

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

Victor Moura Vidal Costa

**VIAS DE SINALIZAÇÃO ALTERADAS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM  
REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DA PROTEINA INDUZIDA POR ESTRESSE (ST11)  
TRATADOS COM ISOPROTERENOL**

Belo Horizonte - MG  
2021

Victor Moura Vidal Costa

**VIAS DE SINALIZAÇÃO ALTERADAS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM  
REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DA PROTEINA INDUZIDA POR ESTRESSE (ST11)  
TRATADOS COM ISOPROTERENOL**

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

Orientador(a): Prof. Dra. Silvia Guatimosim

Co-orientador(a): Dr. Anderson Kenedy Santos

Belo Horizonte - MG  
2021

043

Costa, Victor Moura Vidal.

Vias de sinalização alteradas no coração de camundongos com redução na expressão da proteína induzida por estresse (ST11) tratados com Isoproterenol [manuscrito] / Victor Moura Vidal Costa. – 2021.

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

Orientador(a): Prof. Dra. Silvia Guatimosim. Co-orientador(a): Dr. Anderson Kenedy Santos.

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

1. Fisiologia. 2. Coração. 3. Isoproterenol. 4. Cardiomegalia. 5. Proteínas de Choque Térmico. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim. II. Santos, Anderson Kenedy. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 549 DE VICTOR MOURA VIDAL COSTA**

**Vias de Sinalização Alteradas No Coração de Camundongos Com Redução Na Expressão da Proteína Induzida Por Estresse (ST11) Tratados Com Isoproterenol**

**VICTOR MOURA VIDAL COSTA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **09 de dezembro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes**, ICB/USP

**Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, ICB/UFMG

**Dr. Anderson Kenedy Santos**, ICB/UFMG - Coordenador

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

Belo Horizonte, 09 de dezembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Kenedy Santos**, Usuário Externo, em 14/12/2021, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga**, Professor do Magistério Superior, em 14/12/2021, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 16/12/2021, às 08:41, 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 **Marilene Hohmuth Lopes**, Usuário Externo, em



22/12/2021, às 08:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1136245** e o código CRC **812B080C**.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, José Carlos e Floreni, por me proporcionarem todo arcabouço necessário para que eu me desenvolvesse com o caráter e valores que possuo hoje. Sem o pilar em que eles me sustentaram seria impossível ter chegado aqui. Ao meu AMOR, Anna Flávia, por estar sempre comigo, nas horas boas e ruins, por me dar força e calma para que eu conseguisse realizar este trabalho. Também quero agradecer a minha irmã Thaís, meu primo (que está mais para irmão mais velho) Marcos, ao meu amigo Rafael e a todos meus primos, primas, amigos e amigas que dividiram uma parte da vida comigo, vocês estão e sempre irão estar no meu coração. Às minhas tias e tios, em especial as minhas tias Margarida, Terezinha, Francisca, Claudia, Florípes e Marlene, não só pelo exemplo, mas por me ensinarem o real significado de FAMÍLIA, onde nas dificuldades ou nas conquistas sempre estamos JUNTOS.

Quero agradecer a todos que colaboraram na realização deste projeto, a presença de pessoas de diferentes expertises abrilhanta ainda mais os achados desse trabalho. Estendo esse agradecimento a todos meus colegas do laboratório de sinalização cardíaca, sem nosso trabalho em equipe esse trabalho seria inviável. Obrigado ao Sergio, por ter sido o primeiro a me receber no laboratório e me ajudar nos primeiros passos experimentais. Ao meu co-orientador, Anderson, pela paciência e disponibilidade em auxiliar meu trabalho. Mesmo nas adversidades você conseguiu e ainda consegue me ensinar muito, espero que nossa parceria científica possa permanecer em trabalhos futuros. Meu muitíssimo obrigado a minha orientadora Silvia Guatimosin, mesmo se dedicando ao laboratório e ao PGFISFAR quase integralmente você ainda encontra tempo e sensibilidade para aconselhar, acalantar e motivar seus estudantes. Você é um exemplo de força e dedicação e me inspira a ser um cientista íntegro, dedicado e relevante na nossa área.

Fazer meu mestrado no PGFISFAR foi fundamental para a evolução em minha maturidade científica. Por fim, gostaria de agradecer a todos os integrantes do PGFISFAR. À parceria de diversos estudantes nas disciplinas e nas dúvidas nos protocolos experimentais. Aos técnicos pela dedicação intensa em manter nossa estrutura. Aos professores pelos ensinamentos em disciplinas e pelos conselhos acadêmicos. Nessa época de obscurantismo e desmonte da ciência brasileira nossa união não só nos deixa mais fortes, mas garante a sobrevivência de nossa relevância no cenário científico internacional.

## RESUMO

Já se é descrito que as moléculas chaperonas desempenham um papel importante durante o desenvolvimento das doenças cardíacas. A proteína induzível por estresse 1 (STI1) é uma co-chaperona importante da maquinaria Hsp70 / Hsp90, amplamente estudada em neurônios, onde desempenha um papel na maturação de proteínas e na citoproteção a eventos de estresse celular. Apesar da STI1 ter sua expressão no coração descrita desde 2009, sua função nesse órgão ainda é desconhecida. Neste contexto nosso grupo foi pioneiro em mostrar a presença da STI1 no coração de pacientes humanos e sua redução em corações com insuficiência cardíaca. Também mostramos o papel cardioprotetor da STI1 em modelo de hiperativação adrenérgica induzida pelo isoproterenol (ISO). Apesar de já constatar a relevância de STI1 para a resposta ao estresse adrenérgico no coração, os mecanismos envolvidos neste processo ainda são desconhecidos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar as vias de sinalização alteradas nos corações de camundongos com redução na expressão da STI1 (STI1<sup>+/-</sup>) em resposta ao tratamento ISO. Para isso, realizamos uma análise proteômica do tipo “*Bottom up*” afim de avaliar e prever as alterações de vias nesses contextos. Identificamos que os camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentaram alterações em diversas vias celulares, com destaque para a inibição da via do fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2 (NRF2), a qual foi posteriormente validada por meio de imunofluorescência no tecido cardíaco de camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO quando comparados ao WT/ISO. Também identificamos a predição dos eventos de necrose e fibrose cardíaca nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO, sendo o último validado por histologia por meio da técnica de picrossírius e qRT-PCR para colágeno 3. Interessantemente, encontramos diversas proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica reguladas negativamente no grupo STI1<sup>+/-</sup>/ISO, indicando que a redução dos níveis de STI1 compromete a síntese proteica no coração em condições de estresse. Este resultado, de certa forma, está alinhado com a ausência de hipertrofia de cardiomiócitos no grupo STI1<sup>+/-</sup>/ISO quando comparado ao WT/ISO, uma vez que o crescimento hipertrófico demanda da maquinaria de síntese proteica. Em conclusão, estes dados apontam para mediadores celulares dependentes da STI1 no coração, que incluem principalmente vias relacionadas a síntese proteica, que por sua vez inviabiliza o acometimento da hipertrofia de cardiomiócitos. Com isso, nosso trabalho abre perspectivas importantes para estudos mais robustos acerca do papel da STI1 no estresse cardíaco, que podem gerar novas estratégias terapêuticas para doenças cardíacas.

Palavras chave: Coração, STI1, Isoproterenol, Hipertrofia cardíaca.

## ABSTRACT

Chaperone molecules have been described to play an important role during the development of heart disease. Stress-inducible protein 1 (STI1) is an important co-chaperone of the Hsp70 / Hsp90 machinery, widely studied in neurons, where it plays a role in protein maturation and cytoprotection against cellular stress events. Despite STI1 having its expression in the heart described since 2009, its role in this organ is still unknown. In this context, our group was a pioneer in showing the presence of STI1 in the hearts of human patients and its reduction in hearts with heart failure. We also show the cardioprotective role of STI1 in a model of adrenergic hyperactivation induced by isoproterenol (ISO). Although we have already established the relevance of STI1 to the adrenergic stress response in the heart, the mechanisms involved in this process are still unknown. Thus, the aim of this work was to evaluate the altered signaling pathways in mouse hearts with reduced expression of STI1 (STI1<sup>+/-</sup>) in response to ISO treatment. For this, we performed a "Bottom up" proteomic assay in order to evaluate and predict the alterations of pathways in these contexts. We identified that the STI1<sup>+/-</sup>/ISO mice showed alterations in several cellular pathways, with emphasis on the inhibition of the nuclear factor 2 pathway related to erythroid 2 (NRF2), which was later validated by means of immunofluorescence in the cardiac tissue of STI1<sup>+/-</sup>/ISO mice when compared to WT/ISO. We also identified the prediction of cardiac necrosis and fibrosis events in STI1<sup>+/-</sup>/ISO mice, the latter being validated by histology using the picosirius technique and qRT-PCR for collagen 3. Interestingly, we found several proteins related to protein synthesis and degradation down-regulated in the STI1<sup>+/-</sup>/ISO group, indicating that the reduction in STI1 levels compromises protein synthesis in the heart under stress conditions. This result, in a way, is in line with the absence of cardiomyocyte hypertrophy in the STI1<sup>+/-</sup>/ISO group when compared to the WT/ISO group, since hypertrophic growth demands the protein synthesis machinery. In conclusion, these data point to STI1-dependent cellular mediators in the heart, which mainly include pathways related to protein synthesis, which, in turn, prevents the onset of cardiomyocyte hypertrophy. Thus, our work opens important perspectives for more robust studies about the role of STI1 in cardiac stress, which may generate new therapeutic strategies for heart disease.

Keywords: Heart, STI1, Isoproterenol, Cardiac hypertrophy.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinalização adrenérgica no coração via receptores adrenérgicos do tipo $\beta$ .	19
Figura 2- Atuação das proteínas BAG e chaperonas na degradação proteica .....	23
Figura 3- Estrutura proteica de ST1/Hop com suas regiões de ligação, fosforilação e SUMOilação .....	26
Figura 4- Ciclo do dobramento proteico mediado pela maquinaria das chaperonas HSP90 e HSP70 com auxílio da cochaperona ST1/Hop .....	27
Figura 5- ST1 está presente em corações humanos e murinos .....	28
Figura 6- Estímulos patológicos induzem o aumento da expressão de ST1 no coração .....	29
Figura 7- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> são mais susceptíveis a lesão cardíaca gerada pelo ISO.....	30
Figura 8- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> tratados com ISO não apresentam hipertrofia em seus cardiomiócitos .....	30
Figura 9- Gel de agarose com amplicons de 400pb identificando animais ST1 <sup>+/-</sup> e de 241pb identificando camundongos WT .....	34
Figura 10- Esquema de tratamento com ISO ou solução salina nos animais ST1 <sup>+/-</sup> e WT com coleta dos corações no oitavo dia de experimento .....	34
Figura 11- Valores de abundância relativa são similares entre os indivíduos de mesmo grupo	40
Figura 12- Dados de abundância relativa de cada indivíduo apresentam distribuição normal ..	41
Figura 13- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam alterações em diversas vias relacionadas a toxicidade celular .....	42
Figura 14- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam menor presença de NRF2 em seu tecido cardíaco comparado com WT/ISO .....	44
Figura 15- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam alterações em alvos proteicos que levam a predição do acometimento de fibrose cardíaca .....	45
Figura 16- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam maior deposição e expressão de colágeno em seu tecido cardíaco comparado com WT/ISO.....	46
Figura 17- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam alterações em alvos proteicos que levam a predição da ocorrência de necrose.....	48
Figura 18- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam alterações em alvos proteicos relacionados a cardiomiopatia dilatada.....	50
Figura 19- Camundongos ST1 <sup>+/-</sup> /ISO apresentam seus fenótipos patológicos por possuírem um possível descontrole de ROS e prejuízo no controle proteico .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a via NRF2 .....	41
Tabela 2- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a fibrose cardíaca.....	43
Tabela 3- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a necrose e morte celular .....	45
Tabela 4- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a cardiomiopatia dilatada .....	47
Tabela 5- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a hipertrofia cardíaca .....	48
Tabela 6- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a biossíntese de RNAt .....	49
Tabela 7- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a proteassoma .....	49
Tabela 8- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) ribossomais alteradas .....	50
Tabela 9- Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a via mTOR.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AC.....Adenilato-ciclase
- ACTA1..... $\alpha$  actinina 1
- ACTA1..... $\alpha$  actinina 1
- AKAP12.....Proteína âncora A-cinase 12
- AKT.....Protein kinase B
- AKT2.....RAC-beta serina / treonina-proteína quinase
- ALDOA.....Aldolase A
- ANP.....Atrial natriuretic peptide
- ATP.....Adenosina trifosfato
- BAG.....Atanogene associado a BCL-2
- BP.....Pares de base
- cAMP.....Adenosina monofosfato cíclico
- CCT7.....Subunidade eta da proteína 1 do complexo T
- cDNA.....DNA complementar
- CK2.....Caseína quinase 2
- CKM.....Creatina quinase
- CKMT2.....Creatina quinase tipo S
- COPS5.....Subunidade 5 do homólogo fotomorfogênico constitutivo da COP9
- CTNNA1.....Catenina Alfa 1
- DNA.....Ácido desoxirribonucleico
- DNAJB1.....Membro 11 da subfamília homóloga DnaJ
- DNAJB4.....Membro 4 da subfamília homóloga DnaJ
- EDTA.....Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGLN1.....Fator induzível por hipóxia proil hidroxilase 2
- eIF4E.....Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
- ELAVL1.....Proteína 1 do tipo ELAV
- ENG.....Endoglin
- ERK2.....Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
- FWD.....Forward

- FXYP1.....Fosfolemman
- GAPDH.....Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GNAI2.....Proteína G (i) de ligação do nucleotídeo da guanina
- GPX1.....Glutaciona peroxidase 1
- GPX3.....Glutaciona peroxidase 3
- GSK3β.....Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta
- HIF-1α.....Fator induzível por hipóxia 1 alfa
- HNRNPA1.....Ribonucleoproteína A1 nuclear heterogênea
- HOP.....Human organizing protein
- HSP.....Heat Shock protein
- IC.....Insuficiência cardíaca
- IGF2R.....Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 2
- IL 6.....Interleucina 6
- IPA.....Ingenuity Pathway Analysis
- ISO.....Isoproterenol
- ITGB1.....Integrina beta-1
- JNK.....c-Jun N-terminal cinase
- JUP.....Placoglobina
- LAMTOR2.....Adaptador Endossomal / Lisossômico Tardio e Ativador de MTOR 2
- LC3.....Proteínas associadas a microtúbulos 1A / 1B de cadeia leve 3B
- MAP2K4.....Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitogênio 4
- MAPK1.....Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
- MAVS.....Proteína de sinalização antiviral mitocondria
- mRNA.....RNA mensageiro
- MRPL21.....Proteína Ribossomal Mitocondrial L21
- MRPL23.....Proteína Ribossomal Mitocondrial L23

- MRPL4.....Proteína Ribossomal Mitocondrial L4
- mTOR.....Alvo de mamífero da rapamicina
- MYH7.....Cadeia pesada de miosina 7
- MYOZ2.....Miozenina 2
- NEXN.....Proteína de ligação de Nexilina F-Actina
- NRF2.....Fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2
- OPTN.....Optineurina
- P23.....Prostaglandina E sintase 3
- P70S6K.....Proteína ribossômica S6 quinase beta-1
- PARK7.....Proteína 7 da doença de Parkinson
- PARP.....Poli-ADP polimerase
- PBS.....Tampão fosfato-salino
- PCR.....Reação em cadeia da polimerase
- PDLIM5.....Proteína 5 dos domínios PDZ e LIM
- PEA15. ....Fosfoproteína astrocítica PEA-15
- PFA.....Paraformaldeído
- PI3K.....Fosfatidilinositol 3-quinase
- PIAS1.....Proteína ligase E3 SUMO
- PKA.....Proteína quinase A
- PP2A.....Fosfatase 2 A
- PPIase.....Poli-isomerase
- PPP1CA.....Subunidade catalítica PP1-alfa da fosfatase serina / treonina
- PrP<sup>c</sup>.....Proteína priônica.
- PRS10.....Subunidade reguladora de protease 26S S10B
- PSMD11.....Subunidade Proteassoma 26S, não ATPase 11
- PSMD13.....Subunidade Proteassoma 26S, não ATPase 13
- PSMD7.....Subunidade Proteassoma 26S, não ATPase 7

