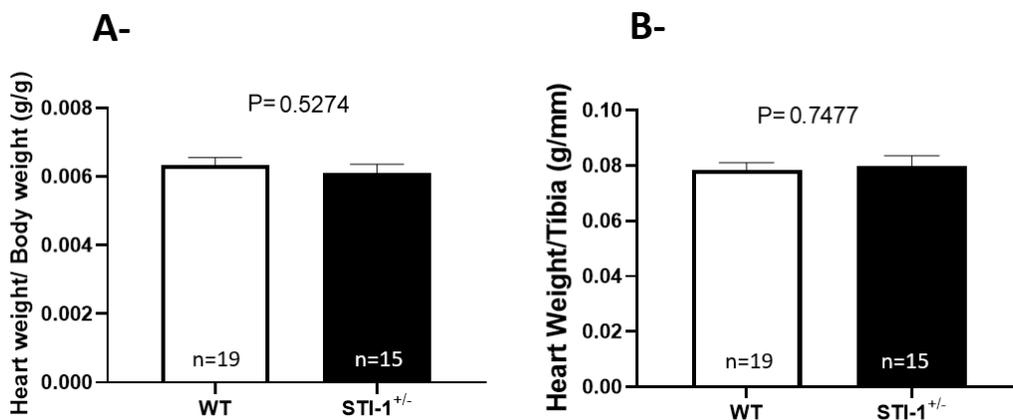


Figura 18- Animais STI-1^{+/-} apresentam razão de peso cardíaco similar a animais WT, independente do normalizador: A- Gráfico do peso do coração normalizado pelo peso corporal. **B-** Gráfico do peso do coração normalizado pela tibia. N= número de animais. Em ambos os gráficos o peso do coração normalizado não apresenta diferenças estatística entre os grupos estudados.

4.1.4- Avaliação do desenvolvimento cardíaco à nível morfológico

Partindo para a análise da estrutura tecidual, a porcentagem de cardiomiócitos averiguada, em cortes histológicos de tecido cardíaco, nos animais geneticamente modificados foi similar à dos animais controle, como mostrado na Figura 19.

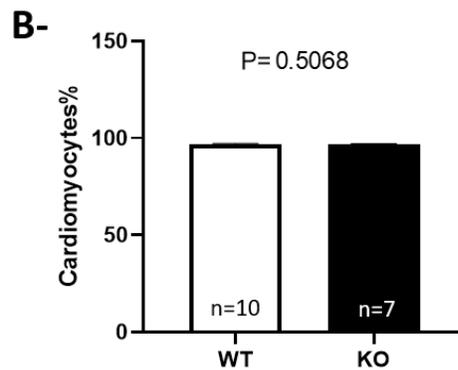
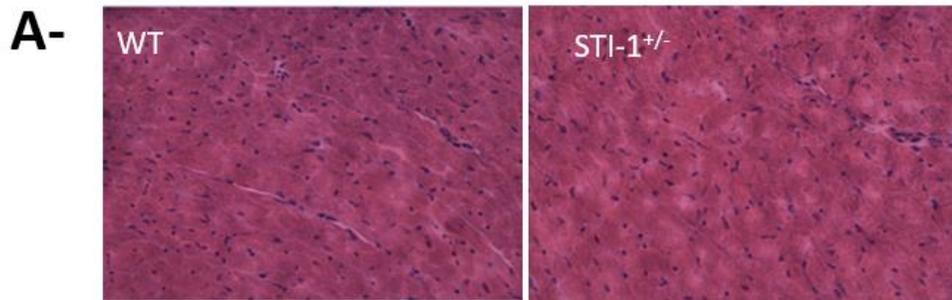


Figura 19- O percentual de cardiomiócitos é semelhante entre corações provenientes de camundongos selvagens e STI-1^{+/-}: **A-** Imagem representativa da constituição histológica do tecido cardíaco em cada linhagem animal. **B-** Gráfico com o percentual de cardiomiócitos nas amostras de tecido cardíaco se apresenta similar entre animais controle e Knockouts. N= número de animais.

Para análise à nível celular foi realizado o isolamento de cardiomiócitos, e após adequada mensuração, averiguou-se que estes apresentavam mesma área celular, como demonstrado na Figura 20.

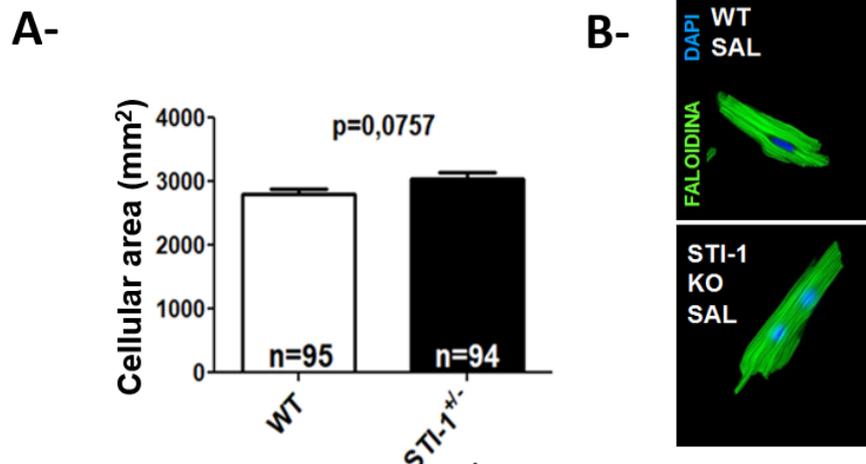


Figura 20- Análise de cardiomiócitos isolados de animais STI-1^{+/-} indica área celular equivalente ao de animais WT: **A-** Gráfico da área celular de cardiomiócitos em animais WT e STI-1^{+/-} sem diferença significativa. **B-** Imagem de microscopia confocal de cardiomiócitos isolados usados para a quantificação da área celular. Os cardiomiócitos apresentam formato e dimensões similares. Em verde- actina, em azul- núcleo celular. N= número de cardiomiócitos.

4.1.5- Avaliação do desenvolvimento cardíaco à nível funcional

Para análise funcional do órgão, foi realizado o exame de ecocardiograma nos animais com 1 e 3 meses de idade. Nos gráficos abaixo, todos os dados foram calculados no modo M, exceto, SV, CO, LVAW. Estes se aproximam mais aos valores apresentados na literatura para camundongos adultos sedados por isoflurano 1,5-2%. (Gao and Vatner, 2011), (Vinhas et al., 2013), (Hendrix Sloane, Misuraca, & Moore, 2013), (Picard et al., 2014).

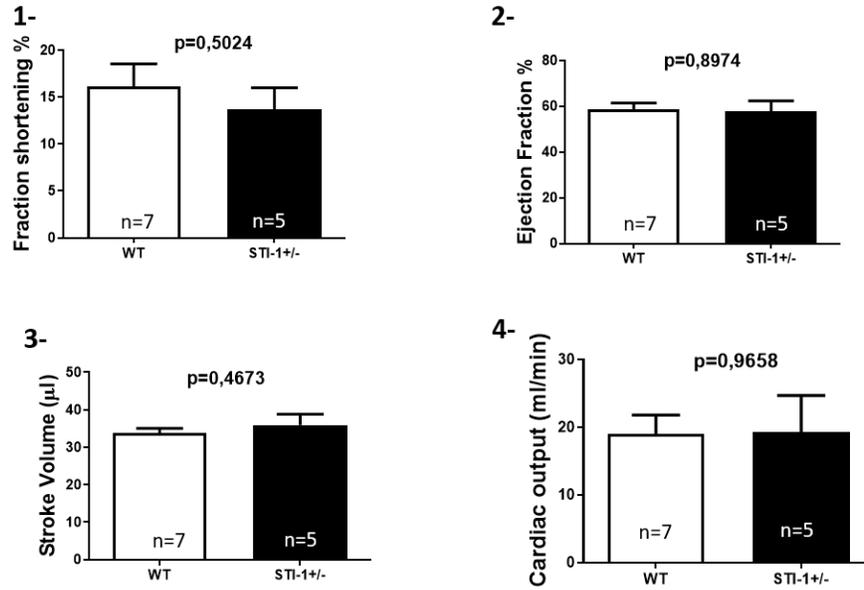
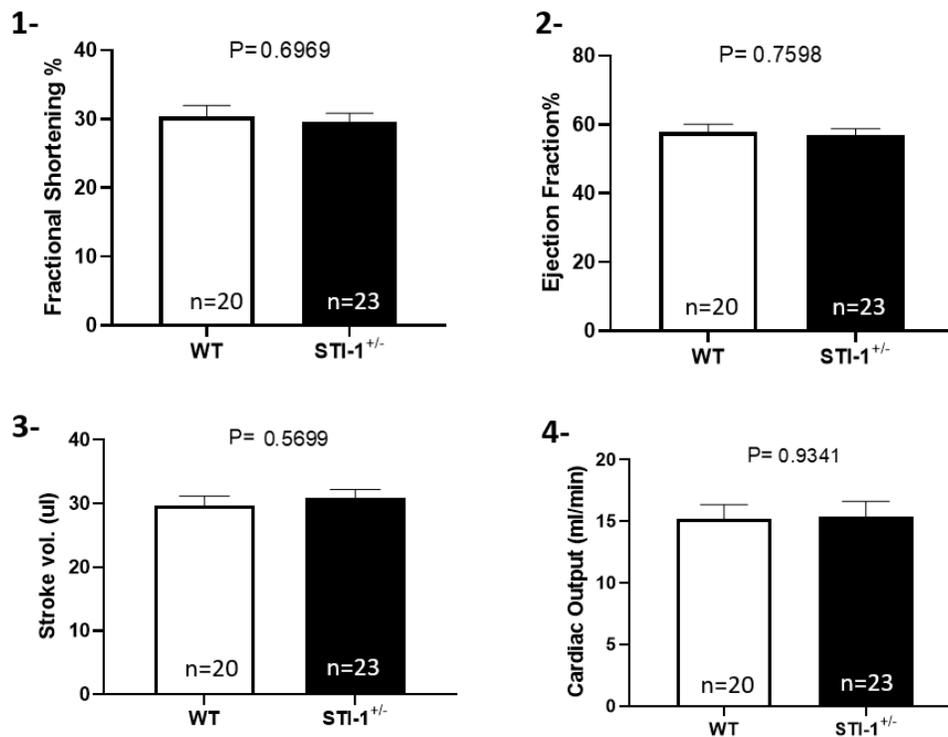


Figura 21- Parâmetros da função sistólica encontram-se normais em animais STI-1^{+/-} com 1 mês de idade: A- Gráficos da função cardíaca em animais: 1- Fração de encurtamento; 2- Fração de ejeção; 3- Volume sistólico de ejeção; 4- Débito cardíaco, todos apresentado resultados similares entre os grupos estudados. N= número de animais.



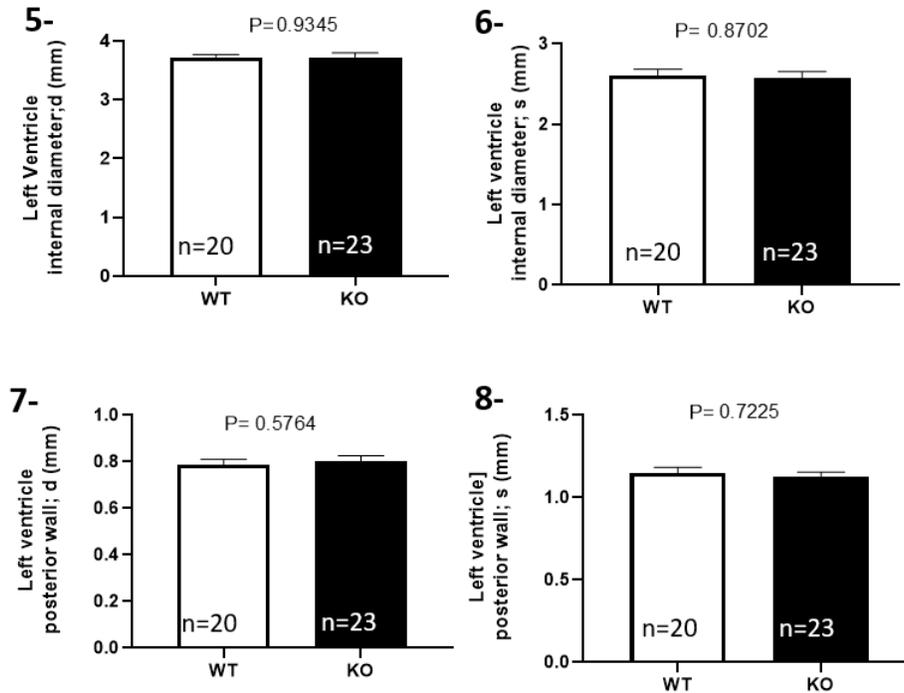


Figura 22- Coração de animais STI-1^{+/-} adultos apresentam função sistólica e estrutura cardíaca similares aos animais WT: A- Gráficos da função e estrutura cardíaca em animais com 8-12 semanas de idade. 1- Fração de encurtamento. 2- Fração e ejeção; 3- volume sistólico de ejeção; 4- Débito cardíaco; 5- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole; 6- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole; 7- Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; 8- Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole. Todos os gráficos apresentam resultados similares entre os grupos estudados. N= número de animais.