- PYCARD.....Domínio PYD e CARD
- RAB2A.....Proteína relacionada à Ras Rab-2<sup>a</sup>
- RALB.....Proteína relacionada à Ras Ral-B
- REV.....Reverse
- RHEB.....Homólogo de Ras, ligante de MTORC1
- RHOA.....Membro da família de homólogos de Ras  
A
- RNA.....Ácido ribonucleico
- RPL13a.....Proteína ribossômica 60S L13a
- RPL18a.....Proteína ribossômica 60S L18a
- RPL23.....Proteína ribossômica 60S L23
- RPL23a.....Proteína ribossômica 60S L23a
- RPL26.....Proteína ribossômica 60S L26
- RPL27a.....Proteína ribossômica 60S L27a
- RPL35a.....Proteína ribossômica 60S L35a
- RPL4.....Proteína ribossômica 60S L4
- RPL7a.....Proteína ribossômica 60S L7a
- RPLP2.....Proteína ribossômica 60S P2
- RPS18.....Proteína ribossômica 40S S18
- RPS2.....Proteína ribossômica 40S S2
- RPS3.....Proteína ribossômica 40S S3
- RPS8.....Proteína ribossômica 40S S8
- RPSA.....Proteína ribossômica 40S SA
- RRAD.....Inibidor da glicólise relacionado com Ras
- RT-qPCR.....PRC quantitativo em tempo real
- S100A10.....Proteína A10 de ligação de cálcio S100
- SLC8A1.....Trocador de sódio e cálcio NCX
- SRI.....Sorcina
- STAT-3.....Transdutor de sinal e ativador de  
transcrição do tipo 3
- STI-1.....Stress inducible protein
- STI-1<sup>+/-</sup>.....Modelo animal heterozigoto para deleção  
de STI1
- STUB1.....Proteína CHIP

- TAC.....Constricção da aorta transversa
- TFRC.....Proteína 1 do receptor de transferrina
- TGF $\beta$ .....Fator de transformação do crescimento  
beta
- TRP's.....Tetratricopeptídeos
- WT.....Wild Type
- ZYX.....Zixina
- $\beta$ 1-AR.....Receptores  $\beta$ 1 adrenérgicos
- $\beta$ 2-AR.....Receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos

## LISTA DE SÍMBOLOS

- mg.....Miligramas
- Kg.....Quilogramas
- $\alpha$ .....Alfa do alfabeto grego
- $\beta$ .....Beta do alfabeto grego
- $\text{Ca}^{2+}$ .....Íon cálcio
- $\text{Na}^{+}$ .....Íon sódio
- mm.....Milímetros
- M.....Molar
- $\mu\text{m}$ .....Micrometros
- mM.....Milimolar
- L .....Litro
- KCl.....Cloreto de potássio
- $\text{H}_2\text{O}$ .....Água
- $\text{H}_2\text{O}_2$ .....Peróxido de hidrogênio
- $\mu\text{g}$ .....Micrograma
- $\mu\text{M}$ .....Micromolar
- n.....Número experimental
- p.....Valor de probabilidade



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Estresse Cardíaco .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Resposta adrenérgica ao estresse .....	19
1.1.2 Hipertrofia Cardíaca .....	21
<b>1.2 Papel das proteínas de choque térmico (HSPs) no coração .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 HSP70 no coração .....	22
1.2.2 HSP90 no coração .....	24
<b>1.3 Papel da proteína induzida por estresse induzido do tipo 1 (STI1) em resposta ao estresse celular.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 STI1 é relevante para a resposta ao estresse cardíaco.....</b>	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3 MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Animais.....	34
3.1.1 Linhagem de camundongos STI1 <sup>+/-</sup> .....	34
3.2 Genotipagem dos animais .....	34
3.3 Tratamento com ISO .....	35
3.4 Medida do peso do coração.....	35
3.5 Análise proteômica .....	36
3.5.1 Preparação das amostras .....	36
3.5.2 Marcação como TMT-10plex .....	36
3.5.5 Analise dos dados .....	38
3.6 Coleta do tecido cardíaco para histologia .....	38
3.7 Análise de deposição de colágeno por coloração de tecido cardíaco com Picro Sirius Red.....	39
3.8 Imunofluorescência .....	39
3.9 Avaliação da expressão de gênica por PCR em tempo real .....	40
3.10 Estatística .....	40
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>

<b>4.1 Ensaio proteômico revela alteração em diversas vias de toxicidade celular nos animais STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2 Camundongos STI1<sup>+/-</sup> apresentam deficiência na presença de NRF2 em resposta ao tratamento com ISO</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3 Camundongos STI1<sup>+/-</sup> apresentam maior presença de conteúdo fibrótico no coração em resposta ao tratamento com ISO</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4 Camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam alteração em proteínas relacionadas a morte celular e necrose</b> .....	<b>48</b>
<b>4.5 Camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam alteração em proteínas relacionadas a cardiomiopatia dilatada e hipertrofia cardíaca</b> .....	<b>49</b>
<b>4.6 Camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam redução em proteínas relacionadas ao controle proteico</b> .....	<b>52</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Estresse Cardíaco

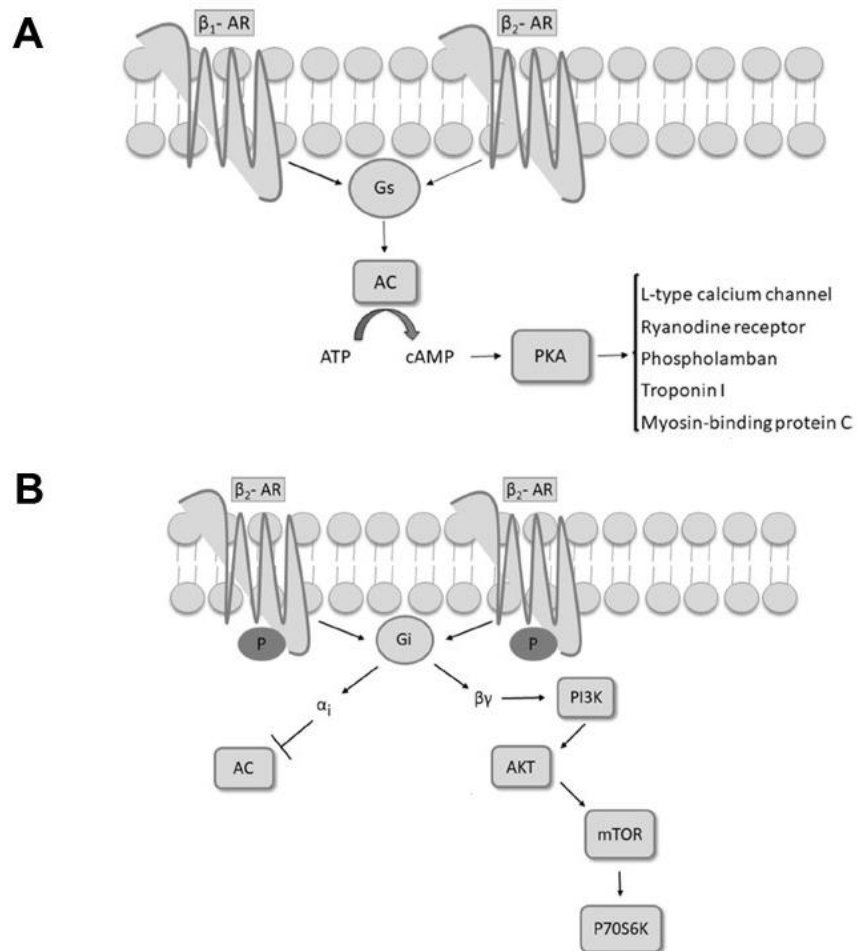
O coração é um órgão fundamental na garantia da homeostasia dos sistemas. Sua função como um agente propulsor de sangue garante a perfusão tecidual, distribuição de oxigênio e nutrientes fundamentais a vida e a comunicação entre diferentes regiões do corpo. Diversas situações podem levar a um comprometimento da homeostasia cardíaca, como ocorre em eventos isquêmicos, arritmogênicos e de ordem genética. Em resposta a tais eventos estressores no coração, podem ocorrer diversas adaptações moleculares e fisiológicas no sistema cardiovascular a fim de garantir a manutenção da função cardíaca. Por sua vez, a resposta insuficiente ou incompatível ao estresse cardíaco é o ponto de partida para a maioria das cardiomiopatias registradas até o momento.

### 1.1.1 Resposta adrenérgica ao estresse

A sinalização adrenérgica no coração é crucial para a adaptação do sistema cardiovascular ao aumento de demanda do fluxo sanguíneo que ocorre em situações como no exercício físico, manutenção da pressão sanguínea e eventos de *fight or flight*. Outra função da via adrenérgica cardíaca se dá na resposta compensatória a eventos adversos de estresse crônico encontrados em cardiomiopatias, como o que ocorre na insuficiência cardíaca (SPADARI; CAVADAS; DE CARVALHO; ORTOLANI *et al.*, 2018).

No coração se encontram receptores adrenérgicos  $\beta$  e  $\alpha$ , sendo que cerca de 90% desses receptores são  $\beta$ , em uma proporção  $\beta_1/\beta_2$  de 80:20. Desta forma, a principal catecolamina efetora no coração é a noradrenalina, que apresenta uma afinidade significativamente maior aos receptores  $\beta$  (BAKER, 2014). Em situações de homeostasia, receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  se encontram acoplados a proteína G estimulatória (Gs), que quando ativada leva a geração de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) via adenilato-ciclase (AC), que por sua vez ativa a proteína quinase do tipo A (PKA) (Figura 1-A), iniciando uma cascata de eventos que elevam a frequência e contratilidade cardíaca (SANTOS; SPADARI-BRATFISCH, 2006). No entanto, a excessiva ativação adrenérgica no coração via Gs, típica da insuficiência cardíaca (LYMPEROPOULOS; RENGO; KOCH, 2013), pode gerar efeitos cardiotoxicos devido à sobrecarga de  $Ca^{2+}$  e ativação da via  $Ca^{2+}$ /calmodulina quinase II, ocasionando eventos relacionados a apoptose e inibição da hipertrofia adaptativa (PEREIRA;

CHENG; LAO; NA *et al.*, 2013). Neste cenário ocorre uma adaptação regulatória dos receptores  $\beta_2$  que passam a se acoplar a proteína G inibitória (Gi) (DAAKA; LUTTRELL; LEFKOWITZ, 1997; SPADARI; CAVADAS; DE CARVALHO; ORTOLANI *et al.*, 2018). A ativação de Gi leva a inibição da via dependente de AMPc e ativa a via PI3K–Akt e mTOR/P70S6K (Figura 1-B), o que possibilita a síntese proteica necessária para o crescimento hipertrófico e inibição de apoptose (SIMM; SCHLÜTER; DIEZ; PIPER *et al.*, 1998; ZHU; ZHENG; KOCH; LEFKOWITZ *et al.*, 2001). Apesar da ativação crônica da via mTOR ser prejudicial, sua mobilização em resposta a sobrecarga de função cardíaca é importante para a hipertrofia adaptativa de cardiomiócitos (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).



**Figura 1** – Sinalização adrenérgica no coração via receptores adrenérgicos do tipo  $\beta$ . **A-** Representação esquemática das vias de sinalização dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos em cardiomiócitos por meio do acoplamento dos receptores à proteína Gs. Proteína G estimuladora (Gs), adenilato-ciclase (AC), adenosina trifosfato (ATP), adenosina monofosfato cíclico (cAMP), proteína quinase A (PKA). **B-** Representação esquemática da via de sinalização do receptor beta 2 adrenérgico ( $\beta_2$ -AR) - Gi. Proteína G inibitória (Gi), subunidade  $\alpha$ -Gi ( $\alpha_i$ ), subunidade  $\beta\gamma$  da proteína Gi ( $\beta\gamma$ ), adenilato-ciclase (AC), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), alvo de mamífero da rapamicina (mTOR), proteína ribossômica S6 quinase beta-1 (P70S6K). (SPADARI; CAVADAS; DE CARVALHO; ORTOLANI *et al.*, 2018).

### 1.1.2 Hipertrofia Cardíaca

Em resposta ao aumento da demanda de fluxo sanguíneo crônico o coração é acometido pela hipertrofia cardíaca. Esse fenômeno é caracterizado pelo aumento da área do coração e dos cardiomiócitos, gerando inicialmente um aumento da contratilidade (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018). A hipertrofia cardíaca ocorre em resposta tanto a eventos fisiológicos, como na gravidez e no exercício físico, quanto a patologias, como no infarto do miocárdio e hipertensão. Interessantemente, os mecanismos moleculares que precedem a hipertrofia cardíaca diferem em condições fisiológicas e patológicas, onde em eventos patológicos se tem reexpressão de genes de fase fetal, como o peptídeo natriurético atrial (*Anp*),  $\alpha$ -actinina 1 (*Actn1*) e cadeia pesada de miosina 7 (*Myh7*), enquanto em eventos fisiológicos se tem ativação de vias celulares que antagonizam o remodelamento cardíaco (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

A estrutura da hipertrofia cardíaca também difere de acordo com o estímulo inicial, onde em eventos fisiológicos se tem hipertrofia excêntrica e patológicos, inicialmente, se tem uma hipertrofia concêntrica caracterizada pela diminuição do diâmetro da câmara ventricular esquerda, devido ao aumento na espessura da parede ventricular, geralmente com função contrátil preservada (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018). No entanto, com a progressão do estímulo patológico à hipertrofia se torna excêntrica, com aumento do diâmetro da câmara ventricular esquerda devido a diminuição da espessura da parede ventricular (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018). A hipertrofia cardíaca patológica constantemente precede a disfunção e insuficiência cardíaca, podendo ter ou não redução na fração de ejeção e remodelamento cardíaco com perda de tecido contrátil e fibrose (LEVY; GARRISON; SAVAGE; KANNEL *et al.*, 1990; MOHAMMED; REDFIELD, 2015). Apesar da hipertrofia patológica apresentar um prognóstico prejudicial a função cardíaca o seu acometimento se faz necessário para a adaptação inicial ao evento estressor e para a manutenção da função contrátil.

Em condições experimentais a utilização de isoproterenol (ISO), um agonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo mimetiza o padrão de hipertrofia cardíaca patológica *in vivo* e *in vitro*, sendo assim amplamente utilizado em estudos cardiovasculares (NICHTOVA; NOVOTOVA; KRALOVA; STANKOVICOVA, 2012).

## 1.2 Papel das proteínas de choque térmico (HSPs) no coração

Com uma alta demanda metabólica e uma função contrátil constante, o coração requer um fino controle de qualidade proteica, desde a síntese, dobramento e degradação. Em cardiomiopatias que envolvem estresses mecânicos, oxidativos e mudanças no pH, a qualidade proteica pode ser afetada, gerando um acúmulo de proteínas mal dobradas e formação de agregados proteicos (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018). Isto causa um efeito cardiotoxíco que ocorre no infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e em distúrbios de ordem genética (PATTISON; SANBE; MALOYAN; OSINSKA *et al.*, 2008; RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018). Neste contexto uma maquinaria pode ser ativada em resposta à toxicidade das proteínas mal dobradas ou desnaturadas no coração, composta pelas proteínas de choque térmico (HSPs) pertencentes a família das chaperonas, que agem no controle da síntese/degradação proteica, redobramento de proteínas mal dobradas e na proteção à morte celular de cardiomiócitos induzida por eventos estressores. No coração temos o predomínio das HSP70 e HSP90 (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018).

### 1.2.1 HSP70 no coração

HSP70 é uma proteína monomérica constituída principalmente por três domínios funcionais, sendo um deles de ligação ao ATP, outro sensível a protease e um domínio de ligação proteica (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018). A HSP70 é encontrada no citosol, membrana plasmática, núcleo e meio extracelular e apresenta oito isoformas em humanos que agem em diversos compartimentos celulares (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). A HSP70 possui uma atividade de protease em proteínas mal dobradas a fim de atingir a estrutura nativa da proteína em um ciclo de quebra dependente de ATP e redobramento proteico, demonstrando uma papel importante destas proteínas no controle do proteoma (SHARMA; DE LOS RIOS; CHRISTEN; LUSTIG *et al.*, 2010). No coração, além de HSP70 também se tem a presença da proteína homóloga de choque térmico cognata (HSC70), a qual apresenta sua expressão de forma constitutiva enquanto a HSP70 pode ser induzida por estímulos estressores (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018).

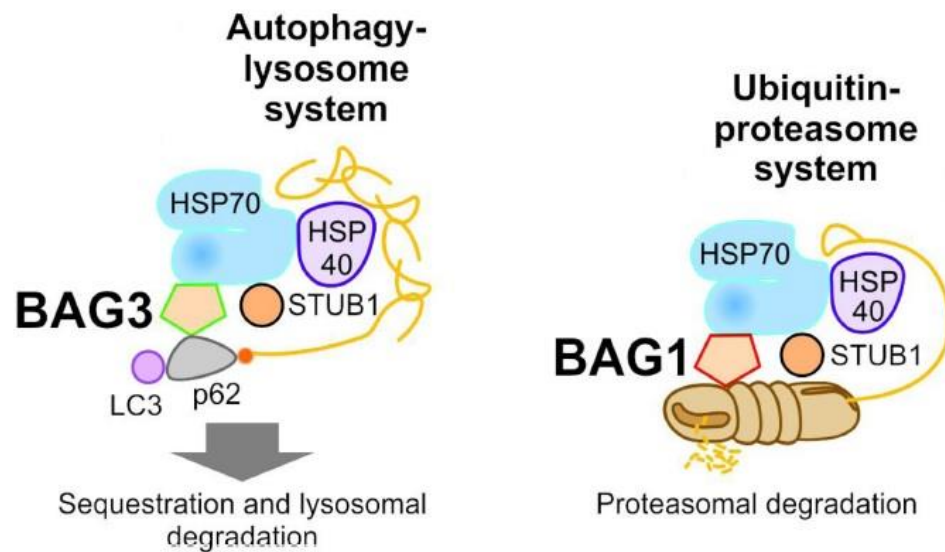
HSP70 apresenta uma rápida expressão após eventos de isquemia cardíaca em coelhos (KNOWLTON; BRECHER; APSTEIN, 1991). Sendo que, em camundongos que super expressam HSP70, quando submetidos a isquemia e reperfusão apresentam maiores picos de pressão sistólica, com injúria celular limitada e uma melhor recuperação da força contrátil (MARBER; MESTRIL; CHI; SAYEN *et al.*, 1995; PLUMIER; ROSS; CURRIE; ANGELIDIS *et al.*, 1995; TROST; OMENS; KARLON; MEYER *et al.*, 1998). Por outro lado, o bloqueio do

aumento da expressão da isoforma HSP72 em eventos de hipóxia, gera um aumento do dano tecidual e morte celular em cardiomiócitos de felinos (NAKANO; MANN; KNOWLTON, 1997). Nesta mesma linha, em outro experimento utilizando coelhos, a superexpressão recombinante de HSP70 humana por injeção intraventricular foi capaz de diminuir a área de infarto em 50% no coração em comparação com animais que receberam um vetor contendo apenas o gene LacZ (OKUBO; WILDNER; SHAH; CHELLIAH *et al.*, 2001). Interessantemente, a expressão de HSP70 também se encontra aumentada em corações humanos após eventos cirúrgicos, como em cirurgia de revascularização do miocárdio e pinça cruzada aórtica (DE JONG; SCHADENBERG; JANSEN; PRAKKEN, 2009). Sendo que pacientes que apresentam maiores níveis de HSP70 demonstram menor incidência de fibrilação atrial pós cirurgia cardíaca em comparação a pacientes com baixos níveis de HSP70 (MANDAL; TORSNEY; POLONIECKI; CAMM *et al.*, 2005; ST RAMMOS; KOULLIAS; HASSAN; ARGYRAKIS *et al.*, 2002).

Além disso, a isoforma HSP75 pode estar relacionada a hipertrofia cardíaca induzida por aumento de pressão, uma vez que camundongos que superexpressam HSP75 submetidos a oclusão aórtica são protegidos dos efeitos patológicos de hipertrofia e fibrose cardíaca, com uma diminuição da ativação das vias de sinalização p38, JNK e AKT (ZHANG; JIANG; YAN; CHENG *et al.*, 2011). Contudo, camundongos que superexpressam HSP70 não apresentaram melhora quando submetidos a eventos de cardiomiopatia dilatada induzida por sobrecarga de pressão e na insuficiência cardíaca, demonstrando que o efeito protetor de HSP70 é condição dependente e pode não estar envolvido em eventos de estresse crônico (BERNARDO; WEEKS; PATTERSON; MCMULLEN, 2016).

Em um contexto fisiológico, as HSP70 e HSP90 atuam na proteostase celular, de forma a garantir o dobramento correto de proteínas recém sintetizadas ou mal dobradas e impedir agregação proteica. Uma gama de proteínas necessita de um trabalho em conjunto entre HSP70 e HSP90 para atingir o dobramento correto, sendo que essa parceria se dá através da proteína de estresse induzido do tipo 1 (STI1) ou seu homólogo humano Hop (JOHNSON; SCHUMACHER; ROSS; TOFT, 1998). Quando não se é possível atingir o dobramento correto de uma proteína a mesma é ubiquitinada e direcionada para o proteassoma, onde ocorrerá a degradação proteica (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018). A HSP70 participa do direcionamento de proteínas para a degradação com o auxílio das proteínas BAG (Atanogene associado a BCL-2) do tipo 1 e 3, porém, de forma diferente em contextos fisiológicos e patológicos (STÜRNER; BEHL, 2017). Na homeostasia, BAG1 apresenta maior expressão em relação a BAG3, de forma que proteínas marcadas por ubiquitina são transportadas para o proteassoma por um complexo formado entre HSP70/

HSP40/STUB1 e BAG1 (Figura 2) (DEMAND; ALBERTI; PATTERSON; HÖHFELD, 2001; GAMERDINGER; HAJIEVA; KAYA; WOLFRUM *et al.*, 2009). Em ambiente patológico, o perfil de expressão das proteínas BAG muda de forma a ter mais BAG3 em relação a BAG1, dessa forma a degradação proteica é caracterizada pelo processo de autofagia lisossomal sendo o transporte realizado pelo complexo HSP70/HSP40/STUB1/LC3/p62/BAG3 (Figura 2) (GAMERDINGER; HAJIEVA; KAYA; WOLFRUM *et al.*, 2009; MINOIA; BONCORAGLIO; VINET; MORELLI *et al.*, 2014). Nota-se que a mudança do perfil de expressão entre BAG1 e BAG3 também é caracterizada por uma mudança na degradação proteica por proteossoma para autofagia lisossomal, respectivamente (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018).



**Figura 2** – Atuação das proteínas BAG e chaperonas na degradação proteica. Em conjunto com o complexo HSP70/HSP40/STUB1 as proteínas BAG1 e BAG3 atuam na degradação proteica proteossomal e por autofagia lisossomal, respectivamente (STÜRNER; BEHL, 2017).

### 1.2.2 HSP90 no coração

Além da atividade associada a HSP70, a chaperona HSP90 também atua de forma específica no controle proteico. HSP90 possui três domínios funcionais, sendo eles de ligação ao ATP, ligação a alvos proteicos e um domínio de dimerização (RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018). Esses domínios são fundamentais para a ligação e ação de HSP90 em proteínas em processo de dobramento ou mal dobradas. HSP90 é capaz de retornar proteínas mal dobradas a sua forma nativa, porém quando isso não é possível, ocorre uma ligação entre HSP90 e seu alvo a fim de estabilizar a estrutura não nativa e impedir a agregação proteica a outras proteínas mal dobradas, dessa forma HSP90 pode fazer a entrega do peptídeo a HSP70 para que ocorra o ciclo de quebra dependente de ATP e redobramento proteico.



(RANEK; STACHOWSKI; KIRK; WILLIS, 2018; SHARMA; DE LOS RIOS; CHRISTEN; LUSTIG *et al.*, 2010). HSP90 apresenta duas principais isoformas presentes no citoplasma, sendo a HSP90 $\beta$  expressa de forma constitutiva e HSP90 $\alpha$  de forma induzível por estresse (WEGELE; MÜLLER; BUCHNER, 2004). A expressão de HSP90 $\alpha$  é aumentada na isquemia cardíaca, sendo a ocorrência desse aumento de forma simultânea a maior expressão do fator de transcrição HSF1 induzida pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (NISHIZAWA; NAKAI; HIGASHI; TANABE *et al.*, 1996; NISHIZAWA; NAKAI; MATSUDA; KOMEDA *et al.*, 1999).

A via de sinalização de AKT é importante para a adaptação e sobrevivência celular a eventos estressores, interessante, HSP90 aparenta ser importante para assegurar a ativação da via AKT. HSP90 assegura a fosforilação de AKT por competição pelos sítios 229-309 com a fosfatase 2A (PP2A) (SATO; FUJITA; TSURUO, 2000). Um exemplo dessa relação HSP90/AKT em células cardíacas é encontrado no modelo de injúria celular por alta de glicose, onde os efeitos benéficos do tratamento com sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) se mostram mediados por HSP90 e AKT fosforilada (KE; CHEN; PENG; ZHANG *et al.*, 2017).

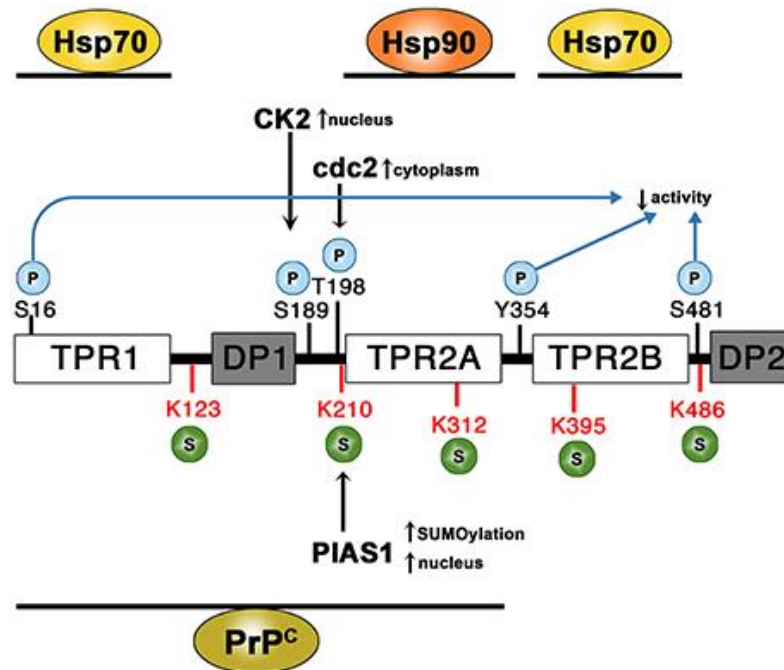
A insuficiência cardíaca induzida pelo tratamento com doxorubicina é gerada pela ativação da poli-ADP polimerase (PARP), sendo que a cardioproteção induzida por meio do tratamento com inibidores de PARP, nesse contexto, aparenta estar relacionada a um aumento na expressão de HSP90 como também na fosforilação de AKT e GSK-3 $\beta$  (Glicogênio sintase quinase 3 beta) (BARTHA; SOLTI; SZABO; OLAH *et al.*, 2011). Nos trabalhos de García *et al* e Datta *et al* é mostrado um papel importante de HSP90 na síntese de colágeno presente no remodelamento cardíaco, esse papel vem da dimerização de HSP90 com o receptor TGF $\beta$  do tipo 1 (Fator de transformação do crescimento beta) nos fibroblastos cardíacos, onde HSP90 também é importante para a ativação de STAT-3 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição do tipo 3) e regula a liberação de IL-6 (Interleucina 6) nos cardiomiócitos (DATTA; BANSAL; RANA; DATTA *et al.*, 2017; GARCÍA; MERINO; GÓMEZ; NISTAL *et al.*, 2016).

### **1.3 Papel da proteína induzida por estresse induzido do tipo 1 (STI1) em resposta ao estresse celular**

A proteína de estresse induzido do tipo 1 (STI1) expressa pelo gene *STIP1* foi descoberta e nomeada em 1989, e tem sua expressão regulada positivamente durante o estresse celular em leveduras (LACKIE; MACIEJEWSKI; OSTAPCHENKO; MARQUES-LOPES *et al.*, 2017; NICOLET; CRAIG, 1989). STI1 e seu homólogo humano Hop apresentam os domínios TPR1, TPR2A, TPR2B, DP1 e DP2, sendo os domínios tetratricopeptídeos (TPR)

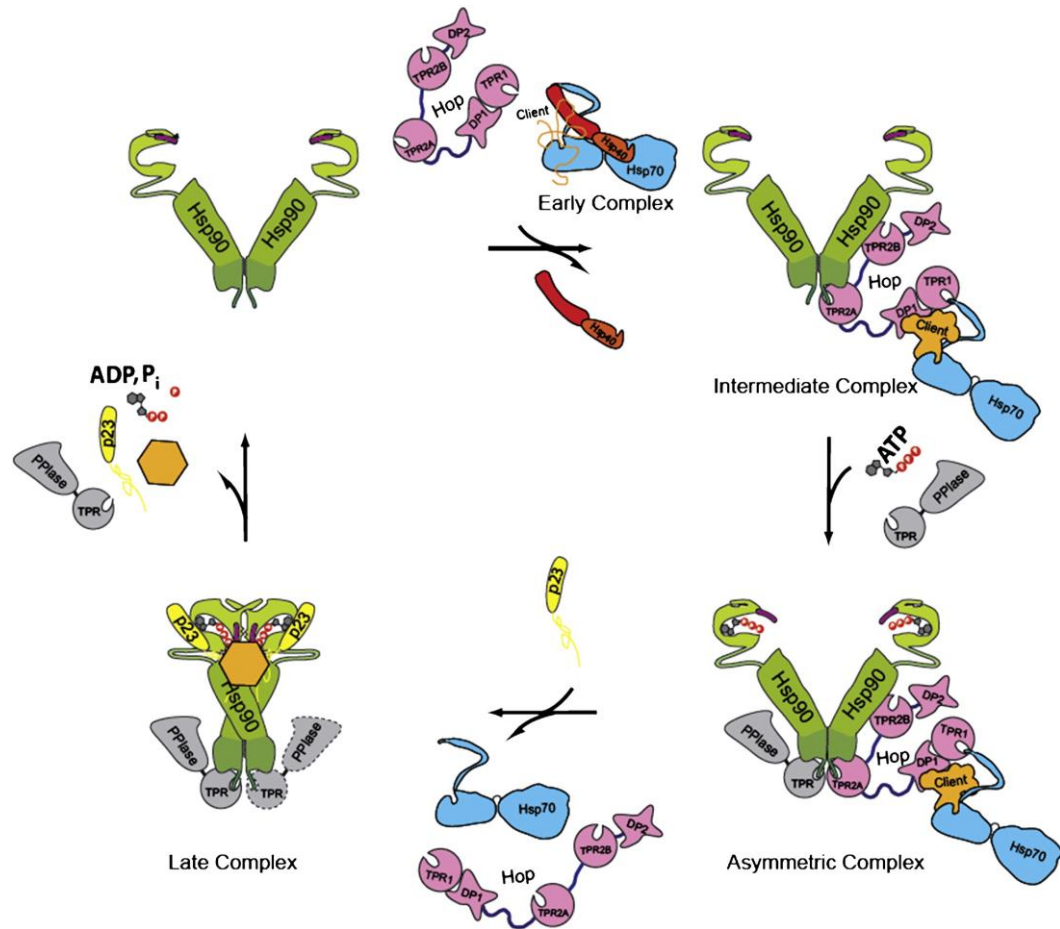
fundamentais para a ligação entre as chaperonas HSP70 e HSP90 e na transferência de peptídeos clientes entre as proteínas (Figura 3) (LACKIE; MACIEJEWSKI; OSTAPCHENKO; MARQUES-LOPES *et al.*, 2017; LEE; GRAF; MAYER; RICHTER *et al.*, 2012). Para a ligação a HSP90, STI1 se utiliza de seus domínios TPR2A e TPR2B que irão inibir a atividade ATPase e estabilizar a estrutura da chaperona (LEE; GRAF; MAYER; RICHTER *et al.*, 2012). STI1 se liga à HSP70 pelos domínios TPR1 e TPR2B, porém, a ligação de HSP90 ao domínio TPR2A inviabiliza a ligação de HSP70 ao TPR2B, dessa forma o complexo ternário STI1-HSP70-HSP90 é caracterizado pela ligação de HSP70 ao domínio TPR1 (RÖHL; WENGLER; MADL; LAGLEDER *et al.*, 2015).