Como as Figuras 21 e 22 indicam, os animais STI-1^{+/-} não apresentaram alterações na função cardíaca com um mês de vida até à fase adulta.

O uso da linhagem Δ TPR teve o objetivo de corroborar os resultados apresentados pela redução da expressão de STI-1 por Knockouteamento.

Nos animais Δ TPR heterozigotos temos apenas um alelo responsável pela produção de STI-1, o que leva à redução do seu nível de expressão como pode ser avaliado pelo Western Blot (Figura 23) e pela imunofluorescência de tecido para STI-1 (na Figura 24). Além disso, uma terceira banda correspondente à proteína STI1 com o sítio TPR1 deletado, pode ser visualizada na membrana do Western Blot da Figura 23. Esta banda

proteica, por não apresentar a estrutura completa da STI-1, com menos um sítio TPR, tem um peso molecular menor (53 kDa). Se tratando de um gene hipomórfico a tradução da STI-1-TPR1 transcrita pode ser comprometida e dessa forma o nível de expressão da proteína STI-1-TPR1 é bem inferior à da STI1 normal. Portanto, para sua exposição na membrana, as bandas da proteína STI-1 foram cobertas e a membrana foi então overexposed.

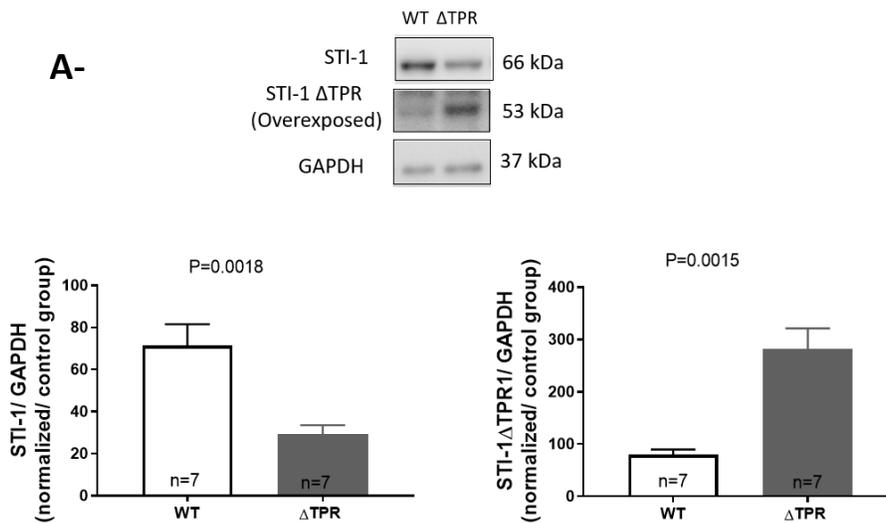


Figura 23- Redução dos níveis de expressão da proteína STI-1 em animais Δ TPR, e presença da proteína STI-1 com sítio Δ TPR deletado na faixa dos 53 kDa: A- representativo de Western Blot de tecido cardíaco de animais WT e Δ TPR apresentando banda mais fraca no gel para a proteína STI-1 nos animais Δ TPR. Abaixo, tem-se superexposição da membrana com o aparecimento da proteína STI-1- Δ TPR1. Como os gráficos de análise semiquantitativa indicam há uma menor expressão de STI-1 nos animais Δ TPR e uma maior expressão da proteína STI-1- Δ TPR1 nos animais geneticamente editados. N= número de animais.

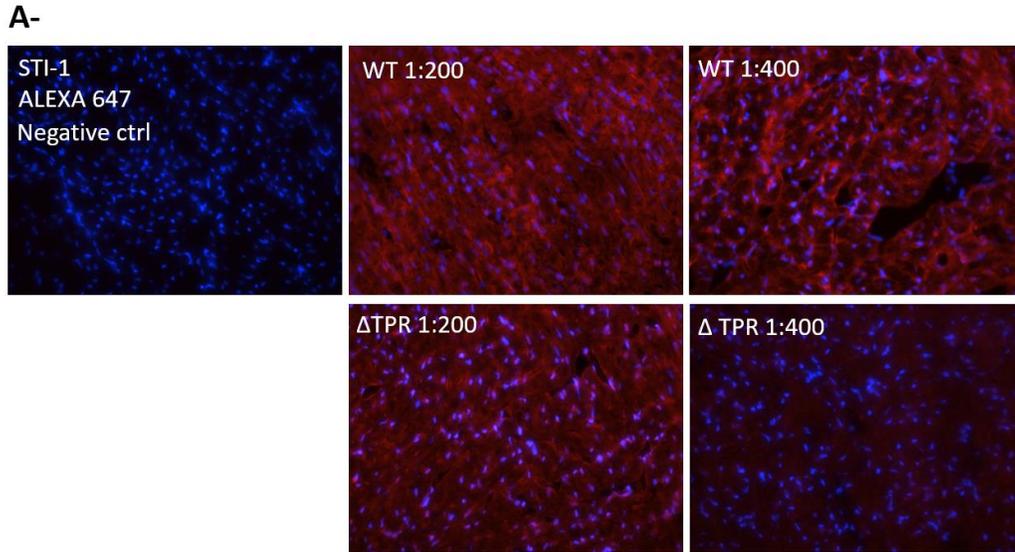


Figura 24- Diminuição da fluorescência representativa para STI-1 no tecido cardíaco de animais Δ TPR: A- Imagem representativa de imunofluorescência de tecido cardíaco de animais WT e Δ TPR para STI-1 em resposta a diferentes concentrações de anticorpo anti- STI-1. Na microscopia visualiza-se a STI-1 em vermelho, podendo ser observado uma coloração menos intensa no animais Δ TPR em ambas as concentrações (1:200 e 1:400).

Assim como nos animais STI-1^{+/-}, a Figura 25 nos mostra que, não há alteração na maquinaria de chaperonas nos animais Δ TPR. Não foi observada nenhuma diferença na expressão das HSP e de seu cliente de maturação- receptores de glicocorticoides (Young, 2000); (Sahasrabudhe et al., 2017) (Alvira et al., 2014).

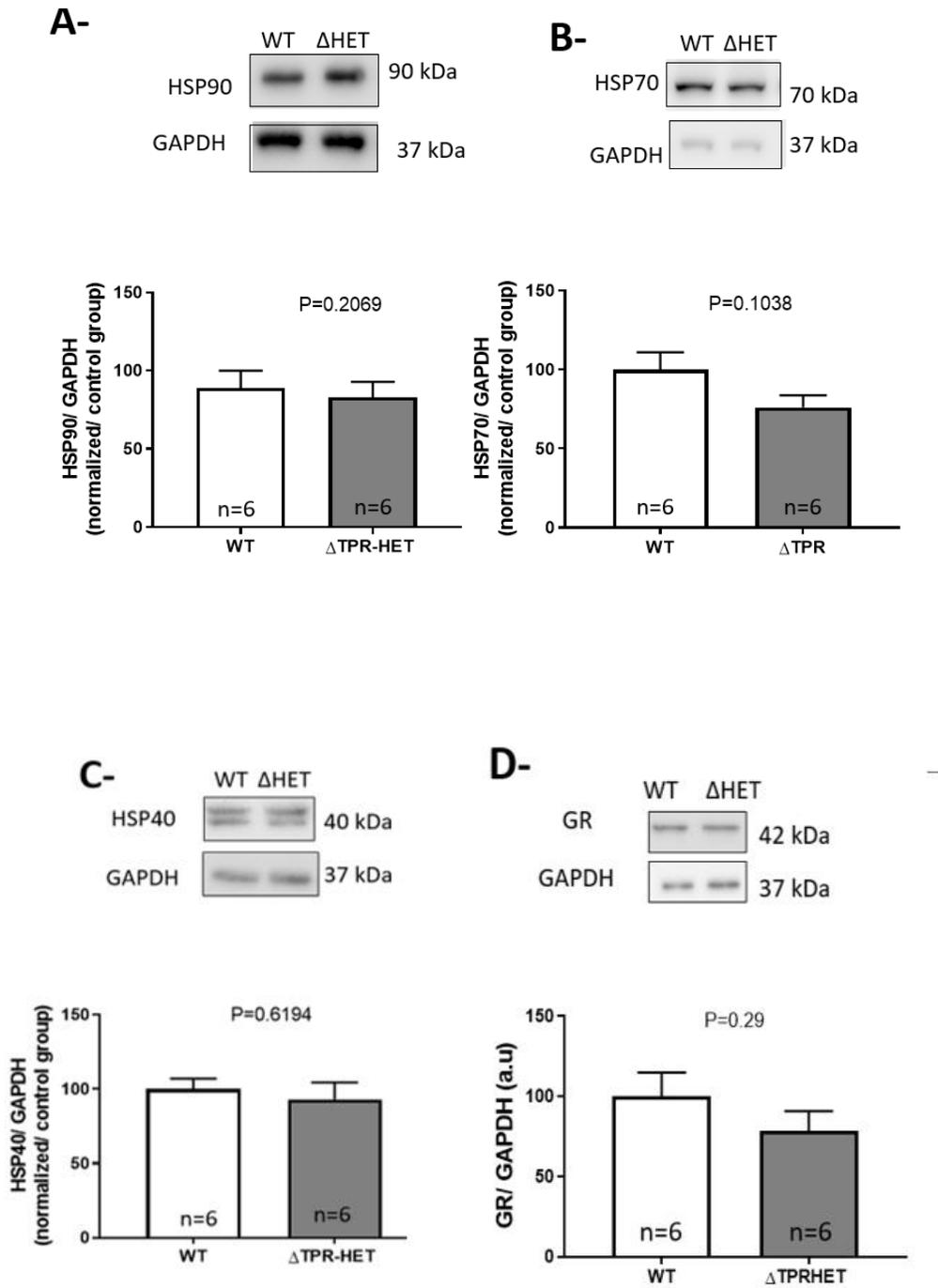
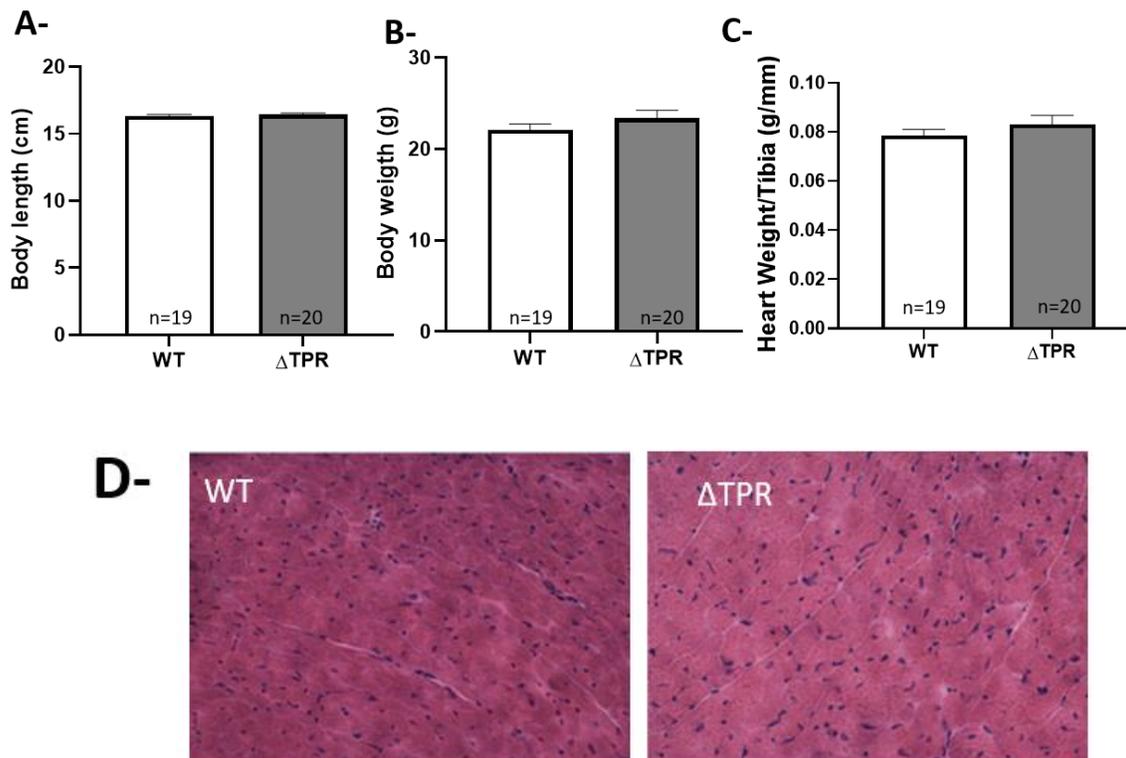


Figura 25- Membros da maquinaria chaperonina não apresentam alteração nos animais Δ TPR: **A, B, C, D-** representativo de Western Blot para a proteína HSP90; HSP70; HSP40 e Receptor de glicocorticoide com seus respectivos gráficos de análise semiquantitativa, demonstram bandas semelhantes e resultados similares para os grupos avaliados. N= número de animais.