Na maioria dos tecidos se tem a expressão de STI1, sendo comumente encontrada no citoplasma e em condições de estresse celular no núcleo (LACKIE; MACIEJEWSKI; OSTAPCHENKO; MARQUES-LOPES *et al.*, 2017; LONGSHAW; CHAPPLE; BALDA; CHEETHAM *et al.*, 2004). O transporte de STI1 para o núcleo envolve modificações pós-traducionais em sua estrutura, como a fosforilação no sítio S189 pela caseína quinase 2 (CK2) e SUMOilação pela proteína ligase E3 SUMO (PIAS1) (Figura 3). Ao induzir a superexpressão de PIAS1 em astrócitos, STI1 foi encontrada no núcleo colocalizada com HSP90 e PIAS1 (LONGSHAW; CHAPPLE; BALDA; CHEETHAM *et al.*, 2004; SOARES; CAETANO; PINDER; RODRIGUES *et al.*, 2013). A expressão de STI1 se mostra fundamental ao desenvolvimento embrionário em camundongos, uma vez que a deleção do gene *Stip1* é letal (BERALDO; SOARES; GONCALVES; FAN *et al.*, 2013). Interessantemente, metade dos blastocistos não sobrevivem sem a expressão de STI1, sendo que clientes de HSP90 apresentaram uma diminuição na expressão em cerca de 50% nesse contexto de falta de STI1 (BERALDO; SOARES; GONCALVES; FAN *et al.*, 2013).



**Figura 3** – Estrutura proteica de ST1/Hop com suas regiões de ligação, fosforilação (P) e SUMOilação (S) (LACKIE; MACIEJEWSKI; OSTAPCHENKO; MARQUES-LOPES *et al.*, 2017).

ST1 possui função na maturação proteica celular atuando como cochaperona na maquinaria das chaperonas HSP70 e HSP90. Esse processo ocorre com a ligação dos domínios TPR1 e DP1 de ST11/HOP ao complexo formado entre uma proteína cliente em estágio inicial com HSP70/HSP40 (LI; SOROKA; BUCHNER, 2012). Em seguida, esse complexo se liga a uma das regiões de ligação a TPR do dímero de HSP90 pelo domínio TPR2A de ST11/HOP, que por sua vez inibi a atividade ATPase de HSP90 (LI; SOROKA; BUCHNER, 2012). Na outra região de ligação a TPR do dímero de HSP90 ocorre uma ligação por uma poli-isomerase (PPIase), formando o complexo PPIase/HSP90/ ST11/HSP70/HSP40 com uma proteína cliente em estágio intermediário (LI; SOROKA; BUCHNER, 2012). Com a ligação de adenosina trifosfato (ATP) e da cochaperona P23 ocorre uma conformação fechada de HSP90 que libera a ligação do complexo ST11/HSP70/HSP40 mantendo a proteína cliente no estágio final ligada a HSP90 (LI; SOROKA; BUCHNER, 2012). Em seguida a quebra de ATP se tem a liberação de PPIase, P23 (Prostaglandina E sintase 3) e proteína cliente, já em seu estágio dobrado, da estrutura de HSP90, que por sua vez volta a seu estágio aberto possibilitando o recomeço do ciclo (Figura 4) (LI; SOROKA; BUCHNER, 2012).



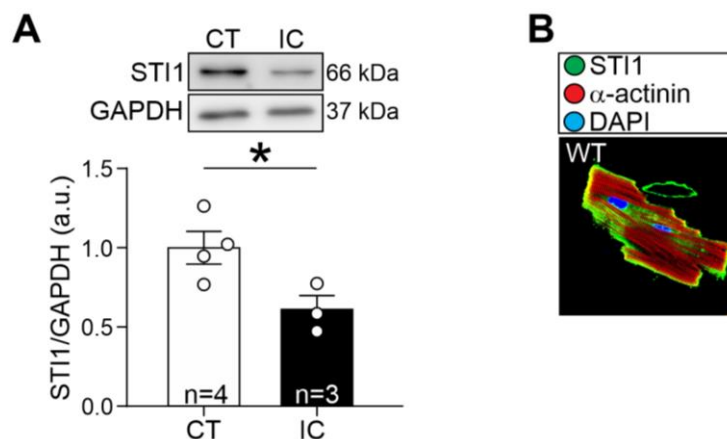
**Figura 4** – Ciclo do dobramento proteico mediado pela maquinaria das chaperonas HSP90 e HSP70 com auxílio da cochaperona STI1/Hop (LI; SOROKA; BUCHNER, 2012).

Além de seu papel intracelular na maquinaria das chaperonas HSP70 e HSP90, em neurônios, STI1 também está presente no meio extracelular atuando em conjunto com a proteína de membrana príon (PrP<sup>c</sup>) (CHIARINI; FREITAS; ZANATA; BRENTANI *et al.*, 2002; LACKIE; MACIEJEWSKI; OSTAPCHENKO; MARQUES-LOPES *et al.*, 2017; ZANATA; LOPES; MERCADANTE; HAJJ *et al.*, 2002). Interessantemente, a interação entre STI1 e PrP<sup>c</sup> demonstrou ter efeitos celulares benéficos em resposta ao tratamento com inibidores de síntese proteica, como a anisomicina, de forma dependente da via AMPc/PKA (CHIARINI; FREITAS; ZANATA; BRENTANI *et al.*, 2002; LOPES; HAJJ; MURAS; MANCINI *et al.*, 2005; ZANATA; LOPES; MERCADANTE; HAJJ *et al.*, 2002). Outra via ativada em resposta a ligação de STI1 ao PrP<sup>c</sup> é a mTOR, sendo essa ativação seguida de aumento na síntese proteica (LOPES; HAJJ; MURAS; MANCINI *et al.*, 2005; ROFFÉ; BERALDO; BESTER; NUNZIANTE *et al.*, 2010). Beraldo e colaboradores, demonstraram que a ativação das vias AMPc/PKA e mTOR na ligação entre STI1 e PrP<sup>c</sup> é dependente do influxo de cálcio através do receptor nicotínico  $\alpha 7$  (BERALDO; ARANTES; SANTOS; QUEIROZ *et al.*, 2010).

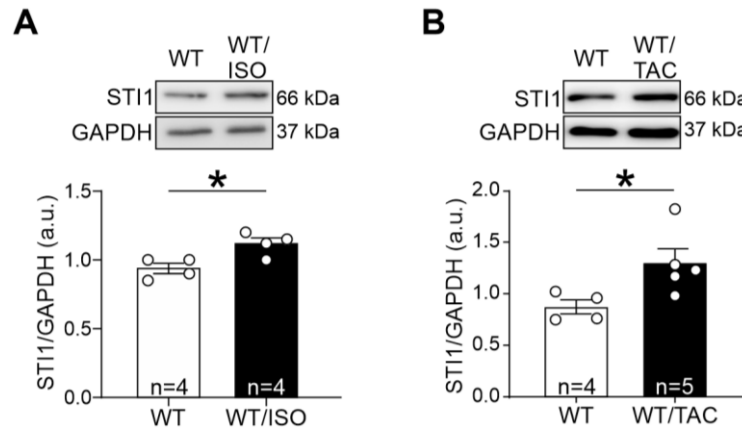
Além de STI1 ser encontrada no núcleo em momentos de estresse celular, o promotor do gene *STIP1* apresenta regiões de ligação ao fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ), demonstrando uma sensibilidade da expressão de STI1 a eventos de hipóxia (LEE; LAI; LIN; LIN *et al.*, 2013). Neurônios tratados com STI1 exógena submetidos a privação de oxigênio e glicose apresentaram diminuição significativa na morte celular de forma dependente a PrP<sup>c</sup> e ao receptor nicotínico  $\alpha 7$  (BERALDO; SOARES; GONCALVES; FAN *et al.*, 2013). Em um modelo de acidente vascular cerebral isquêmico, camundongos haploinsuficientes para STI1 com redução global de STI1 em 50% apresentaram fenótipos mais graves em comparação ao grupo controle, com diminuição na sobrevivência ao evento e maior área de infarto (BERALDO; SOARES; GONCALVES; FAN *et al.*, 2013). Esses dados demonstram um papel importante de STI1 na resiliência a eventos celulares adversos, principalmente relacionados a hipóxia.

#### 1.4 STI1 é relevante para a resposta ao estresse cardíaco

Apesar de já se saber que a STI1 é expressa no coração desde 2009, seu papel no contexto cardíaco ainda é desconhecido (HAJJ; SANTOS; COOK; MARTINS, 2009). Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a estudar o papel de STI1 no coração. Em um primeiro momento, identificamos que STI1 é expressa em corações humanos e que sua expressão se mostra reduzida em pacientes com insuficiência cardíaca (Figura 5-A). Também demonstramos que STI1 é expressa em cardiomiócitos ventriculares adultos de camundongos, sendo mais abundante próximo a membrana sarcoplasmática (Figura 5-B). Foi demonstrado também que ao submeter camundongos WT a estímulos patológicos, como ao tratamento com ISO (Figura 6-A) e pela oclusão do eixo ascendente da artéria aorta (TAC) (Figura 6-B), é observado um aumento na expressão de STI1 no coração (NOGUEIRA, 2020).

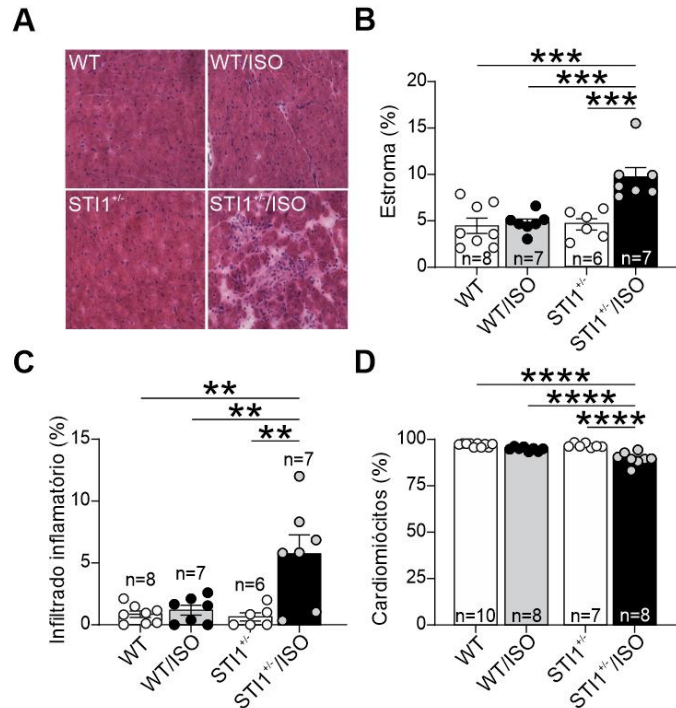


**Figura 5 – STI1 está presente em corações humanos e murinos.** A: Western Blot de amostras proteicas provenientes de corações humanos de pacientes com insuficiência cardíaca (IC) e controles (CT) para STI1 normalizados por GAPDH. B: Imunofluorescência para marcação de STI1,  $\alpha$ -actinina e DAPI em cardiomiócitos ventriculares adultos de camundongos WT (NOGUEIRA, 2020).  $*=p<0.05$

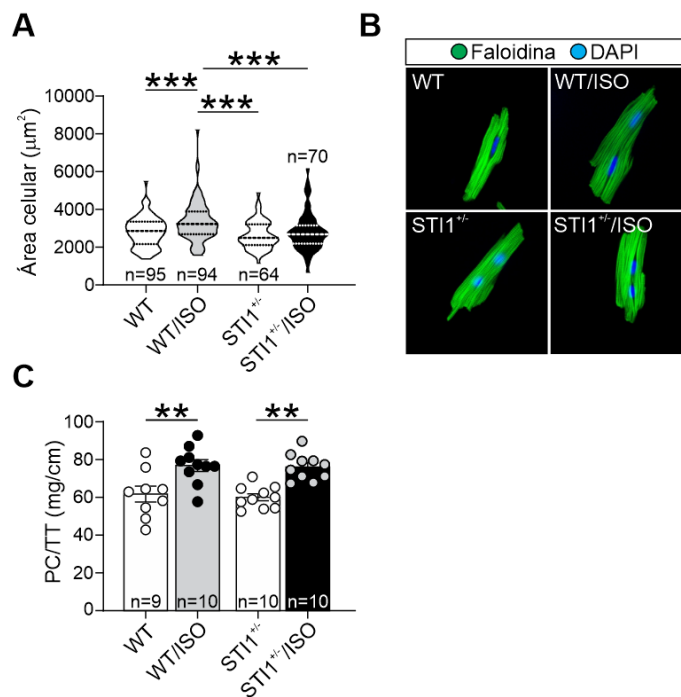


**Figura 6 – Estímulos patológicos induzem o aumento da expressão de STI1 no coração.** A: Western Blot de amostras proteicas provenientes de corações murinos para STI1 normalizados por GAPDH tratados com ISO. B: Western Blot de amostras proteicas provenientes de corações murinos para STI1 normalizados por GAPDH submetidos a oclusão do eixo ascendente da artéria aorta (TAC) (NOGUEIRA, 2020).  $*=p<0.05$

Nosso próximo passo foi demonstrar a relevância de STI1 no coração em resposta ao estímulo patológico gerado pelo tratamento com ISO. Demonstramos que os animais STI1<sup>+/-</sup> são mais susceptíveis a lesão cardíaca gerada pelo ISO, onde os mesmos apresentam maior porcentagem de estroma (Figura 7-B) e de infiltrado inflamatório (Figura 7-C) e menor porcentagem de cardiomiócitos em seu tecido (Figura 7-D) (NOGUEIRA, 2020). Interessantemente, observamos que os animais STI1<sup>+/-</sup> não apresentam um fenótipo clássico em resposta ao tratamento com ISO que é o aumento da área dos cardiomiócitos (Figura 8-A), apesar de haver aumento na relação peso corporal/tamanho da tíbia (Figura 8-C) (NOGUEIRA, 2020).



**Figura 7 – Camundongos STI1<sup>+/-</sup> são mais susceptíveis a lesão cardíaca gerada pelo ISO.** A: Imagem representativa de ensaio histológico em tecido cardíaco de camundongos WT e STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO ou salina. B: Representação gráfica da porcentagem de estroma no tecido cardíaco dos grupos. C: Representação gráfica da porcentagem de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco dos grupos. D: Representação gráfica da porcentagem de cardiomiócitos no tecido cardíaco dos grupos (NOGUEIRA, 2020). \*= $p < 0.05$



**Figura 8 – Camundongos STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO não apresentam hipertrofia em seus cardiomiócitos.** A: Representação gráfica da área celular de cardiomiócitos dos camundongos WT e STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO ou salina. B: Imagem representativa de imunofluorescência de cardiomiócitos dos camundongos WT e STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO ou salina marcados com anticorpo anti-faloidina e DAPI. C: Representação gráfica da relação peso do coração (PC) e tamanho da tíbia (TT) de corações dos camundongos WT e STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO ou salina (NOGUEIRA, 2020). \*= $p < 0.05$

Apesar desses resultados prévios demonstrarem que a proteína STI1 é relevante para a resposta do coração ao estresse adrenérgico, os mecanismos e vias celulares envolvidas nesse processo de resiliência cardíaca ao estresse adrenérgico dependente de STI1 ainda são desconhecidos.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar as vias de sinalização alteradas no coração de camundongos ST11<sup>+/-</sup> e selvagem (WT) em resposta ao tratamento com isoproterenol (ISO).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar alteração no perfil proteômico de camundongos ST11<sup>+/-</sup> e WT tratados com ISO por espectrometria de massa;
- Avaliar alteração em vias celulares de camundongos ST11<sup>+/-</sup> e WT tratados com ISO pela diferença no perfil de abundância de proteínas gerado na análise proteômica;
- Validar dados preditos pela proteômica de animais camundongos ST11<sup>+/-</sup> tratados com ISO por meio de técnicas de histologia, imunofluorescência e PCR em tempo real.

## 3 MÉTODOS

### 3.1 Animais

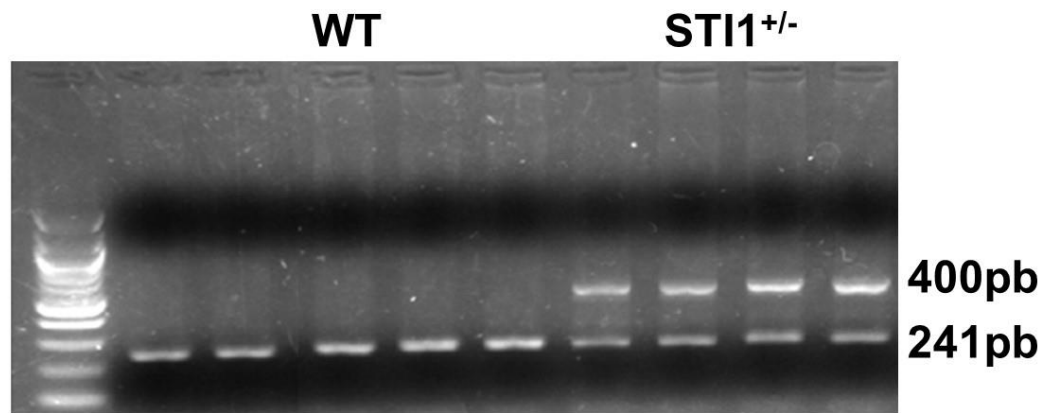
Foram utilizados camundongos machos de 8-12 semanas, selvagens (C57BL/6 WT) e STI1<sup>+/-</sup> (heterozigotos) mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG sob condições de temperatura e luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas. Ração para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada serão 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 de camundongos STI1<sup>+/-</sup>

Os camundongos geneticamente modificados dessa linhagem foram gerados a partir do background C57BL/6 em técnica de recombinação homologa por piggy BAC, sendo o silenciamento do gene *Stip1*, em um dos alelos, gerado por técnica Cre LoxP (BERALDO; SOARES; GONCALVES; FAN *et al.*, 2013).

### 3.2 Genotipagem dos animais

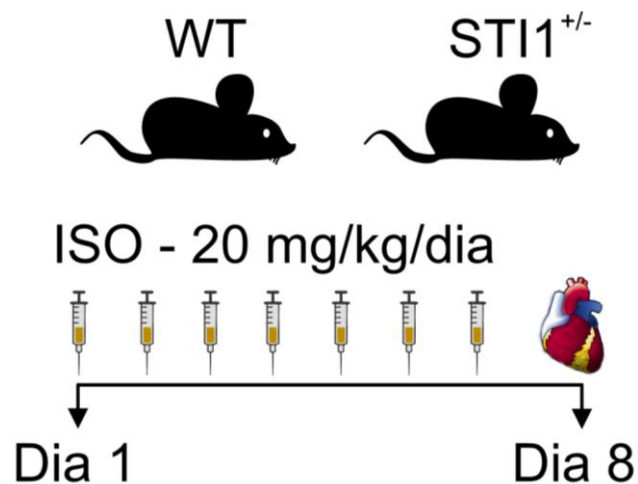
A genotipagem dos camundongos C57BL/6 WT e STI1<sup>+/-</sup> foi realizada a partir do DNA genômico extraído da cauda ou orelha dos animais. O procedimento padrão para a extração do DNA genômico foi realizado pela digestão do tecido com proteinase K e precipitação do DNA com isopropanol. A genotipagem foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de um termociclador, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para região mutada de *Stip1* (REV 5' TGGGGAGGACAGCACTGTT 3'; REV 5' CCAGAGGCCACTTGTGTAG 3') e para a identificação de animais WT (FWD 5' ATGTATCTGAGCATGCCTCTG 3'; REV 5' ATTGCCCTTCTCCTTTAGCTC 3'). Após separação em gel de agarose 1% em TAE 1x, a presença de uma banda de 241pb indica animal WT, enquanto uma banda de 400pb indica um animal transgênico heterozigoto STI1<sup>+/-</sup> (Figura 9).



**Figura 9** – Gel de agarose com amplicons de 400pb identificando animais STI1<sup>+/-</sup> e de 241pb identificando camundongos WT.

### 3.3 Tratamento com ISO

Afim de induzir os animais WT e STI1<sup>+/-</sup> a quebra da homeostasia celular e tecidual foi realizado um tratamento com a droga ISO na dose de 20mg/kg uma vez ao dia durante sete dias (Figura 10). Os grupos controles receberam apenas o veículo, solução salina.



**Figura 10** – Esquema de tratamento com ISO ou solução salina nos animais STI1<sup>+/-</sup> e WT com coleta dos corações no oitavo dia de experimento.

### 3.4 Medida do peso do coração

Foi utilizada a razão entre o peso do coração submerso em solução (mg) por comprimento da tibia (mm) ou peso corporal (mg) para avaliar o efeito do ISO nas dimensões do coração entre os grupos experimentais.

### 3.5 Análise proteômica

Afim de se entender as vias de sinalização proteica alteradas nos grupos, foi realizado uma análise proteômica do tipo “*Bottom up*”. Para isso, os corações dos camundongos WT e ST11<sup>+/-</sup> tratados com ISO foram coletados.

#### 3.5.1 Preparação das amostras

O tecido cardíaco recebeu um tampão de lise contendo: 6 mol / L de ureia, 2 mol / L de tiourea, 10 mmol / L de tris 2 carboxietil fosfina (TCEP), 40 mmol / L de cloroacetamida, 20 mmol / L de bicarbonato de trietilamônio (TEAB) e inibidor de protease (Roche). As amostras foram sonicadas em 2 ciclos de 20 s em gelo, afim de aumentar a lise celular e cortar filamentos de DNA. Após 2 h de incubação com o tampão de lise a 25°C, as amostras foram 10 vezes adicionando TEAB 20mM e posteriormente proteína de cada amostra foi quantificada por fluorescência usando o ensaio Qubit (Thermo). Aproximadamente 200 µg de proteína forma incubadas com 1 µg da enzima Lys-C (Wako) por 45 min a temperatura ambiente e posteriormente digeridas pela adição de tripsina modificada (Promega) na proporção enzima/proteína de 1:50. A digestão enzimática foi realizada por 18 h a 25°C, sendo a reação de tripsina finalizada por TFA 0,5% (v/v). Todo conteúdo foi então dessalinizado usando ziptip (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Dessa forma, as amostras foram concentradas em um *speedvac* e armazenadas a -20°C até o uso.

#### 3.5.2 Marcação como TMT-10plex

O kit TMT-10 plex (Thermo) foi usado para marcar 25 µg de proteína de cada amostra (KO, WT e pool) e combinadas de acordo com a seguinte tabela

GRUPO EXPERIMENTAL	TMT	TUBO
WT ISO-1	127N	1
KO ISO-1	128N	1

POOL-1	128C	1
WT ISO-2	129C	1
KO ISO-2	130C	1
POOL-2	131	1
WT ISO-3	127N	2
KO ISO-3	128N	2
POOL 3	128C	2
WT ISO-4	129C	2
KO SAL-4	130N	2
KO ISO-4	130C	2
POOL-4	131	2

### 3.5.3 Pre-fracionamento de peptídeos em High pH

As amostras foram ressuspensas em formiato de amônia 20mM (pH 10) e dessalinizadas em coluna Sep-pak SPE (Waters) previamente equilibrada em solução de formiato de amônia 20mM (pH 10). As colunas foram lavadas *on-column* 3 vezes com formiato de amônia 20mM e eluídas da coluna com solução de ACN 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%, 27,5%, 30%, 32,5%, 35%, 37%, 40%, 50%, 70% posteriormente coletadas e concatenadas em 8 frações, respeitando a combinação de cada tubo (tubo1=replicatas 1 e 2), (tubo2=replicatas 3 e 4). As amostras foram depois secas em speed vac e mantidas a -20°C.

### 3.5.4 Análise por espectrometria de massas

Cada tubo foi ressuspensado em solução de ácido fórmico 0.1% (solvente A) e carregado na pre coluna (3cmx100µm i.d) contendo resina Reprosil –Pur C18 –AQ (tamanho de partícula 5µm). Os peptídeos foram separados em coluna analítica (20cm x 75µm i.d) contendo resina Reprosil-Pur C18-AQ (tamanho de partícula 3µm) utilizando o seguinte gradiente, considerando o solvente B (0.1% ácido fórmico, ACN 95% (i) 3 min 1–3% solvente B, (ii) 45 min 3–28% solvente B, (iii) 10 min 28–45% solvente B, (iv) 3 min 45–100% solvente B, a fluxo constante de 0.25 µL/min usando HPLC EasyLC (Thermo) at 20 µl/min. Os peptídeos eluídos foram analisados no espectrômetro Q-Exactive HF (Thermo) que operou em polaridade positiva e no modo *data-dependent acquisition* (DDA). Os íons foram acumulados até  $3 \times 10^6$  ou 120 ms, e analisados em orbitrap com resolução de 120,000 a 200m/z. Os 20 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação HCD no quadrupolo (32% energia de colisão normalizada) e os fragmentos foram acumulados até  $1 \times 10^5$  íons ou

120 ms, e analisados no orbitrap (resolução 60,000 a 200m/z). Os íons selecionados foram incluídos em uma lista de exclusão dinâmica por 15s

### 3.5.5 Análise dos dados

Os picos de MS/MS foram processados usando o software MaxQuant (v.1.6.1.0) com motor de busca Andromeda contra o banco de dados *Mus musculus* UniProt - TrEMBL (Versão maio/2019) concatenado com bancos de dados de contaminantes reversos e comuns. A tripsina foi definida como enzima proteolítica permitindo até duas clivagens ausentes. O erro de massa foi definido em 20 ppm para íons precursores para a pesquisa no banco de dados de contaminantes e tolerância de massa de 4,5 ppm para a pesquisa principal. A tolerância ao erro de massa foi fixada em 0,02 Da para íons de fragmento. O tipo de quantificação foi definido como íon repórter MS2 com 10-plex TMT no N-terminal e lisina. A carbamidometilação de cisteína foi definida como modificação fixa, enquanto a oxidação da metionina e a acetilação do N terminal do peptídeo foram definidas como modificações variáveis. As taxas de descoberta de falso-positivo para proteína foram especificadas em 1%.

Todos os outros parâmetros foram definidos como valores padrão especificados por MaxQuant. O pacote DanteR foi usado para transformar abundâncias de proteínas em valores log<sub>2</sub>, para normalizar abundâncias log<sub>2</sub> com base em valores medianos, para identificar características reguladas por ANOVA unilateral (valor  $p < 0,05$ ) e gerar volcano-plot, box-plots, histogramas, QQ gráficos e análise de componentes principais (PCA). O software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen) foi usado para recuperar funções biológicas e canônicas. Foi utilizado as configurações padrão inserindo os seguintes descritores de limitação: espécies = mouse; tecido e linhas celulares = cardiomiócitos, coração, células primárias e células não especificadas de outra forma; experimental, valor de corte de  $p < 0,05$ . No STRING (<https://string-db.org/>), o nível e a confiança dos dados foi ajustado para 0,700, e as proteínas foram agrupadas pelo método MCL (Markov Cluster Algorithm) com um fator de inflação de 10. A função biológica baseada no GO (Gene Ontology) de cada cluster de interesse, os limites das redes foram relacionados à ação molecular e as interações analisadas foram baseadas na vizinhança, experimentos, banco de dados, coexpressão e mineração de dados.

## 3.6 Coleta do tecido cardíaco para histologia

O coração dos camundongos WT e ST11<sup>+/-</sup> tratados com ISO ou solução salina foi coletado após o período de tratamento. Antes da coleta, os corações foram perfundidos por solução salina com auxílio de uma seringa posicionada no ventrículo esquerdo, então os corações foram transferidos para placa de vidro contendo solução de KCl para que os corações possam ser fixados em diástole. Os corações foram fixados em OCT (Optimum Cutting Temperature) e armazenados a -20°C até serem feitas lâminas histológicas com cortes de 8 µm de espessura em criostato.

### **3.7 Análise de deposição de colágeno por coloração de tecido cardíaco com Picro Sirius Red**

Para avaliar a deposição de colágeno no tecido cardíaco dos camundongos WT e ST11<sup>+/-</sup> em resposta ao ISO, o coração dos grupos foi coletado após o período de tratamento e, em seguida, cortados e fixados em lâminas histológicas. As lâminas com tecido cardíaco foram incubadas em solução com o corante Picro Sirius Red por 45 minutos e em seguida incubadas com solução de HCl 0,01M por 2 minutos. Logo após, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e seladas com Etellan com lamínulas. Assim, as imagens foram capturadas em microscópio ótico.

### **3.8 Imunofluorescência**

Para avaliar a presença do fator nuclear eritroide 2 (NRF2) no tecido cardíaco de camundongos WT e ST11<sup>+/-</sup> tratados com ISO foi realizado um ensaio de imunofluorescência. As lâminas contendo o tecido cardíaco dos grupos foram fixadas com Paraformaldeído (PFA) a 4% por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1% e incubadas com BSA 3% diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 30 minutos. O WGA diluído em PBS (1:200) por 15 minutos protegido da luz para marcação da membrana sarcoplasmática e posteriormente foi adicionado o anticorpo para NRF2 diluído em BSA 1% (1:100). Em seguida as lâminas foram cobertas e armazenadas a 4°C protegidas da luz por 16 horas. Após esse período as lâminas foram ambientadas a temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas com BSA 1% três vezes e incubadas com anticorpo secundário (1:300) por 1 hora protegido da luz. Assim as lâminas foram lavadas três vezes com BSA 1% e incubadas com DAPI diluído em PBS (1:500) por 5 minutos protegido da luz para marcação de núcleos celulares. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas com BSA 1% três vezes e fixadas com glicerol a 60% para posicionamento das lamínulas. Dessa forma as lâminas foram levadas para microscópio

confocal para a retirada das fotos. A relação de intensidade da fluorescência das imagens foi obtida pelo programa Image J.

### 3.9 Avaliação da expressão de gênica por PCR em tempo real

O coração dos grupos foi coletado após o período de tratamento e o conteúdo de RNA foi extraído pelo método de Trizol sendo armazenado à -80°C. Em seguida, 2µg do RNA extraído foi submetido a uma reação em termociclador com DNAase por 30min a 37°C, seguida de outra reação contendo transcriptase reversa (Applied Biosystems) para a síntese do cDNA seguindo as especificações do fabricante. Dessa forma o cDNA foi levado para a PCR em tempo real com os primers específicos para o gene *Col3a1* (colágeno tipo 3) (*Col3a* FWD CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA; *Col3a* REV CCATAGCTGAACTGAAAACCACC). A expressão gênica foi avaliada pelo método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$  com análise da curva de melting e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rps26* (proteína ribossomal S26) (*Rps26* FWD CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT; *Rps26* REV CGATTCCTGACAACCTTGCTATG).

### 3.10 Estatística

Foi utilizado o teste Shapiro-Wilk afim de apurar a distribuição normal das amostras. Amostras com distribuição normal passaram por teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Em comparações entre apenas dois grupos foi utilizado teste T. Diferenças estatísticas só foram consideradas onde  $p < 0,05$ , sendo os valores de probabilidade gerados pelo GraphPrism.