A seguir, nas Figuras 26 e 27, foram repetidos nos animais Δ TPR adultos, os experimentos de análise de desenvolvimento corporal (peso e comprimento) e desenvolvimento cardíaco (peso do coração/ tíbia; morfometria e função cardíaca). Como pode ser observado no conjunto de resultados da Figura abaixo, a linhagem Δ TPR de fato valida os resultados obtidos na linhagem KO, de forma que não se observa nenhuma diferença significativa entre animais Δ TPR e WT nos experimentos.



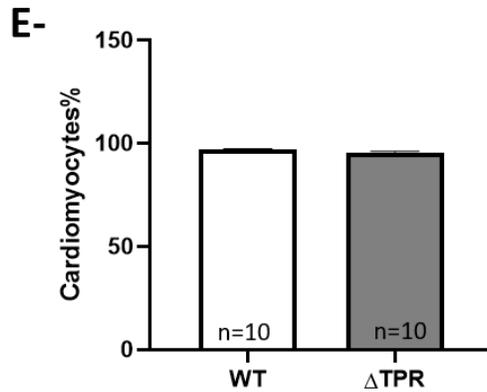
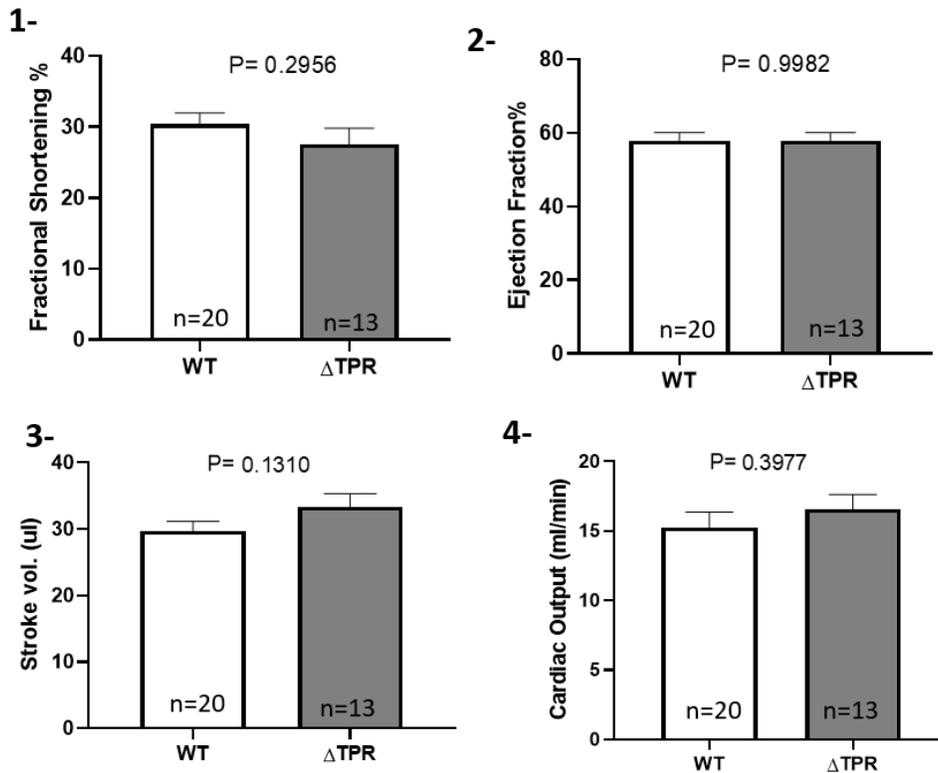


Figura 26- Animais Δ TPR apresentam desenvolvimento corporal normal, peso e morfometria cardíaca semelhante aos animais WT: A- Gráfico de comprimento corporal; B- Gráfico de peso corporal, C- Gráfico de peso cardíaco, sendo que em nenhum destes é observado alguma diferença entre os grupos. D- Representativo da histologia cardíaca em animais WT e Δ TPR e E- Gráfico com o percentual de cardiomiócitos nas amostras de tecido cardíaco, indicando estrutura microscópica semelhante entre os grupos. N= número de animais.



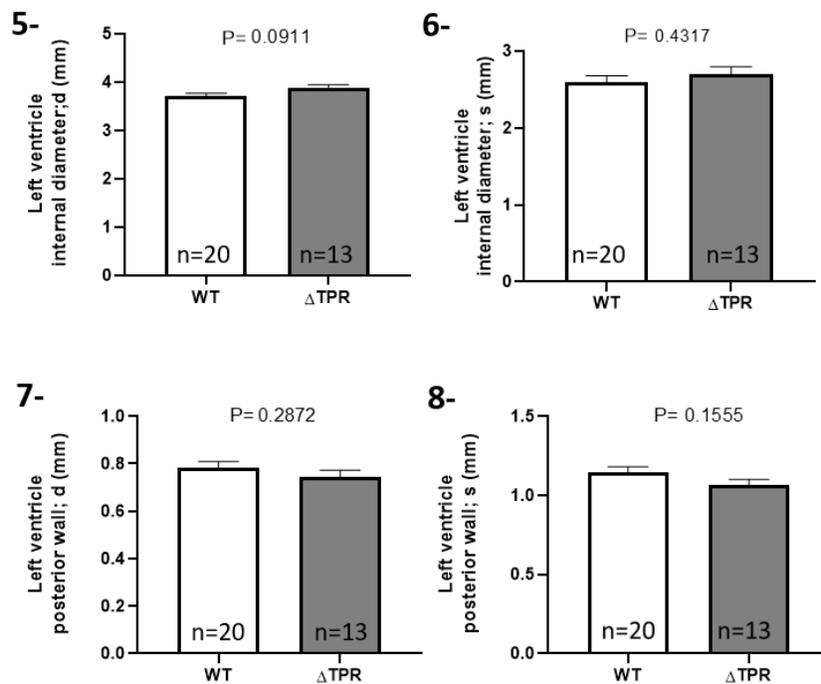


Figura 27- Ecocardiograma demonstra função sistólica e estrutura de paredes e câmaras de animais Δ TPR adultos sem alterações: A- Gráficos da função e estrutura cardíaca em animais com 8-12 semanas de idade. 1- Fração de encurtamento; 2- Fração e ejeção; 3- Volume sistólico de ejeção; 4- Débito cardíaco; 5- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole; 6- Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole; 7- Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; 8- Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole. Todos os parâmetros apresentam-se semelhantes entre os grupos de estudo, sem indicar alterações morfológicas e funcionais nos corações de animais Δ TPR. N= número de animais.

Compilando todos os dados adquiridos na avaliação do desenvolvimento corporal e cardíaco de animais STI-1^{+/-}, podemos concluir que, não obstante à redução na expressão da co-chaperona STI-1, e algumas diferenças na fosforilação da AKT, os corações dos camundongos STI-1^{+/-} se desenvolveram normalmente e de forma similar aos seus controles. Sob perspectiva estrutural, morfológica, funcional e molecular (maquinaria chaperonina operacional), o coração apresentou a hipertrofia fisiológica cardíaca adequada em todos os aspectos analisados. Pontos chave avaliados no animal Δ TPR basal, validam os resultados obtidos com os animais Knockouts e confirmam a ocorrência de uma hipertrofia fisiológica normal, mesmo diante da perda parcial de STI-1.

Assim, o próximo passo foi investigar o impacto da redução na expressão da STI-1 para o coração, em resposta ao estresse cardíaco causado pela administração do isoproterenol.

4.2- Avaliação do impacto da redução da STI-1 em um modelo de estresse cardíaco causado pela injeção de isoproterenol

4.2.1 Avaliação da maquinaria chaperonina STI-1 pós tratamento

Como modelo de indução de hipertrofia cardíaca, foi escolhido o tratamento crônico com o Isoproterenol (IP, 7 dias, 20mg/ Kg/dia); protocolo já muito bem estabelecido com estímulo hipertrófico restrito ao músculo cardíaco já validado. Por se tratar de um agonista de receptores adrenérgicos, o primeiro passo foi verificar se os animais STI-1^{+/-} apresentam alterações na expressão do receptor beta-1 adrenérgico o principal receptor adrenérgico cardíaco. Para tanto, foi avaliado os níveis de expressão dos receptores β 1, no tecido cardíaco, que como apresentado na Figura 28 abaixo, encontra-se semelhante ao dos animais WT, indicando que os camundongos geneticamente modificados também estariam aptos a responder ao estímulo estressor.

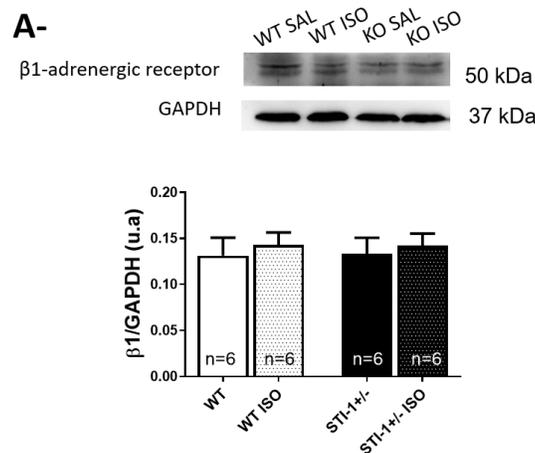


Figura 28- Amostras cardíacas de camundongos STI-1^{+/-} não apresentam alteração na expressão do receptor β 1: A- Representativo de Western Blot para os receptores β 1 nos animais WT e STI-1^{+/-}, tratados com salina ou isoproterenol; com seu respectivo gráfico de análise semiquantitativa. Sem diferença significativa os animais STI-1^{+/-} são considerados responsivos ao estímulo estressor. N= número de animais.

Como segundo passo, avaliou-se o comportamento da co-chaperona STI-1 pós tratamento dos camundongos com isoproterenol. A Figura 29 a seguir, mostra o aumento da expressão da STI-1 em camundongos WT pós tratamento.

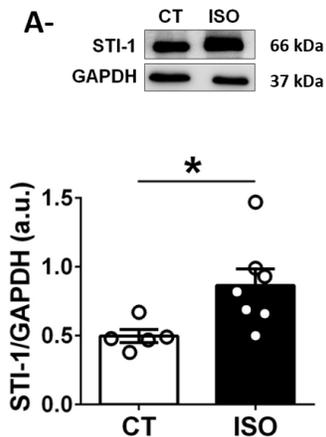


Figura 29- Recrutamento da maquinaria STI-1 com aumento da sua expressão em animais WT, pós tratamento: A- Representativo de Western Blot para a proteína STI-1 nos animais WT salina e WT isoproterenol; com seu respectivo gráfico de análise semiquantitativa. A banda mais intensa nos animais tratados com a droga indicam o aumento da expressão de STI-1 pós isoproterenol, confirmado pela análise estatística. N= número de animais. $P < 0,05$.

Para avaliar se em outros modelos de estresse cardíaco também haveria alteração dos níveis de STI-1, utilizou-se amostras de coração de camundongos selvagens submetidos à cirurgia da TAC (Constricção da aorta transversa). Este, é mais um modelo bem padronizado de indução de estresse cardíaco, e como controle foram usados animais WT SHAM. A Figura 30 apresenta resultado um semelhante ao anterior, com o aumento da expressão da STI-1 sendo observado no grupo submetido ao estresse cardíaco.

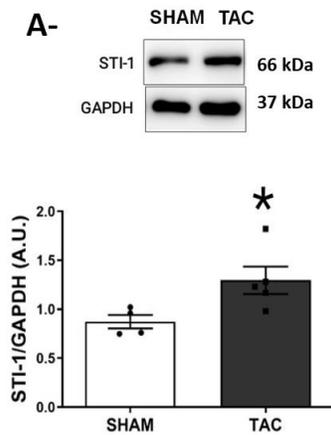


Figura 30- Animais WT submetidos à TAC apresentam aumento da expressão de STI-1: A- Representativo de Western Blot para a proteína STI-1 nos animais WT SHAM e WT TAC, com seu respectivo gráfico de análise semiquantitativa. N= número de animais. . * $p < 0.05$.

Como observado, tanto o tratamento com o isoproterenol, como a TAC, recrutam a maquinaria da STI-1; o que poderia ser conjecturado considerando que se trata de uma proteína induzida pelo estresse.

De forma distinta aos resultados superiores, nos animais STI-1^{+/-}, não há esse aumento significativo nos níveis de expressão da STI-1 frente ao tratamento com o isoproterenol, como apresentado na Figura 31. Assim, tem-se o indicativo de que esses animais não são capazes de compensar uma maior demanda da maquinaria diante de uma condição de hipertrofia patológica.

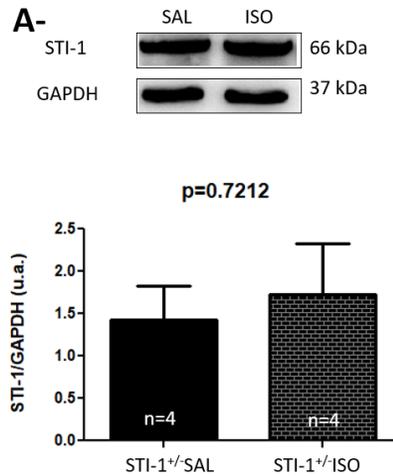


Figura 31- Expressão da STI-1, em animais STI-1^{+/+}, pós tratamento, com isoproterenol não se altera: A- Representativo de Western Blot para a proteína STI-1 nos animais STI-1^{+/+}, salina e isoproterenol respectivamente, apresentando bandas similares, com o gráfico de análise semiquantitativa sem diferença significativa. N= número de animais.

Considerando, mais uma vez, a conexão intrínseca que há entre a co-chaperona STI-1 e as Heat shock proteins, avaliou-se os níveis de expressão dessa maquinaria após o estímulo com isoproterenol. Esses não se encontravam alterados, como apresentado na Figura 32 abaixo.

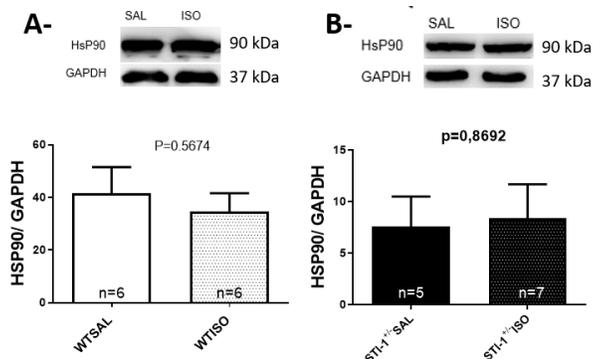


Figura 32- Expressão do complexo Heat shock protein não se altera pós tratamento nos grupos experimentais: A-B- Representativo de Western Blot para a chaperona HSP90 nos animais WT, STI-1^{+/+}, salina e isoproterenol, com bandas similares no gel e gráficos de análise semiquantitativa sem diferença significativa. N= número de animais.

Para os próximos experimentos, voltou-se a considerar o importante papel desempenhado por essa maquinaria, na maturação proteica; e o fato de que a síntese de proteínas é profusamente exigida durante um quadro de hipertrofia.

Entendendo então, que o recrutamento da maquinaria STI-1 se encontra comprometido, criou-se a hipótese de que etapas do processo hipertrófico celular poderiam também estar prejudicados nos animais STI-1^{+/-}ISO. Assim, decidiu-se avaliar se a maturação proteica desempenhada por essa maquinaria estaria impactada, prejudicando o enovelamento proteico e a disponibilidade de proteínas para a hipertrofia celular.

De forma complementar, sem uma adequada maturação proteica, um aumento de número de missfolding proteins no interior do reticulo seria observado (Hampton, 2000), e essas pela UPR (unfolden protein response) (Hampton, 2000) levariam a organela à um estado de estresse reticular iniciando cascatas de morte celular (Sano and Reed, 2013) (Schröder, 2008).

Consequentemente, seria observado, também, uma maior ativação do sistema proteassomal, como uma tentativa de evitar este acúmulo pela via de degradação proteica. Neste caso as vias de ubiquitinação seriam ativadas, levando à um maior nível de proteínas ubiquitinadas (Hampton, 2000).

A fim de confirmar essas hipóteses, os níveis de marcadores de estresse de reticulo foram avaliados por qPCR. Como apresentado na Figura 32, não há o aumento desses marcadores nos animais STI1^{+/-} tratados com isoproterenol, e nem o aumento de proteínas marcadas com ubiquitina como apresentado na Figura 33.

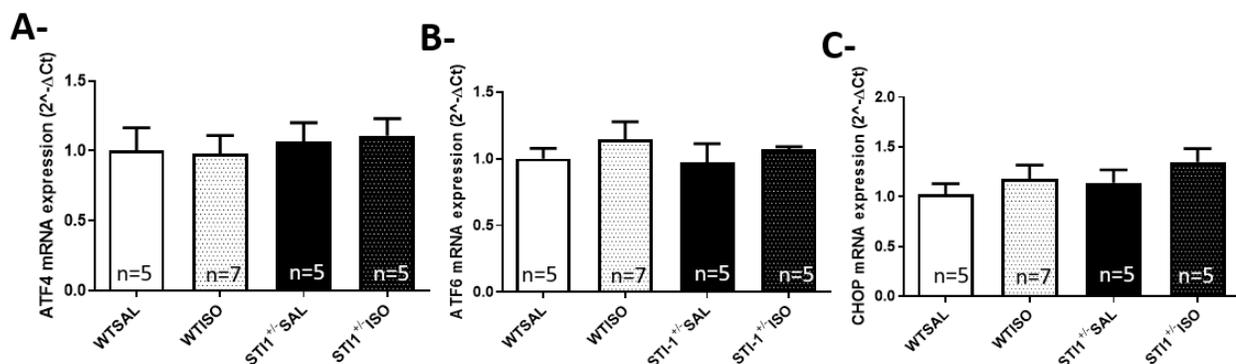


Figura 33- Ausência de índice de estresse reticular em animais STI-1^{+/+}-ISO, uma vez que a expressão de marcadores de ER stress se encontra semelhante entre os grupos experimentais: A-B-C- Gráficos de análise quantitativa dos níveis de RNA para os marcadores de estresse de retículo: ATF4, ATF6, CHOP, respectivamente; para os animais WT e KO tratados ou não com isoproterenol. Os resultados não apresentam indícios de estresse sem diferenças estatísticas nos marcadores entre os grupos estudados. N= número de animais.

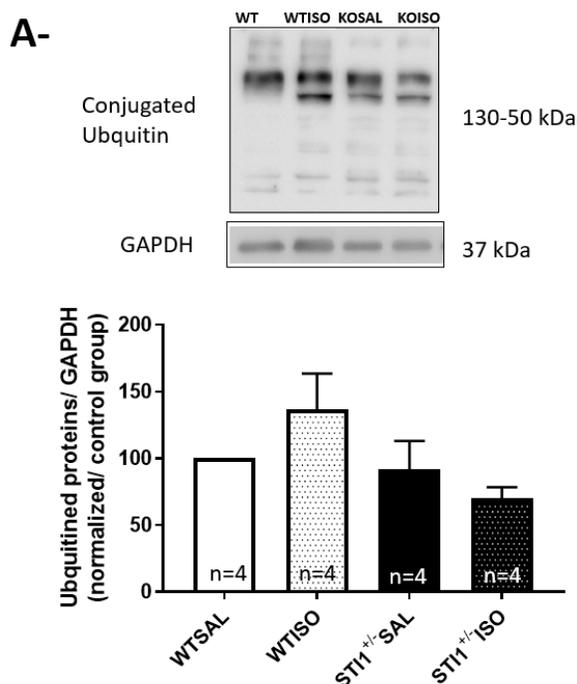


Figura 34 - Nível de ubiquitinação proteica não apresenta diferença significativa entre todos os grupos experimentais: A- Representativo de Western Blot para proteínas ubiquitinizadas (130 a 50kDa) animais WT, STI-1^{+/+}; salina e isoproterenol; com seu respectivo gráfico de análise semiquantitativa. O experimento observou proteínas totais de um gel, entre o peso molecular estabelecido, que foram marcadas com ubiquitinas no geral. N= número de animais.

O que se pode concluir com a associação dos resultados das Figuras 32 e 33 é que assim como não há evidências de estresse reticular nos animais STI-1^{+/-}, também não se observa aumento dos níveis de ubiquitinação, respectivamente; indicando que, não se tem ocorrência de estresse reticular e nem aumento da ativação das vias de degradação proteica. Assim, entende-se que as etapas de maturação proteica não estão comprometidas nos animais STI-1^{+/-}ISO.

No entanto, o ANP ou peptídeo natriurético atrial, que é não só um hormônio com função anti hipertrófica local (Song et al., 2015), mas também um hormônio marcador para a ocorrência de estresse cardíaco, apresenta-se aumentado nos animais STI-1^{+/-}ISO, indicando a ocorrência de estresse cardíaco, como pode ser verificado no gráfico da Figura 34.

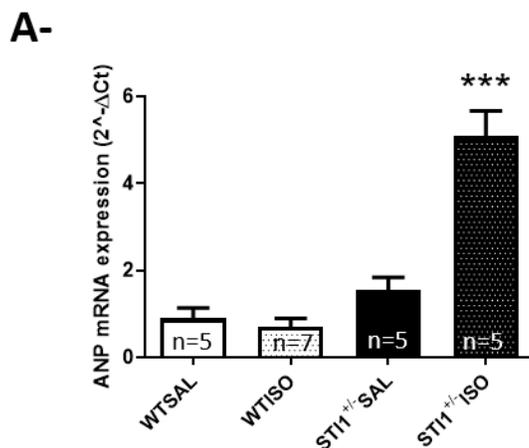


Figura 35- Aumento significativo da expressão de ANP em animais STI-1^{+/-}ISO, indicando estresse cardíaco: A- Gráficos de análise quantitativa dos níveis de RNA para o peptídeo natriurético atrial, para os animais WT e STI-1^{+/-}, salina e tratados. Animais STI-1^{+/-}ISO apresentam relevante aumento na expressão de ANP, apontando maior indício de estresse nesses. N= número de animais.

4.2.2- Avaliação da resposta cardíaca ao estímulo estressor

Partiu-se para uma análise mais macro dos resultados, buscando observar a resposta do tecido cardíaco ao estímulo hipertrófico.

Como os animais WT e STI-1^{+/-} não apresentaram variação no peso corporal entre o início e o final do tratamento com isoproterenol (Figura 35-A), mas os grupos tratados com a droga apresentaram aumento de peso cardíaco, ocorreu o aumento na razão peso do coração/ peso corporal (Figura 35-B). Esse resultado indica que, assim como o esperado, o isoproterenol foi eficiente para causar o aumento de ganho de peso cardíaco em ambos os genótipos.