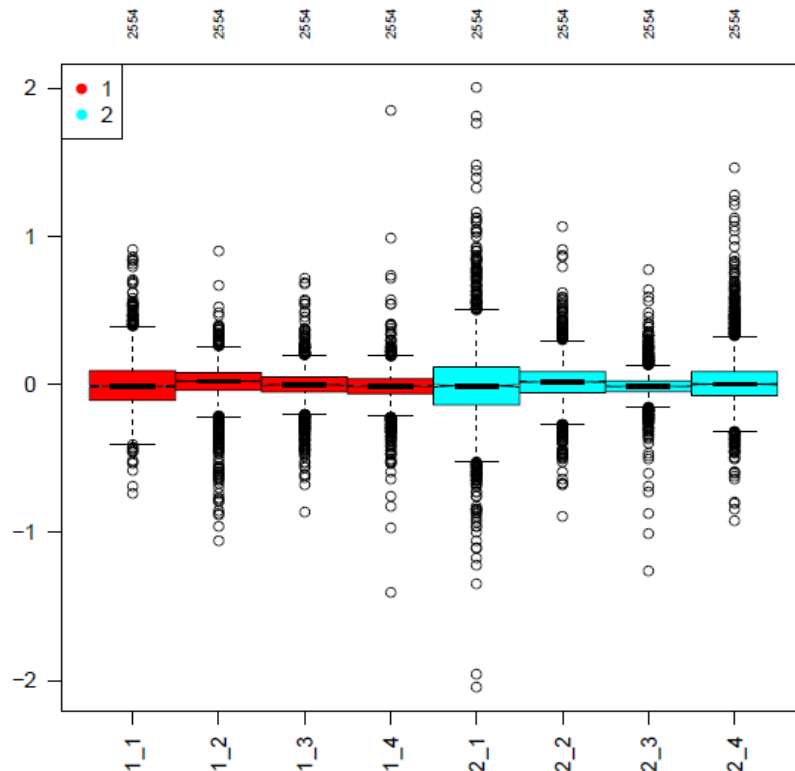


## 4 RESULTADOS

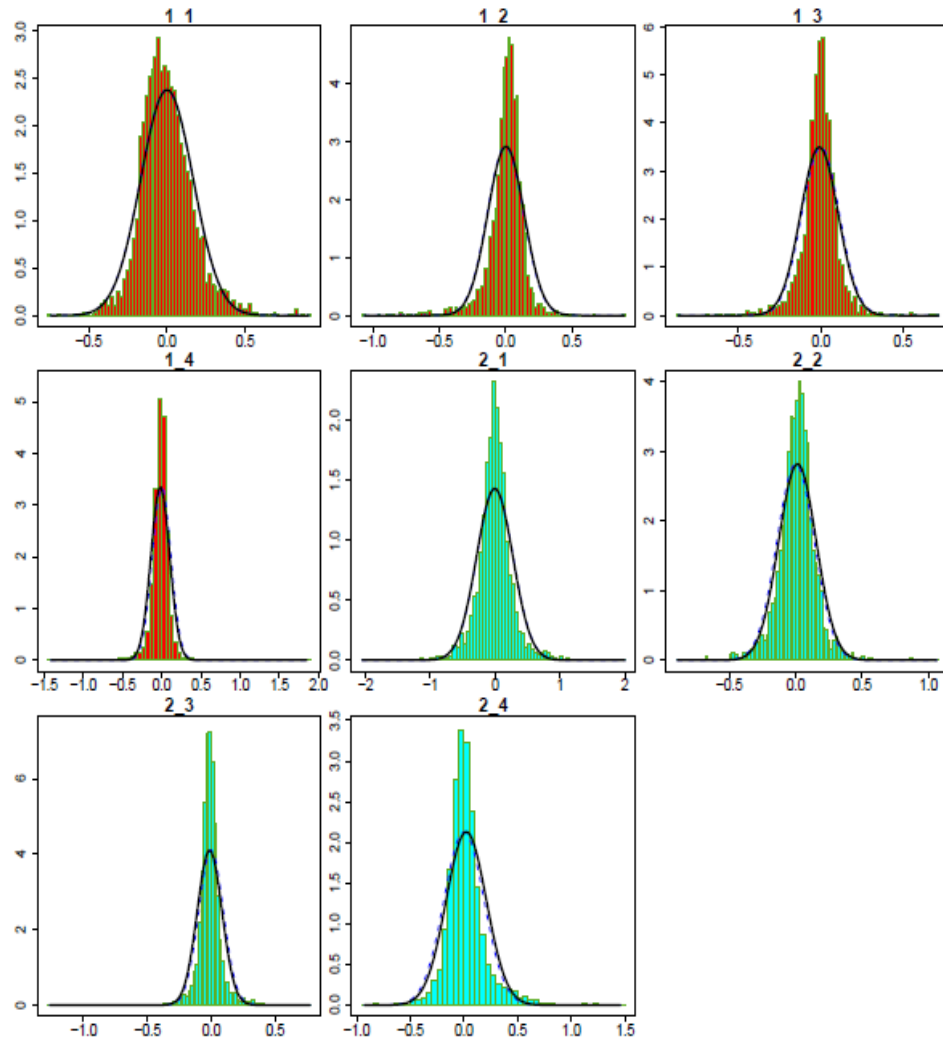
### 4.1 Ensaio proteômico revela alteração em diversas vias de toxicidade celular nos animais STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO

Apesar de resultados anteriores de nosso grupo demonstrarem a relevância de STI1 na resposta ao estresse adrenérgico no coração, os mecanismos e vias celulares envolvidas nesse processo ainda são desconhecidos. Dessa forma, submetemos o conteúdo proteico cardíaco de camundongos WT e STI1<sup>+/-</sup> tratados com ISO (WT/ISO; STI1<sup>+/-</sup>/ISO) a um ensaio de espectrometria de massas, a fim de desvendar as alterações proteômicas presentes nesse contexto de deficiência na expressão de STI1 durante um estresse adrenérgico.

Após a identificação das proteínas e obtenção dos valores de abundância relativa das mesmas, foi feita uma comparação desses valores entre os camundongos de mesmo grupo com o intuito de analisar se as amostras se comportam de forma similar (Figura 11). Em seguida foi realizada a análise de dispersão dos valores de abundância relativa em cada indivíduo de cada grupo, a fim de investigar se as amostras apresentam uma distribuição normal (Figura 12). Só assim foi possível realizar a estatística ANOVA entre os grupos e identificar as proteínas significativamente reguladas com valores de  $p < 0,05$ .



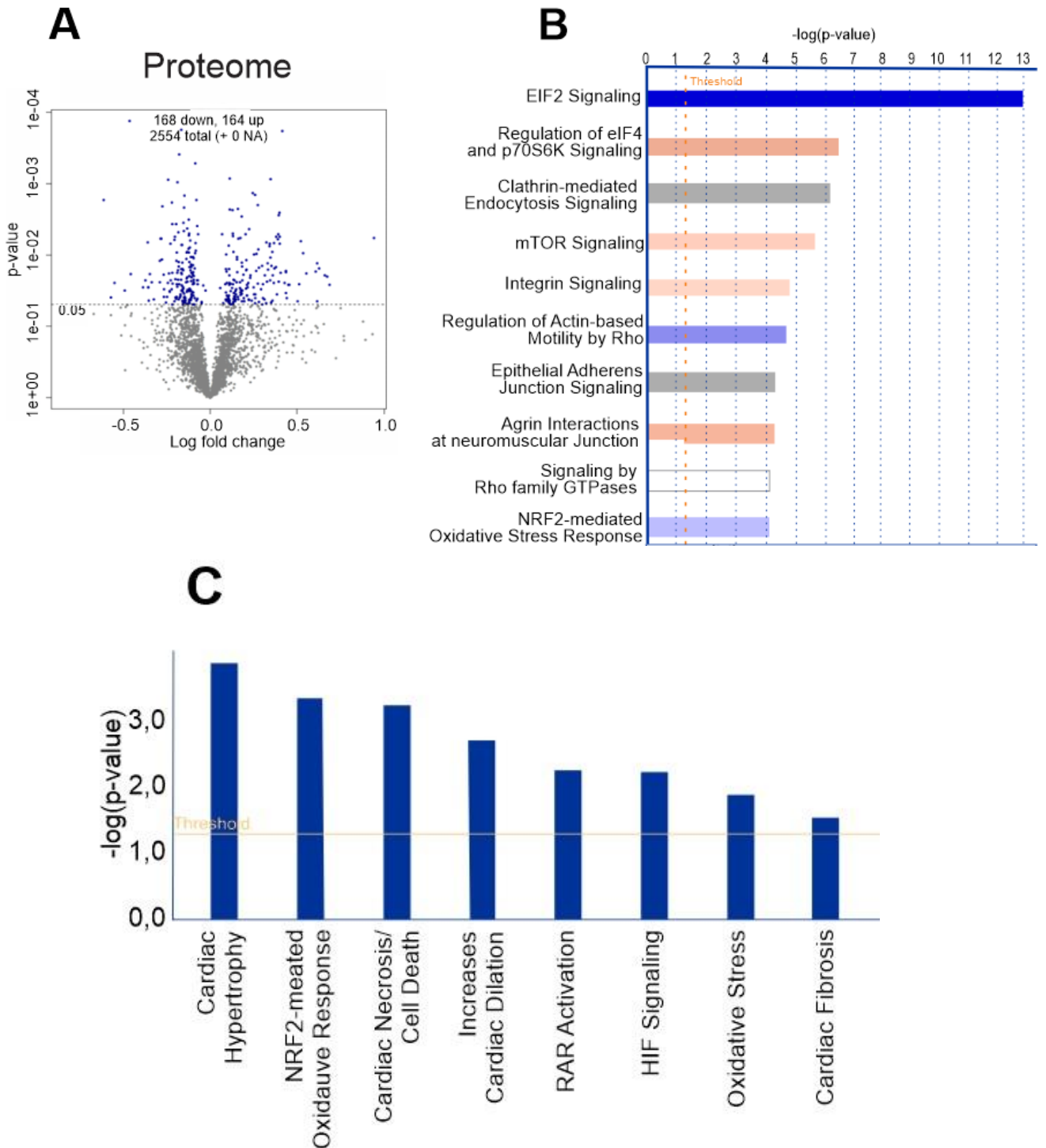
**Figura 11 – Valores de abundância relativa são similares entre os indivíduos de mesmo grupo.** Representação gráfica dos valores de abundancia relativa de cada indivíduo de cada grupo. ST11<sup>+/-</sup>/ISO (1) WT/ISO (2).



**Figura 12 – Dados de abundância relativa de cada indivíduo apresentam distribuição normal.** Representação gráfica da distribuição dos valores de abundancia relativa de cada indivíduo. ST11<sup>+/-</sup>/ISO (1) WT/ISO (2).

O ensaio proteômico teve o poder de identificar 2554 proteínas com 332 reguladas significativamente, sendo dessas 168 reguladas negativamente e 164 positivamente (Figura 13-A). Com isso, foi possível separar as proteínas reguladas em grupos relacionados a sua função e interação através da ontologia gênica do conteúdo amostral. Em seguida identificamos pelo software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) que os corações de camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO apresentam diversas alterações em vias celulares em comparação aos animais WT/ISO (Figura 13-B), que incluem alterações em proteínas que podem estar relacionadas à eventos de toxicidade celular, com destaque para hipertrofia cardíaca,

resposta ao estresse oxidativo pelo fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (NRF2), necrose cardíaca/ morte celular, cardiomiopatia dilatada e fibrose cardíaca (Figura 13-C).




**Figura 13 – Camundongos STI1<sup>+/</sup>/ISO apresentam alterações em diversas vias relacionadas a toxicidade celular.** A: Volcano plot da abundância relativa (eixo x) em relação ao p valor (eixo y) de camundongos STI1<sup>+/</sup>/ISO quando comparados ao grupo WT/ISO. B: Representação gráfica das vias reguladas (eixo y) positivamente

(Laranja), negativamente (Azul) sem predição (Cinza) e com pontuação de Z=0 (Branco) em relação ao p valor (eixo x). C: Representação gráfica de alterações em vias relacionadas a eventos celulares (eixo x) com seus valores de significância (eixo y) em camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO.

## 4.2 Camundongos STI1<sup>+/-</sup> apresentam deficiência na presença de NRF2 em resposta ao tratamento com ISO

O NRF2 é um fator de transcrição que é ativado em resposta ao estresse oxidativo. Sua ativação leva a síntese de diversos genes, que por sua vez irão atuar em processos como na resposta antioxidante ao estresse oxidativo, reparo e remoção de proteínas danificadas por espécies reativas de oxigênio via proteínas que respondem ao estresse e/ou ubiquitinação e degradação proteossômica (ZHAN; LI; ZHOU, 2021). Nossa análise de bioinformática pelo software IPA foi capaz de predizer uma inativação da via NRF2 nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO em comparação aos WT/ISO (Figura 13-B). Interessantemente, dentre as proteínas reguladas que serviram de base para a predição da inativação da via NRF2 se encontram alvos relacionados ao controle de qualidade proteica, com destaque para DNAJB4 (gene de HSP40) e para a própria STI1 (identificada pelo gene STIP1) (Tabela 1).

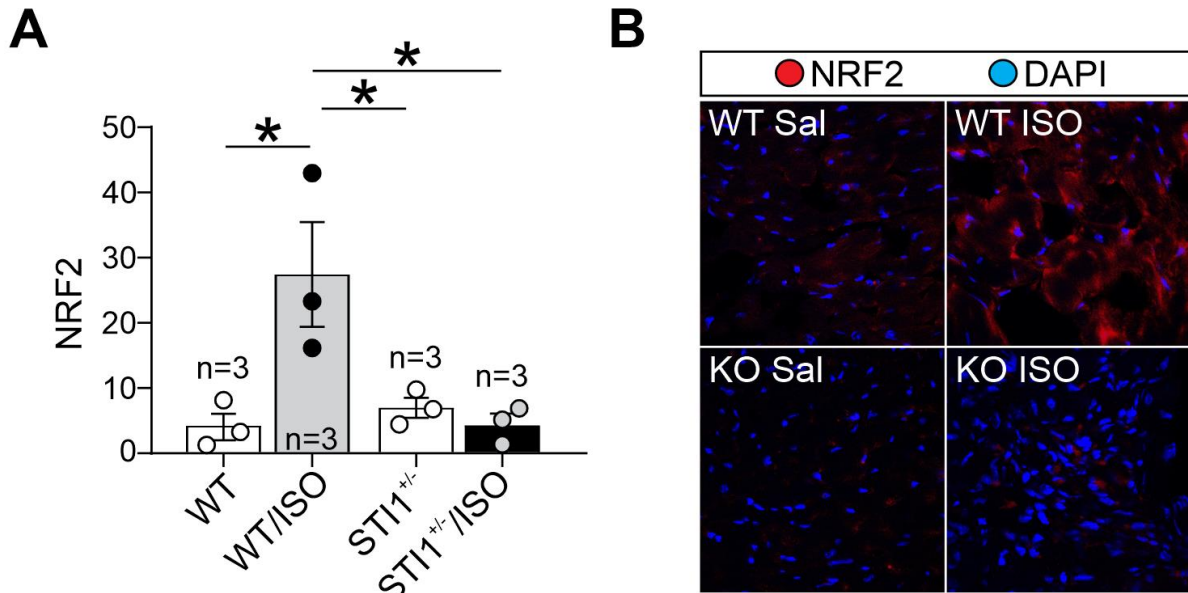
Proteínas alteradas na via NRF2		
Gene	Abund.relat.	p-valor
ACTA1	0.399222525	0.002547798
ACTA2	0.173700613	0.005728906
CCT7	-0.139484183	0.024344614
DNAJB4	-0.1184034	0.014883603
DNAJB11	0.23861335	0.043950544
MAP2K4	0.405368	0.017933345
MAPK1	-0.089508	0.040535278
RALB	0.298022925	0.014235918
STIP1	-0.46365925	0.000131357



**Tabela 1** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a via NRF2. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.

Afim de se entender melhor como se encontra o NRF2 nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO em comparação aos animais WT/ISO realizamos um ensaio de imunofluorescência para a identificação do NRF2 no tecido cardíaco (Figura 14). Identificamos que os animais WT apresentam aumento da presença de NRF2 em seu tecido cardíaco em resposta ao ISO, algo já esperado, uma vez que já se é sabido que o protocolo de tratamento com ISO utilizado gera

aumento de espécies reativas de oxigênio no coração. Interessantemente, os animais ST11<sup>+/-</sup> não apresentam esse aumento na expressão de NRF2 em resposta ao ISO. Sendo esse um dado que corrobora os achados de bioinformática que mostram uma inibição da via de NRF2 em camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO.



**Figura 14 – Camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO apresentam menor presença de NRF2 em seu tecido cardíaco comparado com WT/ISO.** A: Gráfico com a fluorescência relativa ao ensaio de imunomarcacão para NRF2. B: Imagens representativas. NRF2 em vermelho e DAPI em azul. n = número de animais. \*  $p < 0,05$ .

### 4.3 Camundongos ST11<sup>+/-</sup> apresentam maior presença de conteúdo fibrótico no coração em resposta ao tratamento com ISO

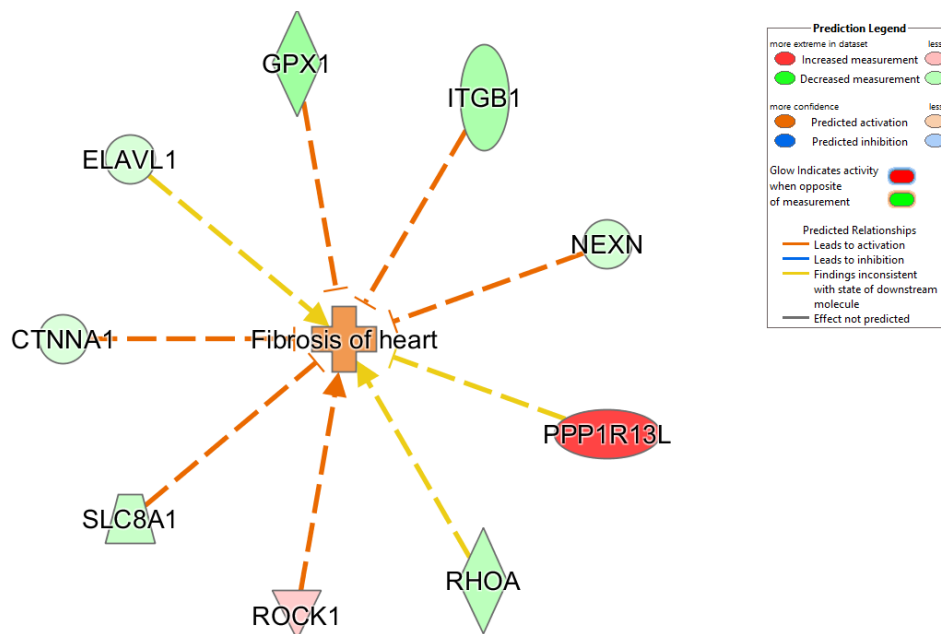
Nossa análise de bioinformática foi capaz de identificar alterações em diversas proteínas relacionadas a fibrose cardíaca entre os camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO e WT/ISO (Tabela 2). Interessantemente, ao avaliar o perfil de abundância dessas proteínas o software IPA indicou a possível ocorrência de fibrose cardíaca no grupo ST11<sup>+/-</sup>/ISO (Figura 15). A proteína ROCK1, um dos alvos relacionados a fibrose cardíaca regulados positivamente em camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO, é uma quinase que é pertencente a via da família das GTPases Rho, sendo relacionada a eventos que levam a fibrose cardíaca, como migração celular, inflamação e estresse oxidativo (YU; SLADOJEVIC; BLAIR; LIAO, 2020).

Outro alvo que contribuiu para a predição da fibrose cardíaca nos camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO foi a regulação negativa do trocador de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> NCX (SLC8A1), em vista que já é descrito na literatura a indução de fibrose cardíaca em contexto de diminuição da expressão do NCX (LOTTEAU; ZHANG; HAZAN; GRABAR *et al.*, 2021).

Proteínas alteradas relacionadas a fibrose cardíaca		
Gene	Abund.rel.	p-valor
RHOA	-0.164067925	0.02683844
NEXN	-0.110931135	0.042758628
ITGB1	-0.203452488	0.005496553
GPX1	-0.23383195	0.031976928
ELAVL1	-0.095477023	0.022380902
CTNNA1	-0.086452843	0.009410521
SLC8A1	-0.135335203	0.009246857
ROCK1	0.1715198	0.024252125
Q5I1X5	0.626203	0.015550941

Reguladas ↓  
 Reguladas ↑

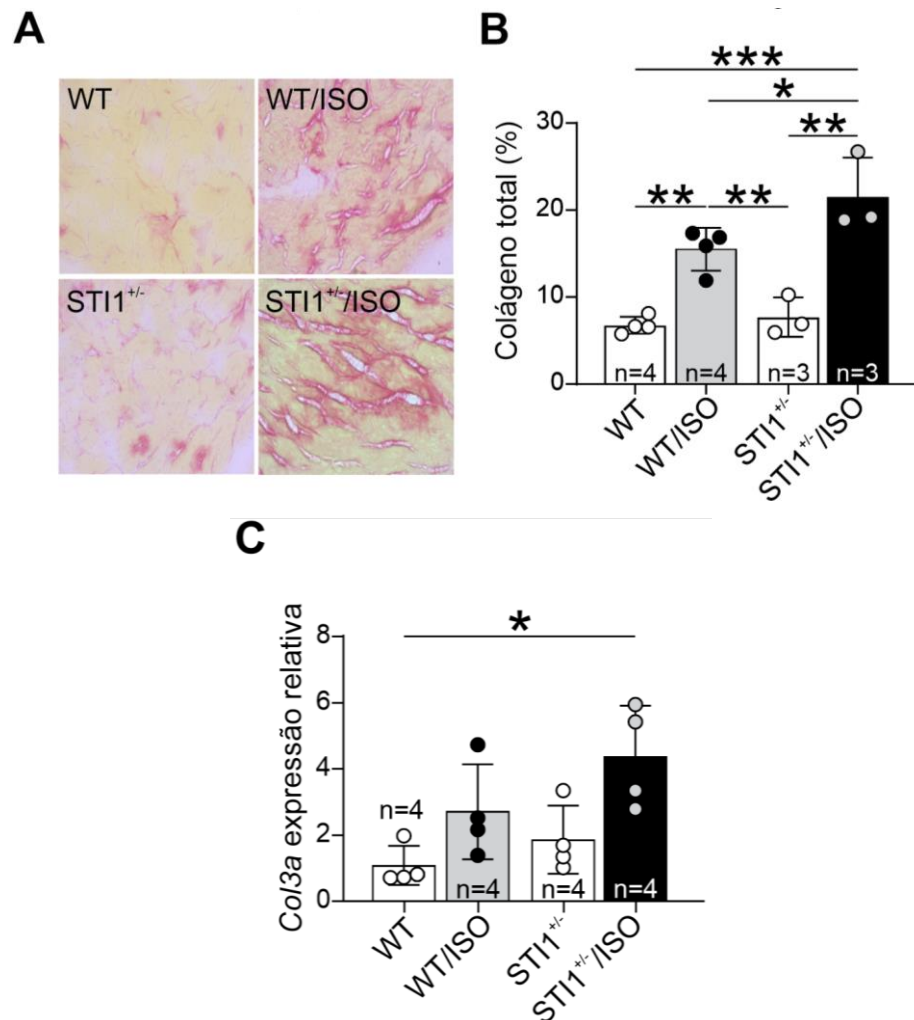
**Tabela 2** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a fibrose cardíaca. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.



**Figura 15** – Camundongos ST11<sup>+/+</sup>/ISO apresentam alterações em alvos proteicos que levam a predição do acometimento de fibrose cardíaca. Alvos proteicos alterados que levam a predição da fibrose cardíaca. Alvos com coloração verde se encontram regulados negativamente, alvos corados de vermelho se encontram regulados positivamente. Setas com ponta significam que a regulação positiva do alvo leva a ativação da fibrose cardíaca, já as setas sem ponta significam que a regulação positiva da proteína-alvo leva a sua inativação. Setas coradas de laranja indicam que a regulação do alvo leva a ativação do evento de fibrose cardíaca, já as setas coradas em

amarelo significam que a regulação do alvo é inconsistente com a predição de ativação do evento de fibrose cardíaca.

Afim de validar a predição de ativação da fibrose cardíaca nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO realizamos um ensaio histológico em tecido cardíaco com o corante Picro Sirius Red que cora o colágeno tecidual em vermelho (Figura 16-A e B). Dessa forma, identificamos que os camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam uma deposição de colágeno significativamente maior em relação aos controles, camundongos WT/ISO. Também avaliamos a expressão de colágeno do tipo 3 em amostra cardíaca dos grupos pela análise de expressão genica (Figura 16-C), onde identificamos uma maior expressão no grupo STI1<sup>+/-</sup>/ISO comparado ao controle WT, algo que não ocorre com os camundongos WT/ISO.



**Figura 16 – Camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam maior deposição e expressão de colágeno em seu tecido cardíaco comparado com WT/ISO.** A: Imagem representativa de ensaio histológico com coloração de colágeno em vermelho por Picro Sirius Red. B: Representação gráfica da deposição de colágeno (em porcentagem) entre os grupos. C: Representação gráfica da expressão de colágeno 3 entre os grupos. n = número de animais. \* =  $p < 0,05$ .



#### 4.4 Camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO apresentam alteração em proteínas relacionadas a morte celular e necrose

Identificamos diversas proteínas significativamente reguladas relacionadas a morte celular e necrose nos corações de camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO em relação ao WT/ISO (Tabela 3). Apesar de nossa análise bioinformática predizer uma ligeira redução na morte celular o evento de necrose se apresenta mais ativo de forma mais significativa (Figura 17). A proteína glutationa peroxidase 1 (gene: GPX1) apresentou a maior regulação negativa dentre os alvos relacionados a necrose e morte celular. Sua função está relacionada ao combate a espécies reativas de oxigênio pela eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água, de forma que sua regulação positiva no infarto do miocárdio é descrita como um melhor prognóstico ao insulto com inibição de apoptose (YANG; CHEN; ZHAO; MENG, 2014). A proteína mais regulada positivamente dentre as relacionadas a necrose e morte celular é a EGLN1, que é conhecida por induzir a hidroxilação de sítios prolina de HIF-1 $\alpha$  que por sua vez é levado para a degradação proteassomal por ubiquitinação (BISHOP; RATCLIFFE, 2015).

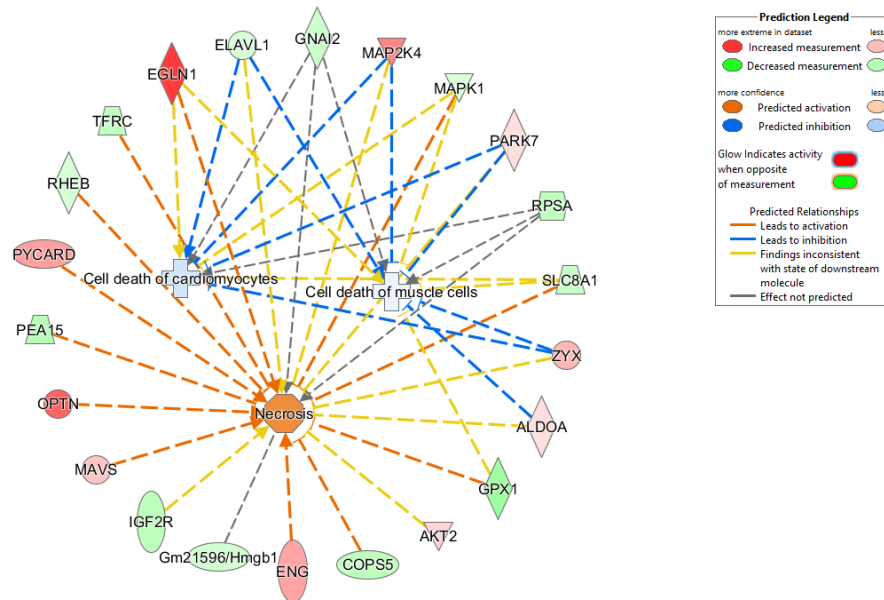
Proteínas alteradas relacionadas a necrose e morte celular		
Gene	Abund.rel.	p-valor
ELAVL1	-0.095477023	0.022380902
GNAI2	-0.125133925	0.008226062
MAP2K4	0.405368	0.017933345
MAPK1	-0.089508	0.040535278
PARK7	0.109905445	0.026367885
RPSA	-0.155525675	0.02844103
SLC8A1	-0.135335203	0.009246857
ZYX	0.244793775	0.001355442
ALDOA	0.106754115	0.04082721
GPX1	-0.23383195	0.031976928
AKT2	0.138876225	0.022738356
COPS5	-0.161153125	0.007197541
ENG	0.30391562	0.040644297
IGF2R	-0.159058325	0.044123381
MAVS	0.1935722	0.040033406
OPTN	0.5215173	0.006414758
PEA15	-0.170731475	0.035595627
PYCARD	0.32233745	0.0067321
RHEB	-0.10010875	0.019085898

 Reguladas ↓  
 Reguladas ↑



TFRC	-0.14987587	0.035241447
EGLN1	0.659335175	0.019373606

**Tabela 3** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a necrose e morte celular. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.



**Figura 17** – Camundongos  $ST11^{+/-}/ISO$  apresentam alterações em alvos proteicos que levam a predição da ocorrência de necrose. Alvos proteicos alterados que levam a predição de necrose. Alvos com coloração verde se encontram regulados negativamente, alvos corados de vermelho se encontram regulados positivamente. Setas com ponta significam que a regulação positiva do alvo leva a ativação do evento, já as setas sem ponta significam que a regulação positiva do alvo leva a inativação do evento. Setas coradas de laranja significam que a regulação do alvo leva a ativação do evento, setas coradas em azul demonstram que a regulação do alvo leva a inativação do evento, setas coradas em cinza revelam que a regulação do alvo não gerou impacto na conclusão da resolução do evento, já as setas coradas em amarelo significam que a regulação do alvo é inconsistente com a predição do evento.

#### 4.5 Camundongos $ST11^{+/-}/ISO$ apresentam alteração em proteínas relacionadas a cardiomiopatia dilatada e hipertrofia cardíaca

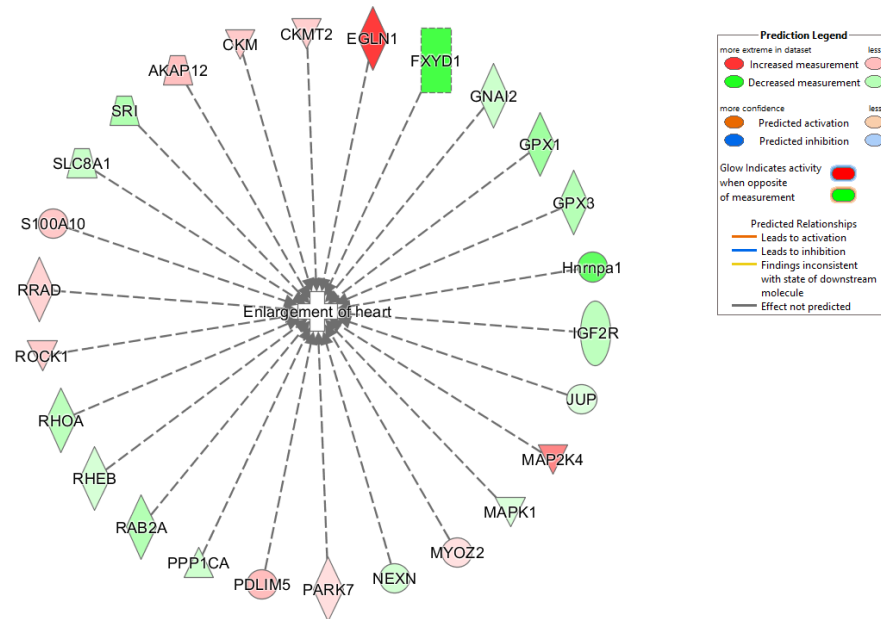
A proteômica foi capaz de identificar uma serie alterações em proteínas relacionadas a cardiomiopatia dilatada no coração de camundongos  $ST11^{+/-}/ISO$  em relação aos  $WT/ISO$  (Tabela 4). Apesar de se ter encontrado 26 proteínas reguladas significativamente relacionadas a cardiomiopatia dilatada o IPA não foi capaz de prever a ativação ou inibição do evento (Figura 18). A proteína mais regulada positivamente desse cluster foi a EGLN1, já descrita anteriormente como inibidora da ação de HIF (BISHOP; RATCLIFFE, 2015). Encontramos como a proteína mais regulada negativamente a fosfoleman

( FXYD1), sua função está relacionada na manutenção da homeostasia celular dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  modulando canais iônicos como o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX e a bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (CHEUNG; ZHANG; SONG; GAO *et al.*, 2010). Interessantemente, é descrito na literatura que a fosfoleman atenua os riscos de arritmogênese no coração submetido ao estresse adrenérgico, de forma a reduzir a sobrecarga de  $\text{Na}^+$  (CHEUNG; ZHANG; SONG; GAO *et al.*, 2010).