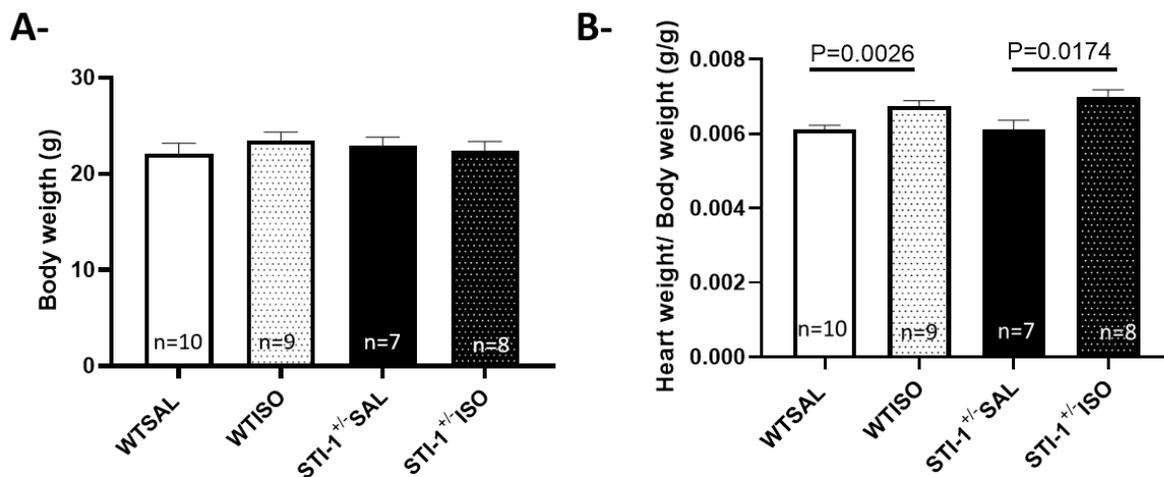


Figura 36- Aumento da razão do peso cardíaco pelo peso corporal em camundongos tratados com isoproterenol: **A-** Gráfico de comparação entre peso corporal nos grupos WT, STI-1^{+/-}; salina e isoproterenol sem diferenças apresentadas. **B-** Gráfico de comparação entre peso cardíaco normalizado pelo peso corporal nos grupos WT, STI-1^{+/-}; salina e isoproterenol, mostrando que os grupos tratados com a droga aumentaram a razão estudada, como esperado. N= número de animais.

Considerando que os resultados da avaliação do desenvolvimento cardíaco mostram a ocorrência de uma hipertrofia cardíaca fisiológica normal, e que os dados pós tratamento indicam hipertrofia cardíaca tanto no WT quanto no animal STI-1^{+/-}; o intuitivo a se esperar, seria uma resposta hipertrófica patológica causada pelo isoproterenol, à nível celular, nas duas linhagens. Neste sentido partiu-se para a investigação da área celular em ambos os grupos após tratamento.

4.2.3- Avaliação da resposta cardíaca à nível morfológico

Para a ocorrência da hipertrofia cardíaca concêntrica, como explicado na introdução, deve ocorrer a hipertrofia dos cardiomiócitos. Isso se traduz em um aumento de área celular, que no caso da hipertrofia patológica concêntrica se justifica principalmente pelo acréscimo de sarcômeros em paralelo, aumentando o diâmetro da célula.

No entanto, uma vez que os cardiomiócitos de camundongos WT e STI-1^{+/-}-ISO, sal e iso, foram isolados e sua área celular mensurada, nota-se que apenas os cardiomiócitos dos animais WTISO apresentaram o aumento na área celular, como mostradodo na Figura 36, abaixo.

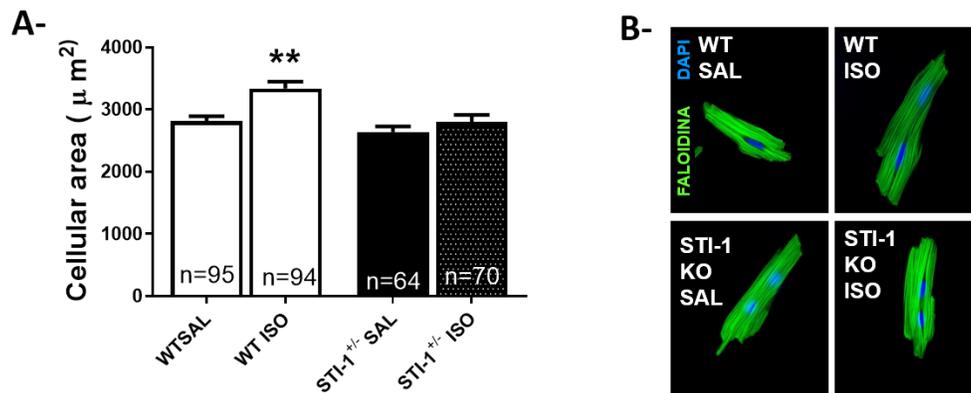


Figura 37- Cardiomiócitos provenientes de camundongos STI-1^{+/-} não apresentam aumento da área celular em resposta ao tratamento com o isoproterenol: A- Gráfico de comparação da área celular nos grupos WT, STI-1^{+/-}; salina e isoproterenol, indicando aumento de área significativo apenas nos animais WTISO. **B-** Imunofluorescência representativa dos cardiomiócitos de animais WT e STI-1^{+/-} com e sem a influência do isoproterenol. Em verde (faloidina)- actina; em azul (DAPI) núcleo celular. Nas imagens observa-se o aumento destoante do cardiomiócito de animais WTISO. N= número de cardiomiócitos.

De modo a complementar essa análise celular, confirma-se este resultado quando se observa na Figura 37, que os animais WTISO apresentam ganho na medida não só do comprimento celular, mas de forma mais relevante no diâmetro, condizente com o quadro de hipertrofia concêntrica.

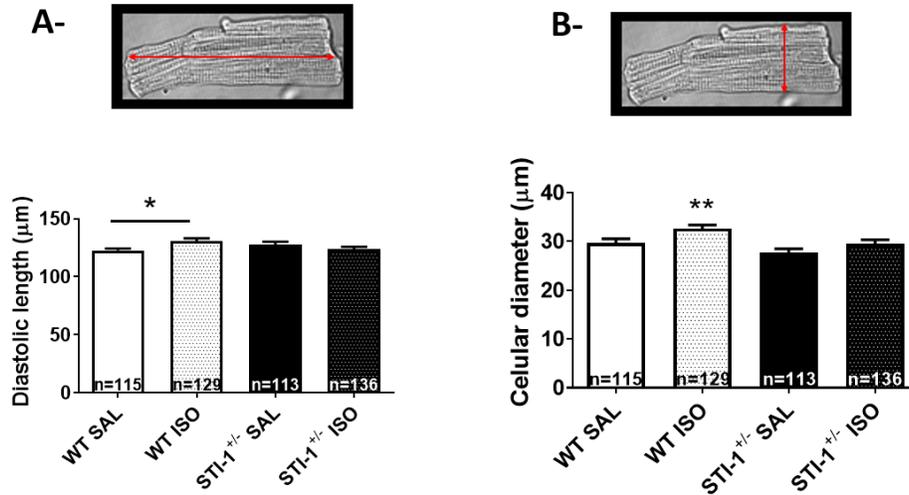
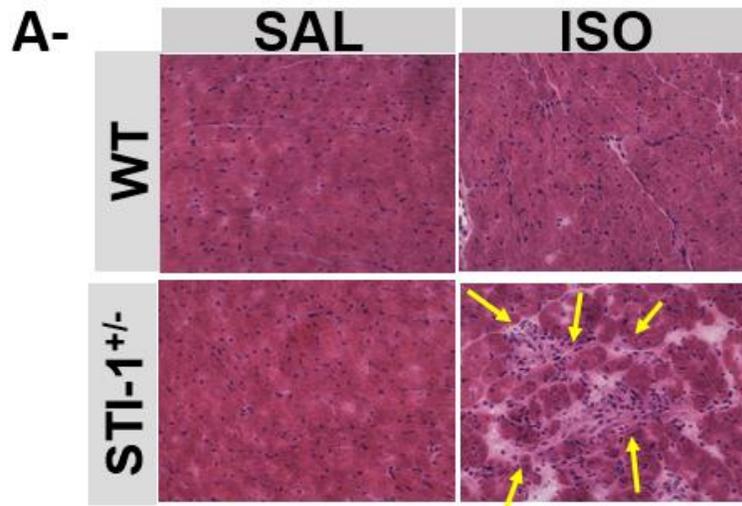


Figura 38- Aumento do comprimento e diâmetro de cardiomiócitos WT, pós tratamento com isoproterenol é compatível com um quadro de hipertrofia cardíaca concêntrica: **A-** Gráfico da medida do comprimento celular nos grupos WT, STI-1^{+/-}, salina e isoproterenol e **B-** Gráfico da medida do diâmetro celular nos grupos WT, STI-1^{+/-}, salina e isoproterenol, ambos mostrando aumento significativo de medidas apenas no grupo WTISO. N= número de cardiomiócitos. *p<0.05

Neste ponto, o projeto encontra-se diante de uma incongruência entre os resultados de ganho de peso cardíaco, e ausência de hipertrofia celular nos animais STI-1^{+/-}ISO. Contudo, na análise de morfometria do tecido cardíaco pode-se observar a explicação para o aumento do peso cardíaco nesses animais.



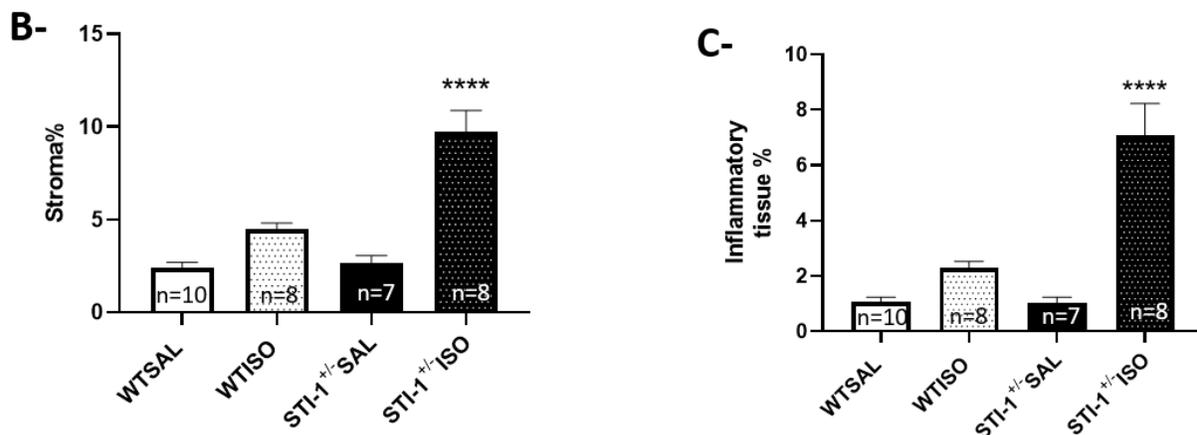


Figura 39- Aumento da porcentagem de estroma e células inflamatórias no tecido cardíaco de animais STI-1^{+/+} após tratamento com isoproterenol: A- Imagem histológica representativa da constituição tecidual dos grupos WT e STI-1^{+/+} antes e após tratamento com ISO. Na seta amarela nota-se a presença do aglomerado de células inflamatórias no estroma, em destaque nos animais STI-1^{+/+}ISO. **B-** Gráfico com percentual de estroma no tecido cardíaco dos grupos WT, STI-1^{+/+}, salina e isoproterenol, significativamente aumentado no grupo STI-1^{+/+}ISO. **C-** Gráfico com percentual de presença de células inflamatórias no tecido cardíaco dos grupos WT, STI-1^{+/+}, salina e isoproterenol, também, significativamente aumentado no grupo STI-1^{+/+}ISO. N= número de animais. *p<0.05

O aumento de estroma observado na Figura 38, indica ocorrência de um processo de remodelamento cardíaco com maior presença de tecido conjuntivo e células inflamatórias. Ainda na análise morfológica do tecido, observa-se uma diminuição da porcentagem de cardiomiócitos, indicando uma perda celular, Figura 39-A. Essa, foi avaliada, até o momento por um ensaio de Imuno-histoquímica de caspase 3-ativada marcada com o DAB, de forma que os resultados da Figura 39-B corroboram o dado de redução do número de cardiomiócitos.

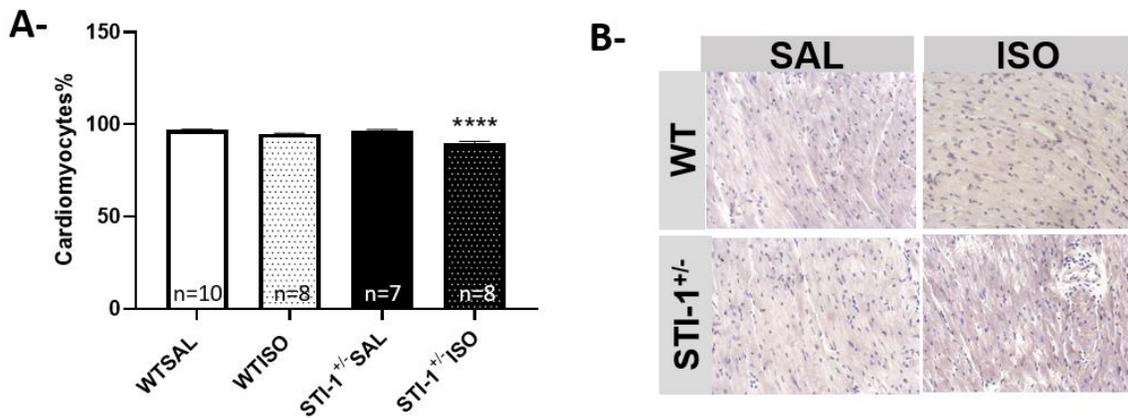


Figura 40- Perda celular com diminuição da porcentagem de cardiomiócitos no tecido e aumento da caspase ativada nos animais STI-1^{+/-}ISO: **A-** Gráfico com percentual de cardiomiócitos no tecido dos grupos WT, STI-1^{+/-}, salina e isoproterenol, apresenta uma redução no grupo significativamente aumentado no grupo STI-1^{+/-}ISO. **B-** Ensaio de Imuno-histoquímica para caspase 3-ativada dos grupos WT, STI-1^{+/-}, salina e isoproterenol, em que uma coloração mais amarronzada no grupo significativamente aumentado nos grupos tratados indicam maior presença ad caspase clivada. *p<0.05. N= número de animais

O DAB produzirá, por uma reação do antígeno alvo com a peroxidase, uma coloração amarronzada. Dessa forma pode-se notar na Figura 39-B que os animais STI-1^{+/-}ISO apresentam um tom de marrom mais acentuado que seus controles salina e animais WT. Há também um discreto aumento da coloração nos animais WTISO em relação aos animais salina, pois o tratamento com o isoproterenol por si só já leva à indução de apoptose dos cardiomiócitos (Zhuo et al., 2013).

Assim, vemos nesse ponto do trabalho, que os animais STI-1^{+/-}ISO apesar de apresentarem um aumento do ganho de peso cardíaco, eles apresentam a hipertrofia celular comprometida, com concomitante aumento de infiltrado inflamatório e ocorrência de morte celular.

De forma similar ao realizado no estado basal, animais da linhagem Δ TPR, foram submetidos aos experimentos mais significativos (recrutamento da maquinaria STI-1, marcadores de estresse reticular, peso cardíaco, morfometria do tecido cardíaco, análise da caspase ativada tecidual), apresentados nas Figuras 40, 41, 42; para a confirmação da expressão dos fenótipos observados diante da perda parcial de STI-1.

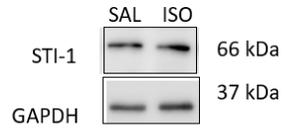
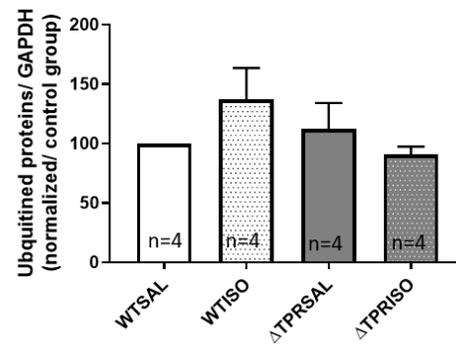
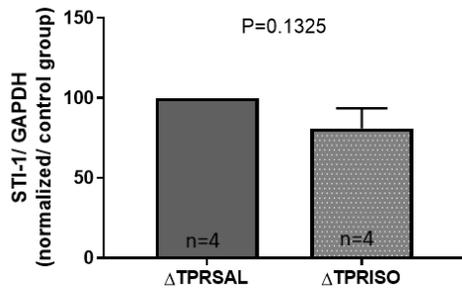
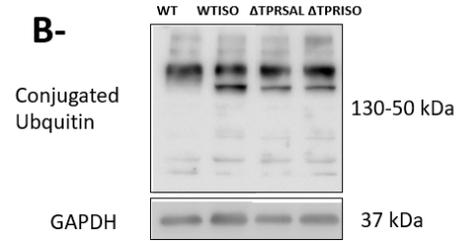
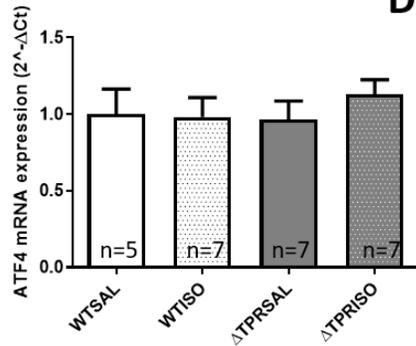
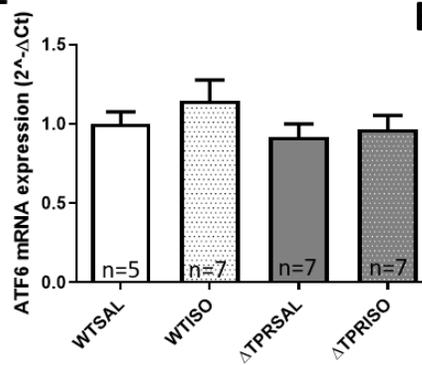
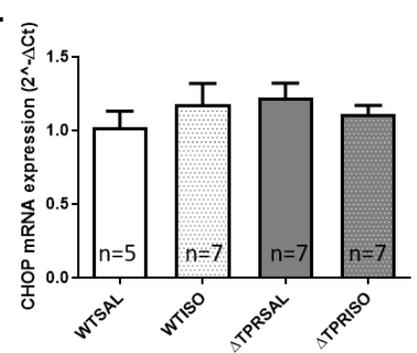
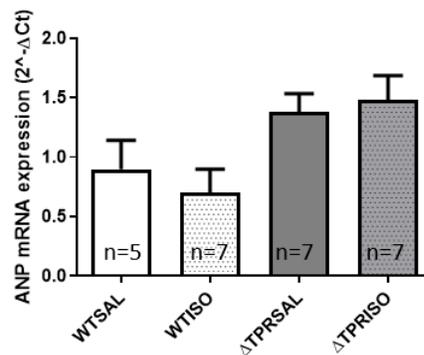
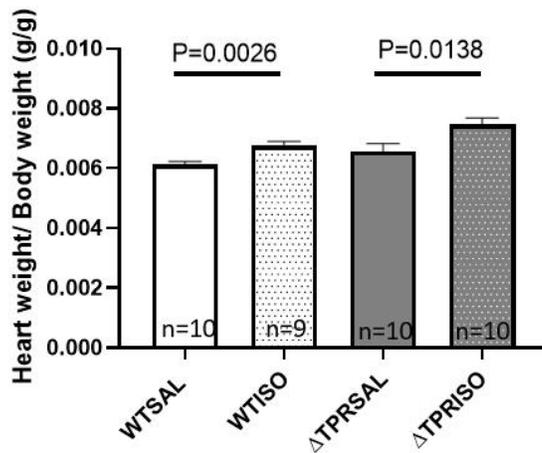
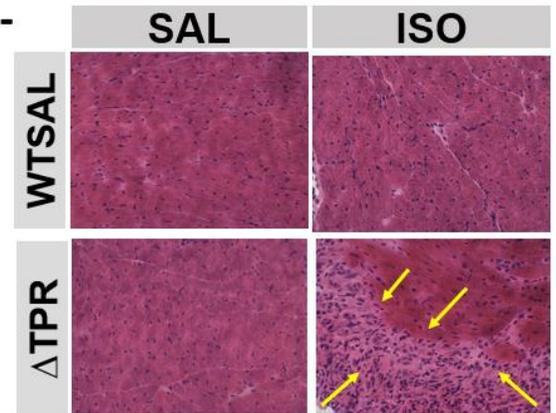
A-**B-****C-****D-****E-****F-**

Figura 41- Expressão da STI-1 inalterada nos animais Δ TPR, assim como o nível de proteínas ubiquitinizadas e a expressão de marcadores de estresse reticular: **A-** Representativo de Western Blot para a proteína STI-1 nos animais Δ TPR, salina e isoproterenol respectivamente; com seus gráficos de análise semiquantitativa e sem observação de aumento de expressão. **B-** Representativo de Western Blot para proteínas ubiquitinizadas (130 a 50kDa) animais WT, Δ TPR; salina e isoproterenol; com seu respectivo gráfico de análise semiquantitativa sem diferenças significativas; **C-D-E-** Gráficos de análise quantitativa dos níveis de RNA indicando níveis de expressão similares de marcadores de estresse de retículo: ATF4, ATF6, CHOP, respectivamente para os animais WT e Δ TPR, salina e isoproterenol. **F-** Gráficos de análise quantitativa dos níveis de RNA para os marcadores de estresse cardíaco, peptídeo natriurético atrial, sem alterações estatísticas. N= número de animais.

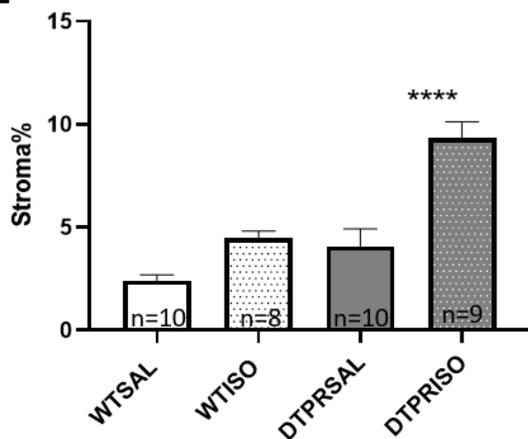
A-



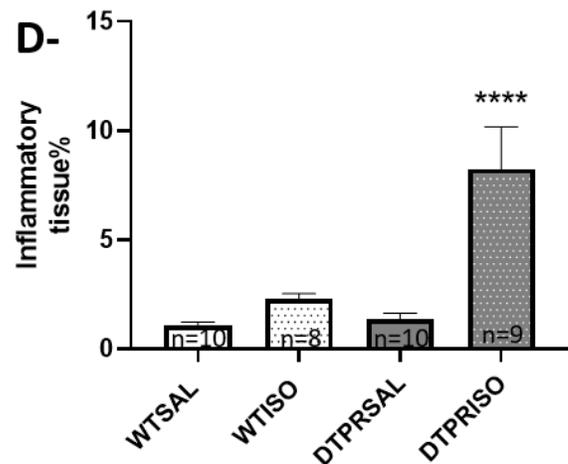
B-



C-



D-



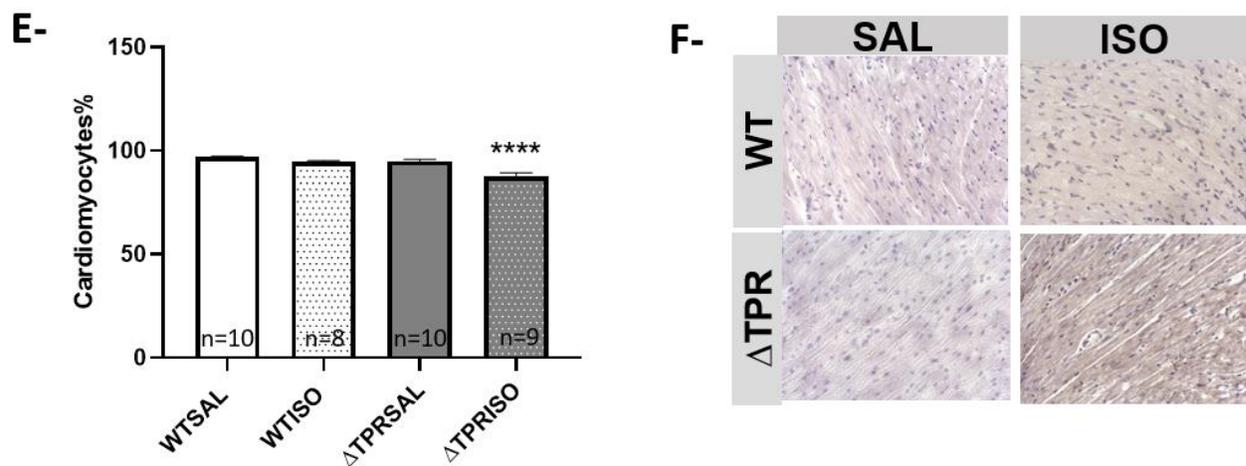


Figura 42- Animais Δ TPR apresentam aumento da razão peso do coração/ peso corporal com concomitante aumento de estroma e células inflamatórias, e perda de cardiomiócitos: A- Razão peso cardíaco/peso corporal de animais WT e Δ TPR, salina e isoproterenol, aumentada entre o mesmo genótipo e diferentes tratamentos; **B-** Imagem histológica representativa da constituição tecidual dos grupos WT e Δ TPR antes e após tratamento, com grande aumento de estroma em animais Δ TPRISO. **C-** Gráfico com percentual de estroma no tecido cardíaco dos grupos WT, Δ TPR, salina e isoproterenol, com animais Δ TPRISO apresentando relevante aumento de percentual de estroma e **D-** Percentual de presença de células inflamatórias. **E-** Gráfico com percentual de cardiomiócitos no tecido cardíaco dos grupos WT, Δ TPR, salina e isoproterenol, indicando perda de cardiomiócitos em animais Δ TPRISO; **F-** Ensaio de Imuno-histoquímica para caspase 3-ativada dos grupos WT, Δ TPR, salina e isoproterenol, com tom mais amarronzado nos grupos tratados com a droga. N= número de animais.* $p < 0.05$

4.2-4- Avaliação da resposta cardíaca à nível funcional

Por, último ao analisar o ecocardiograma dos animais pós tratamento, pode-se verificar na Figura 42, que os animais Δ TPR apresentam alteração da função cardíaca significativa com um tratamento de 7 dias com isoproterenol. Indicando que estes tem menores condições de adaptação ao estresse cardíaco.

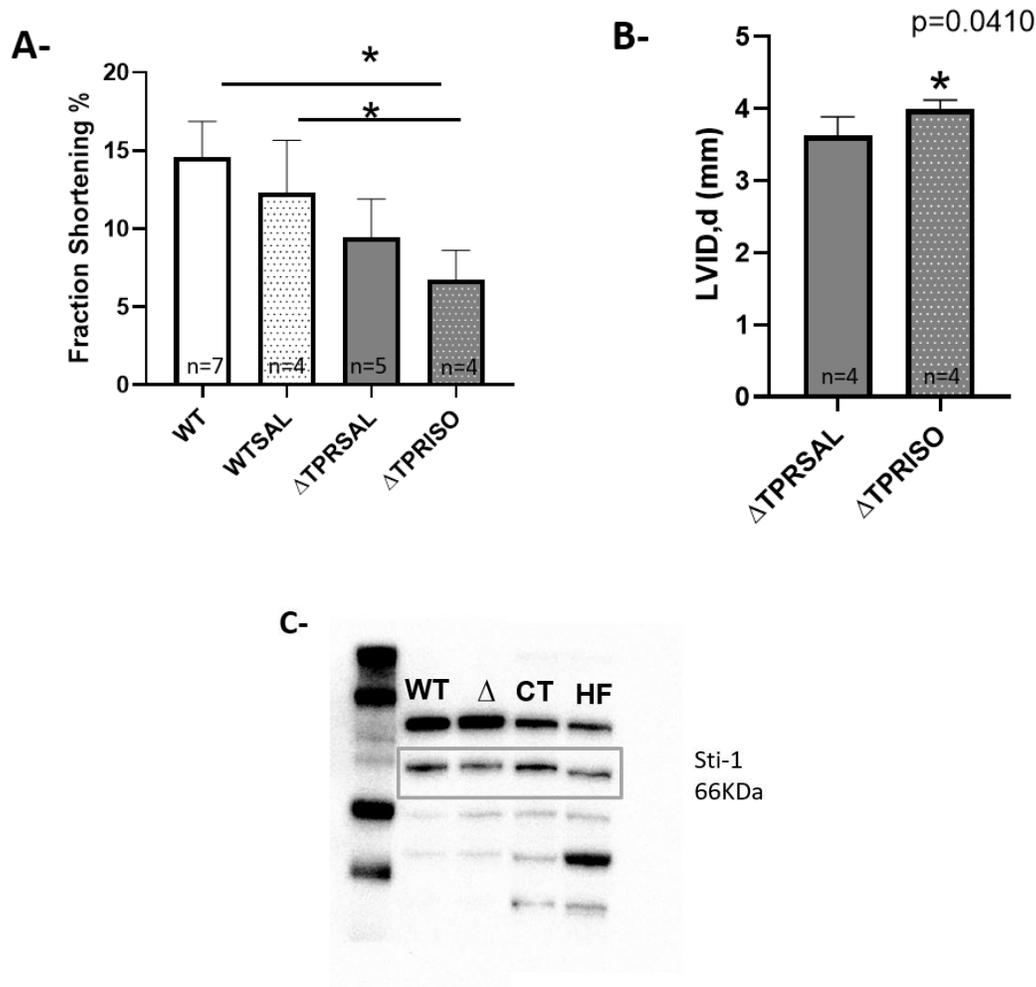


FIGURA 43- Animais Δ TPR apresentam indicativos de perda da função cardíaca, e padrão de expressão da STI-1 semelhante à pacientes com insuficiência cardíaca: A- Gráfico de análise da Fração de encurtamento em animais WT e Δ TPR, salina e isoproterenol. Animais Δ TPRSAL apresentam diminuição da FS em relação aos animais WT e os Δ TPRISO, também, têm perda da fração de encurtamento quando comparado ao selvagem tratado com isoproterenol. **B-** Gráfico da medida do diâmetro interno do ventrículo esquerdo em animais WT e Δ TPR, salina e isoproterenol, indicando aumento da câmara do VE em animais Δ TPRISO. **C-** Representativo do padrão de Western Blot para a proteína STI-1 de camundongos WT e Δ TPR, em comparação com pacientes humanos controle e de insuficiência cardíaca, podendo-se observar diminuição na expressão de STI-1 nos animais Δ TPRISO e em pacientes com falência cardíaca. N= número de animais. P<0,05.

5.DISSCUSSÃO

O primeiro grande achado desse projeto, se fez na confirmação da expressão da co-chaperona STI-1 em cardiomiócitos de animais adultos e cardiomiócitos humanos, abrindo um vasto campo a ser investigado na busca por compreender seu papel, na fisiologia cardiovascular. Por se tratar de uma co-chaperona, envolvida em uma maquinaria que tem significativa importância nas etapas de ativação de vias intracelulares e maturação proteica, definiu-se como o objetivo deste projeto a avaliação da importância da STI-1 nos processos de hipertrofia fisiológica e patológica.

Levando em consideração o primeiro grupo de experimentos deste projeto, no intuito de avaliar a hipertrofia cardíaca que ocorre durante o desenvolvimento do animal desde o nascimento até o estágio adulto, pode-se dizer que as linhagens STI-1^{+/-} e Δ TPR apresentaram fenótipo semelhantes ao dos camundongos selvagens, no que se diz respeito à expressão da maquinaria chaperonina, da estrutura morfológica do coração e da função cardíaca. Dessa forma, os experimentos realizados no estado basal, demonstram que a hipertrofia fisiológica que ocorre em resposta ao desenvolvimento acontece normalmente mesmo diante da deleção parcial da STI-1.

Achado curioso que foi encontrado nos experimentos com cardiomiócitos isolados de animais no estado basal (Figura 12), é o fato da STI-1 se encontrar no sarcolema da célula. Sabendo, que os neurônios apresentam secreção da STI-1 e ação extracelular na patofisiologia do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Ostapchenko et al., 2013), torna-se possível cogitar se essa também seria secretada por cardiomiócitos e se desempenharia uma possível ação extracelular.

Na segunda etapa do projeto, foi estudada a relevância da STI-1 na fisiologia cardíaca diante de um quadro de estresse. Nos modelos de estresse cardíaco usados, tratamento crônico com isoproterenol e cirurgia da TAC, foi observado o aumento dos níveis de expressão da STI-1, indicando que essa maquinaria foi recrutada; como era de se esperar pelo próprio nome (Stress inducible protein 1). No entanto, amostras de pacientes humanos com quadros de insuficiência cardíaca mostraram um menor nível de STI-1 do que pacientes controles. Assim, os modelos animais, geneticamente modificados, utilizados no projeto se tornam importantes na investigação da correlação

temporal da diminuição da expressão da STI-1 e o desenvolvimento de um quadro de insuficiência cardíaca no paciente. Este resultados levam a algumas indagações: - Menores níveis de STI-1 seriam uma consequência de um comprometimento da fisiologia de cardiomiócitos e da sua capacidade de produzi-la; ou indivíduos que tem a produção de STI-1 comprometida por alguma razão são mais susceptíveis à desenvolver patologias quem podem culminar em quadros de insuficiência? O que os modelos animais com redução de STI-1, e os experimentos mostraram é que a perda parcial de STI-1 compromete a resposta cardíaca ao estresse. Nesta condição, os animais STI-1^{+/-} apesar de não apresentarem indicativos de estresse reticular e ativação do sistema proteassômico, apresentaram aumento do peso cardíaco, decorrente principalmente do aumento de estroma e infiltrado inflamatório. Corroborando esses achados a linhagem Δ TPR apresentou fenótipo semelhante, além do comprometimento da função cardíaca.

Destinchando os resultados adquiridos, começa-se pela primeira hipótese deste projeto. Por a STI-1 se tratar de uma co-chaperona, a sua redução, ainda que parcial, poderia comprometer os processos de maturação proteica levando à um quadro de estresse de retículo, e ativação do sistema proteasômico. Assim haveria não só a indisponibilidade para a hipertrofia celular, mas também a ativação das vias de morte celular.

Entretanto, os marcadores de estresse reticular e os índices de ubiquitinação apresentaram-se semelhantes, indicando que a via de maturação proteica não esta sendo sobrecarregada e, ou, comprometida.

Diante destes achados, o que se pode hipotetizar é que outras funções realizadas pela STI-1 e sua maquinaria podem estar comprometidas, como por exemplo a ativação de proteínas e iniciação de cascatas intracelulares (como observado na via da AKT no estado basal). Assim, sem a ativação de vias, como a de hipertrofia, e de síntese proteica seria possível justificar a ausência da hipertrofia celular de cardiomiócitos, e ausência de proteínas mal enoveladas. Da mesma forma, outras funções, como a citoproteção, desempenhadas pela STI-1 poderiam estar também comprometidas, tornando as células mais susceptíveis à morte celular por outros motivos, que não um quadro de estresse reticular.

A fim de, confirmar se a iniciação dessas cascatas de hipertrofia estão, de fato, sendo iniciadas amostras de tecido cardíaco de animais WT e STI-1^{+/-}; salina e isoproterenol, já foram enviadas para experimentos de fosfoproteômica em parceria com outros centros de pesquisa internacionais. Desta forma, a comparação níveis de proteínas totais e fosforiladas, pode elucidar se as vias de hipertrofia estão sendo afetadas, e tem sua ativação comprometida.

Em relação, à perda de cardiomiócitos que é observada e injustificada pela ausência de ERstress, deve-se considerar o efeito citoprotetor da STI-1. Hoje se tem bem exemplificado como a STI-1, desempenha um papel importante no Sistema Nervoso no sentido de citoproteção neuronal, sobrevivência celular e prevenção de morte celular programada.

Sabendo-se que a expressão proteica de toda a maquinaria envolvida Hsp-sti1 encontra-se semelhante no cérebro e coração (ensaios de Western Blot), nas linhagens WT, STI1^{+/-} e Δ TPR, pode-se conjecturar um efeito, também, citoprotetor da STI1 em cardiomiócitos. De forma a complementar esse raciocínio, tem-se resultados preliminares de experimentos com a linhagem *STI1*^{TGA}. Nesta linhagem, os camundongos têm os níveis de expressão da STI-1 cerca de 2,5x maior. Quando submetidos ao tratamento com isoproterenol, resultados preliminares do laboratório indicam que não há aumento do estroma e de células inflamatórias, e uma possível tendência aos animais *STI1*^{TGA}ISO sofrerem até menos com o estresse do que os animais WTISO. Assim, ilustra-se que níveis maiores de STI-1 são capazes de proteger o tecido cardíaco de injúrias e que diante um estímulo estressor para hipertrofia essa diferença é capaz de diminuir o remodelamento do coração.

Das diversas vias em que a STI-1 é descrita participando desses eventos (como a da PKA e MAPK) a via da PI3 quinase/Akt se faz um caminho de significativa importância, uma vez que a AKT apresenta um papel protetor no coração (Lopes et al., 2005)(Zanata et al., 2002).

Em relação ao aumento de estroma com células inflamatórias nos animais STI-1^{+/-}ISO e Δ TPRISO, temos que ressaltar que majoritariamente as células inflamatórias presentes no estroma dos animais são representadas por células mononucleares, com núcleos descentrados e irregulares, e extenso citoplasma característico de macrófagos. Ademais, o aumento da porcentagem de estroma e células inflamatórias se deu de forma concentrada, sendo observado focos com maior frequência no sentido do miocárdio para o pericárdio.

Outra questão a ser discutida neste projeto é quanto a origem das células inflamatória presentes nesse aumento de estroma. Seriam essas células oriundas de um infiltrado inflamatório que poderia estar ocorrendo por ocasião da morte celular; ou seriam essas células macrófagos residentes do tecido cardíaco que diante do estresse começaram a se proliferar? Essa é uma questão que gera bastante repercussão principalmente quando se considera o papel que macrófagos infiltrados, desempenham no processo de remodelamento cardíaco (Hulsmans et al., 2017) (Bajpai et al., 2019), (Frantz and Nahrendorf, 2014).

Por tanto, o primeiro passo é a confirmação da constituição dessas células por macrófagos. E para isso, experimento de histologia com a identificação de marcadores celulares de macrófagos como CD45, F4/80, MAC-3, CD11b, CD11c, CD68 e CD115, tem sido cogitado (Frantz and Nahrendorf, 2014). Usando-se de um raciocínio semelhante, sabe-se que monócitos podem ser definidos por sua expressão de Ly-6C que é um antígeno para Gr-1. Tradicionalmente, monócitos Ly-6C^{high} (Gr-1⁺) apresentam também, CCR2^{high} CX3CR1^{low} CD62L⁺, e são chamados de inflamatórios; enquanto Ly-6C^{low} (Gr-1⁻) com CCR2^{low} CX3CR1^{high} CD62L⁻, são característicos de macrófagos residentes do estado basal (Hilgendorf and Swirski, 2012).

Assim analisando a expressão das proteínas da superfície celular dessas células, juntamente com a presença de marcadores de proliferação em células já identificadas como macrófagos poderia se traçar a origem principal dessas células, seja de infiltração do sistema hematopoiético ou proliferação de residentes.

Uma reflexão se faz importante em relação aos animais da linhagem Δ TPR. Esses que foram utilizados com o objetivo de corroborar os achados dos animais Knockouts, apresentaram em sete dias de tratamento com isoproterenol perda da função cardíaca. O que pode explicar tal observação é o fato de que a STI-1 desempenha o seu papel também em dímeros, como observado na Figura 42 dos resultados.

Nesta, pode-se ver as bandas indicativas do monômeros de STI-1 (66 kDa) tanto em camundongos como nos pacientes humanos. No entanto, é fácil a observação de bandas superiores bem definidas, com aproximadamente o dobro do peso. Essas não apresentam diferenças de intensidade entre genótipos e tipo de pacientes, por estarem saturadas na quantidade de proteínas usadas no gel.

Sabendo-se que já é descrito que a STI-1 se comporta também como dímeros; (Prodromou et al., 1999), é possível concluir que os dímeros de STI-1 formados nos animais STI-1^{+/-}, são todos formados, por proteínas STI-1 funcionais. Por outro lado, animais Δ TPR que já apresentam uma diminuição da expressão de STI-1 funcionais (por comprometimento da tradução proteica), são ainda capazes de formar dímeros entre proteínas funcionais e mutadas. Assim os dímeros apresentam perda de função, levando à um comprometimento da maquinaria, e cardíaco ainda maior nesses animais.

Esse comprometimento maior pode ser visualizado não só na perda de função sistólica, e dilatação de câmara interna, como também nos níveis de expressão do ANP. Esses que ainda se mantém elevados após 7 dias nos animais STI-1^{+/-}, que estão em uma fase de resposta compensatória ao estímulo estressor, já se encontram reduzidos nos Δ TPR em função do início do quadro de falência e perda das respostas fisiológicas dos cardiomiócitos.

Vale ressaltar uma terceira banda, bem marcada e definida pelo anticorpo anti-STI-1, nos pacientes com insuficiência cardíaca. Essa banda pode ser especulada como um produto de degradação, ou um pré produto, de uma proteína STI-1, que apresente epítipo para o anticorpo.

Por último, futuramente, há a intenção de comparar estes modelos de estudo de hipertrofia patológica com animais adultos submetidos à protocolos de hipertrofia

fisiológica (como a do exercício físico) e outros modelos de estresse cardíaco (como animais submetidos à infarto). Entender o papel da STI-1 em outros modelos se faz promissor, no sentido de que cada modelo ou protocolo de estresse cardíaco requer diferentes suportes da fisiologia celular e abrange diferentes vias intracelulares (Shimizu and Minamino, 2016), (Bernardo et al., 2010), (Nakamura and Sadoshima, 2018). Assim pode-se desvendar se realmente a STI-1 é importante na manutenção da função do cardiomiócito e suas respostas ao estresse em diferentes circunstâncias.

6. CONCLUSÃO

A confirmação da expressão da co-chaperona STI-1 nos cardiomiócitos, que por si só se faz uma grande descoberta, abre um vasto campo de pesquisa no sentido de investigar sua importância na fisiologia cardiovascular.

O que se pode concluir é que na diminuição parcial da expressão da STI-1, os animais apresentam desenvolvimento cardíaco normal. No que se diz respeito à maquinaria molecular dos seus cardiomiócitos, da sua composição morfológica, e sua função cardíaca, o coração de animais com menores níveis de expressão da STI-1 se encontram semelhantes à dos animais selvagens. Assim, afirma-se que a hipertrofia fisiológica do desenvolvimento não se encontra comprometida.

No entanto, uma vez submetidos à uma condição patológica, um estresse hipertrófico os animais geneticamente modificados apresentam respostas dissonantes dos animais WT. O aumento de peso cardíaco, que é esperado após o tratamento com o isoproterenol como reflexo da hipertrofia cardíaca, é visto em todos os grupos. Todavia, os motivos pelos quais esse ganho ocorre, são diferentes.

Animais WT, apresentam um aumento da área celular correspondente ao aumento do comprimento, mas principalmente, do diâmetro celular, pela adição de sarcômeros em paralelo, coerente à um quadro de hipertrofia cardíaca concêntrica. Diferentemente, o que respalda esse ganho de peso cardíaco nos animais STI-1^{+/-} e Δ TPR é na verdade o aumento significativo do estroma, por majoritariamente aumento da presença de células

inflamatórias. Concomitantemente, averigua-se a perda de cardiomiócitos, dada pela morte celular, corroborada pelos ensaios de imuno-histoquímica para a caspase.

Sabe-se neste momento também, que a morte celular, representada pela perda de cardiomiócitos, não foi culminada por um estresse de retículo devido acúmulo de proteínas mal enoveladas. O que leva a hipotetizar que o comprometimento da maquinaria chaperonina pode-se encontrar nas vias superiores de iniciação de cascatas intracelulares para a síntese de proteínas da hipertrofia cardíaca.

Portanto, pode-se concluir que na ocorrência da hipertrofia fisiológica a perda de STI-1 não comprometeu o desenvolvimento cardíaco. Mas, que diante de uma demanda mais intensa da maquinaria envolvendo a STI-1, como em um quadro patológico e de estresse, o coração com redução de sua expressão se faz mais susceptível ao remodelamento e injúria cardíaca. Assim, a STI-1 tem um papel crítico no que se diz a resposta cardíaca adaptativa ao estresse.

Deve-se por fim, buscar de forma eficaz e pressurosa a importância da STI-1 nos quadros de insuficiência cardíaca e sua correlação temporal com o desenvolvimento do quadro clínico, elucidando se a observação da sua redução nesses pacientes se dá como causa ou consequência. A co-chaperona STI-1, pelos resultados deste projeto, se faz um significativo alvo de pesquisas futuras, com olhar até mesmo terapêutico sobre ela.

7. REFERÊNCIAS

- Agnoletti, G., Rodella, A., Cornacchiari, A., Panzali, A.F., Harris, P., and Ferrari, R. (1992). Isoproterenol induces release of atrial natriuretic peptide from rat atrium in vitro. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 262.
- Alvira, S., Cuéllar, J., Röhl, A., Yamamoto, S., Itoh, H., Alfonso, C., Rivas, G., Buchner, J., and Valpuesta, J.M. (2014). Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop. *Nat. Commun.* 5.
- Azizi, C., Carayon, A., Masson, F., Noe, E., Barthelemy, C., Eurin, J., Maistre, G., and Legrand, J.C. (1993). Mechanisms of isoproterenol-induced atrial natriuretic peptide release from superfused rabbit atria. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 265.
- Bajpai, G., Bredemeyer, A., Li, W., Zaitsev, K., Koenig, A.L., Lokshina, I., Mohan, J., Ivey, B., Hsiao, H.M., Weinheimer, C., et al. (2019). Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ. Res.* 124, 263–278.
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P., and Rosen, N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 277, 39858–39866.
- Beraldo, F.H., Soares, I.N., Goncalves, D.F., Fan, J., Thomas, A.A., Santos, T.G., Mohammad, A.H., Roffé, M., Calder, M.D., Nikolova, S., et al. (2013). Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *FASEB J.* 27, 3594–3607.
- Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 128, 191–227.
- Fernandes, T., Soci, U.P.R., and Oliveira, E.M. (2011). Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: MicroRNAs and molecular determinants. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 44, 836–847.
- Frantz, S., and Nahrendorf, M. (2014). Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* 102, 240–248.
- Gao, S., and Vatner, S. (2011). Murine Echocardiography. *Curr Protoc Mouse Biol.* 71–83.
- Guatimosim, S., Sobie, E.A., Dos, J., Cruz, S., Martin, L.A., Lederer, W.J., Sobie, E.A., Santos, J., Martin, L.A., and Molecular, W.J.L. (2001). Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. *Cell*

Physiol. 21201, 1327–1339.

Hampton, R.Y. (2000). ER stress response: Getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr. Biol.* 10, 518–521.

Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 574–581.

Hendrix Sloane, Misuraca, & Moore, A. (2013). Validation of non invasive measurements of cardiac output in mice using echocardiography. *Bone* 23, 1–7.

Hulsmans, M., Clauss, S., Xiao, L., Aguirre, A.D., King, K.R., Hanley, A., Hucker, W.J., Wülfers, E.M., Seemann, G., Courties, G., et al. (2017). Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 169, 510-522.e20.

Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopes, J., Choy, W.Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2017a). The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* 11, 1–23.

Lackie et al., 2019 (2017b). A hypomorphic Stip1 allele reveals the requirement for chaperone networks in mouse development and aging. <https://doi.org/10.1101/258673>.

Lee, A.S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35, 373–381.

Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 624–635.

Lopes, M.H., Hajj, G.N.M., Muras, A.G., Mancini, G.L., Castro, R.M.P.S., Ribeiro, K.C.B., Brentani, R.R., Linden, R., and Martins, V.R. (2005). Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* 25, 11330–11339.

Mill, J.G., and Vassallo, D.V. (2001). Hipertrofia cardíaca. 8, 63–75.

Nakamura, M., and Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 387–407.

Ostapchenko, V.G., Beraldo, F.H., Mohammad, A.H., Xie, Y.F., Hirata, P.H.F., Magalhaes, A.C., Lamour, G., Li, H., Maciejewski, A., Belrose, J.C., et al. (2013). The prion protein ligand, stress-inducible phosphoprotein 1, regulates amyloid- β oligomer toxicity. *J. Neurosci.* 33, 16552–16564.

Picard, F., Depret, F., Zanotti-Cavazzoni, S., and Hollenberg, S. (2014). Effect of anesthesia level on murine cardiac function. *F1000Research* 3, 165.

Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* 18, 754–762.

Sahasrabudhe, P., Rohrberg, J., Biebl, M.M., Rutz, D.A., and Buchner, J. (2017). The Plasticity of the Hsp90 Co-chaperone System. *Mol. Cell* 67, 947-961.e5.

Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 3460–3470.

Schröder, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses.

Shimizu, I., and Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 245–262.

Song, W., Wang, H., and Wu, Q. (2015). Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA). *Gene* 569, 1–6.

Vinhas, M., Araújo, A.C., Ribeiro, S., Rosário, L.B., and Belo, J.A. (2013). Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice. *Cardiovasc. Ultrasound* 11, 1–10.

Young, J.C. (2000). Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.* 19, 5930–5940.

Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N.M., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R.O., Cabral, A.L.B., Lee, K.S., Juliano, M.A., et al. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* 21, 3307–3316.

Zhang, H., and Burrows, F. (2004). Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J. Mol. Med.* 82, 488–499.

Zheng, Y.Z., Cao, Z.G., Hu, X., and Shao, Z.M. (2014). The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 145, 349–358.

Zhuo, X.Z., Wu, Y., Ni, Y.J., Liu, J.H., Gong, M., Wang, X.H., Wei, F., Wang, T.Z., Yuan, Z., Ma, A.Q., et al. (2013). Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* 18, 800–810.