Proteínas alteradas relacionadas a cardiomiopatia dilatada		
Gene	Abund.rel.	p-valor
EGLN1	0.659335175	0.019373606
FXYD1	-0.45694163	0.018601884
GNAI2	-0.125133925	0.008226062
GPX1	-0.23383195	0.031976928
GPX3	-0.1781234	0.000391598
HNRNPA1	-0.386328968	0.028702246
IGF2R	-0.159058325	0.044123381
JUP	-0.075038823	0.003951127
MAP2K4	0.405368	0.017933345
MAPK1	-0.089508	0.040535278
MYOZ2	0.1038745	0.045990604
NEXN	-0.110931135	0.042758628
PARK7	0.109905445	0.026367885
PDLIM5	0.221283475	0.042249539
PPP1CA	-0.120187115	0.019648589
RAB2A	-0.183078763	0.004810511
RHEB	-0.10010875	0.019085898
RHOA	-0.164067925	0.02683844
ROCK1	0.1715198	0.024252125
RRAD	0.147621173	0.035696674
S100A10	0.18503735	0.022598223
SLC8A1	-0.135335203	0.009246857
SRI	-0.193347675	0.03892009
AKAP12	0.211779273	0.036786669
CKM	0.175542525	0.031041783
CKMT2	0.161930223	0.042121763

Reguladas ↓  
Reguladas ↑

**Tabela 4** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a cardiomiopatia dilatada. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.



**Figura 18 – Camundongos ST1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam alterações em alvos proteicos relacionados a cardiomiopatia dilatada.** Alvos com coloração verde se encontram regulados negativamente, alvos corados de vermelho se encontram regulados positivamente. Setas com ponta significam que a regulação positiva do alvo leva a ativação do evento, já as setas sem ponta significam que a regulação positiva do alvo conduz a inativação do evento. Setas coradas de laranja significam que a regulação do alvo leva a ativação do evento do evento, setas coradas em azul demonstram que a regulação do alvo leva a inativação do evento, setas coradas em cinza revelam que a regulação do alvo não gerou impacto na conclusão da resolução do evento, já as setas coradas em amarelo significam que a regulação do alvo é inconsistente com a predição do evento.

As alterações em proteínas relacionadas a hipertrofia cardíaca foram as mais significativas na análise pelo software IPA (Figura 13-C). Foram encontradas 17 proteínas alteradas relacionadas a hipertrofia cardíaca, com destaque para a EglN1 como mais regulada para cima e a fosfoleman (gene: FXYD1) como mais regulada para baixo (Tabela 5).

Proteínas alteradas relacionadas a hipertrofia cardíaca		
Gene	Abund.rel.	p-valor
EGLN1	0.659335175	0.019373606
GNAI2	-0.125133925	0.008226062
MAP2K4	0.405368	0.017933345
MAPK1	-0.089508	0.040535278
PARK7	0.109905445	0.026367885
SLC8A1	-0.135335203	0.009246857
CKM	0.175542525	0.031041783
CKMT2	0.161930223	0.042121763
FXYD1	-0.45694163	0.018601884

Reguladas ↓  
Reguladas ↑

GPX3	-0.1781234	0.000391598
MYOZ2	0.1038745	0.045990604
RAB2A	-0.183078763	0.004810511
RHEB	-0.10010875	0.019085898
RHOA	-0.164067925	0.02683844
ROCK1	0.1715198	0.024252125
RRAD	0.147621173	0.035696674
S100A10	0.18503735	0.022598223

**Tabela 5** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a hipertrofia cardíaca. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.

#### 4.6 Camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam redução em proteínas relacionadas ao controle proteico

Interessantemente encontramos diversas proteínas relacionadas ao controle proteico, reguladas negativamente, nos animais STI1<sup>+/-</sup>/ISO. Tais proteínas estão relacionadas a biossíntese de RNAt (Tabela 6), a degradação proteica via proteassoma (Tabela7), aos ribossomos (Tabela 8) e a síntese proteica ativada pela via mTOR (Tabela 9).

Proteínas alteradas relacionadas a biossíntese de RNAt		
Gene	Abund.relat.	p-valor
DARS1	-0.130357505	0.030977911
HARS2	-0.1461385	0.039013491
LARS2	-0.178171365	0.02576379


  
 Reguladas ↓  
 Reguladas ↑



**Tabela 6** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a biossíntese de RNAt. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.

Proteínas alteradas relacionadas a proteassoma		
Gene	Abund.relat.	p-valor
PRS10	-0.03992641	0.026684168
PSMD11	-0.120161873	0.032064202
PSMD13	-0.154560525	0.003539941
PSMD7	-0.21783015	0.017876521


  
 Reguladas ↓  
 Reguladas ↑

**Tabela 7** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação ao proteossoma. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.

<b>Proteínas ribossomais alteradas</b>		
<b>Gene</b>	<b>Abund.rel.</b>	<b>p-valor</b>
MRPL21	-0.122241748	0.009165647
MRPL23	-0.15116595	0.004648453
MRPL4	-0.070771325	0.022865906
RPL13a	-0.163985635	0.018387987
RPL18a	-0.180592225	0.012611353
RPL23	-0.1509415	0.039220729
RPL23a	-0.097708475	0.017458085
RPL26	-0.100882875	0.025787536
RPL27a	-0.189352713	0.017857116
RPL35a	-0.205177158	0.044256467
RPL4	-0.28069875	0.005937209
RPL7a	-0.142515575	0.039955702
RPLP2	-0.185595418	0.016305128
RPS18	-0.122463	0.005318609
RPS2	-0.118774773	0.042035262
RPS3	-0.20024725	0.021736374
RPS8	-0.13224017	0.009005886
RPSA	-0.155525675	0.02844103

 Reguladas ↓  
 Reguladas ↑

**Tabela 8** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) ribossomais alteradas. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.

<b>Proteínas alteradas relacionadas a via mTOR</b>		
<b>Gene</b>	<b>Abund.rel.</b>	<b>p-valor</b>
EIF4E	-0.11991904	0.012590419
LAMTOR2	-0.324201	0.041807116
ERK2	-0.089508	0.040535278
RHEB	-0.10010875	0.019085898
RHOA	-0.164067925	0.02683844

 Reguladas ↓  
 Reguladas ↑

**Tabela 9** – Tabela com proteínas (identificadas por seus genes) alteradas com relação a síntese proteica ativada pela via mTOR. Alvos identificados com a cor azul se encontram regulados para baixo e vermelho regulados para cima. Na segunda coluna se encontram os valores de abundância relativa e na terceira o p-valor de cada alvo.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho mostram que as alterações encontradas no coração dos camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO vão muito mais além que os fenótipos patológicos encontrados em experimentos prévios de nosso grupo. Demonstramos que a redução na expressão de ST11, em um contexto de estresse adrenérgico, gera alterações no perfil de expressão de diversos alvos proteicos no coração que levam a ativação de eventos patológicos.

Um ponto importante a ser destacado é que a predição global de alterações em vias relacionadas a eventos celulares nos camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO apontou para a ocorrência do fenótipo de disfunção cardíaca, ponto este que encaixa diretamente com os dados experimentais obtidos previamente no nosso laboratório. Nós já sabíamos que os camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO apresentavam aumento na porcentagem de conteúdo estroma, células inflamatórias e diminuição na porcentagem de cardiomiócitos em seu tecido cardíaco. Alinhado a este resultado, nossos dados de proteômica e análise bioinformática mostraram alterações na abundância em proteínas que levam a ativação do evento de necrose e fibrose cardíaca em camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO. A regulação positiva de alvos relacionados ao remodelamento cardíaco nos camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO, como é o caso das proteínas ROCK1 e EglN1, nos leva a hipotetizar que durante o tratamento com ISO ocorreu uma adaptação insuficiente do coração em resposta ao estresse adrenérgico, gerando o fenótipo patológico mais grave nesses animais. Com relação a validação desse fenótipo mais grave acrescentamos a informação que os animais ST11<sup>+/-</sup>/ISO apresentam maior conteúdo e expressão de colágeno em seu tecido cardíaco.

Nossos dados indicam que os camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO possivelmente apresentam um prejuízo no controle de ROS em comparação aos WT/ISO. Um dos fatores que nos conduz a esta conclusão é o fato de que o tratamento com ISO é um indutor do estresse oxidativo no tecido cardíaco. Ainda nesta linha, camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO apresentam a regulação negativa da proteína glutathiona peroxidase 1 (gene: GPX1) e a inibição da via NRF2, dois importantes caminhos moleculares de resposta ao estresse oxidativo.

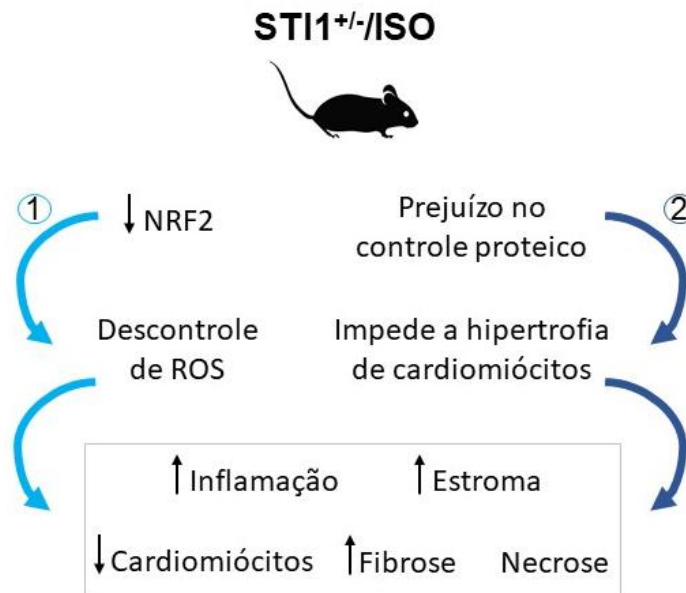
Apesar do grupamento de proteínas relacionadas a hipertrofia cardíaca apresentarem o maior valor estatístico de alteração entre os camundongos ST11<sup>+/-</sup>/ISO comparados com WT/ISO, não foi possível identificar se as alterações poderiam gerar uma ativação ou inibição do evento hipertrófico. Interessantemente, dados prévios de nosso grupo mostram que os camundongos ST11<sup>+/-</sup> não hipertrofiaram seus cardiomiócitos em respostas ao tratamento com ISO. Levando em consideração que o aumento da área de cardiomiócitos é

um evento clássico do tratamento com ISO, que depende da síntese proteica, nos perguntamos, como e em qual via a deficiência de STI1 poderia impactar o acometimento da hipertrofia adaptativa em resposta ao estresse adrenérgico? Em parte, os dados de proteômica responderam esta pergunta. É importante salientar que já é sabido que cardiomiócitos adultos apresentam uma menor taxa de síntese proteica ao se comparar a seus estágios embrionários e pós natais (CHORGHAE; SEIMETZ; EMMONS; YANG *et al.*, 2017). No entanto, em resposta a estímulo hipertrófico, como é o caso do tratamento com ISO, os cardiomiócitos aumentam sua taxa expressão proteica em um processo denominado síntese proteica *de novo* (CHORGHAE; SEIMETZ; EMMONS; YANG *et al.*, 2017). Chorghade e colaboradores demonstraram que esse aumento na taxa de síntese proteica é fundamental para o aumento da área dos cardiomiócitos em resposta ao ISO, de forma que o mecanismo envolvido na indução do aumento da expressão proteica aparenta ser dependente do fator de iniciação da tradução eucariótica 4 G (eIF4G) (CHORGHAE; SEIMETZ; EMMONS; YANG *et al.*, 2017). Interessantemente, em nosso ensaio proteômico identificamos uma série de proteínas relacionadas síntese proteica reguladas negativamente nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO, com é o caso de proteínas relacionadas a biossíntese de RNAt e proteínas ribossomais. Também identificamos proteínas reguladas negativamente relacionadas a indução de síntese proteica pela via mTOR, com destaque para LAMTOR2, um importante fator que ativa a via mTORC1, e para o eIF4E, um downstream da via mTORC1 responsável pela ativação de eIF4G. Levando em consideração que a STI1 já é descrita por ativar a síntese proteica pela via mTOR em neurônios (ROFFÉ; BERALDO; BESTER; NUNZIANTE *et al.*, 2010), é possível que os camundongos STI1<sup>+/-</sup> apresentem prejuízo na indução da hipertrofia adaptativa em resposta ao ISO por apresentarem falha na ativação da maquinaria de síntese proteica.

Nosso trabalho foi capaz de identificar possíveis caminhos pelos quais levam aos fenótipos patológicos cardíacos encontrados nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO. Além de demonstrarmos que os camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam maior porcentagem e expressão de colágeno em seu tecido cardíaco, também identificamos que as alterações na abundância relativa de certos alvos proteicos levam a predição de eventos de necrose e fibrose cardíaca.

Nossos dados sugerem que os camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentem esses fenótipos devido dois fatores. O primeiro se dá pela inibição da via NRF2 em um contexto de tratamento com ISO, é possível que a deficiência de STI1 leve a um prejuízo no controle de ROS no coração, gerando os eventos de necrose e fibrose cardíaca (Figura 19-1). Como segundo fator temos que é possível que os fenótipos patológicos nos camundongos STI1<sup>+/-</sup>

/ISO se deem pelo não acometimento da hipertrofia adaptativa dos cardiomiócitos em resposta ao estresse adrenérgico (Figura 19-2). Sendo que demonstramos que o abalamento na maquinaria de síntese proteica pode ser o motivo pelo prejuízo na hipertrofia (Figura 19-2).



**Figura 19 – Camundongos STI1<sup>+/-</sup>/ISO apresentam seus fenótipos patológicos por possuírem um possível descontrole de ROS e prejuízo no controle proteico.** 1: Inibição da via NRF2 leva a um descontrole de ROS gerando os fenótipos patológicos. 2: Prejuízo no controle proteico impede a hipertrofia adaptativa de cardiomiócitos gerando os fenótipos patológicos.

Demonstramos então a relevância de STI1 para o contexto de estresse cardíaco, de forma que indicamos a necessidade de experimentos mais robustos para a validação do papel de STI1 na indução da síntese proteica *de novo* e no controle de ROS. Destacamos que futuros estudos do papel da STI1 em resposta a outros contextos de estresse cardíaco, como em modelos de insuficiência cardíaca, apresentaram o potencial para a descoberta e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças cardíacas.



## REFERÊNCIAS

BAKER, A. J. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. **Pflugers Arch**, 466, n. 6, p. 1139-1150, Jun 2014.

BARTHA, E.; SOLTI, I.; SZABO, A.; OLAH, G. *et al.* Regulation of kinase cascade activation and heat shock protein expression by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in doxorubicin-induced heart failure. **J Cardiovasc Pharmacol**, 58, n. 4, p. 380-391, Oct 2011.

BERALDO, F. H.; ARANTES, C. P.; SANTOS, T. G.; QUEIROZ, N. G. *et al.* Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. **J Biol Chem**, 285, n. 47, p. 36542-36550, Nov 2010.

BERALDO, F. H.; SOARES, I. N.; GONCALVES, D. F.; FAN, J. *et al.* Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB J**, 27, n. 9, p. 3594-3607, Sep 2013.

BERNARDO, B. C.; WEEKS, K. L.; PATTERSON, N. L.; MCMULLEN, J. R. HSP70: therapeutic potential in acute and chronic cardiac disease settings. **Future Med Chem**, 8, n. 18, p. 2177-2183, 12 2016.

BISHOP, T.; RATCLIFFE, P. J. HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. **Circ Res**, 117, n. 1, p. 65-79, Jun 19 2015.

CHEUNG, J. Y.; ZHANG, X. Q.; SONG, J.; GAO, E. *et al.* Phospholemman: a novel cardiac stress protein. **Clin Transl Sci**, 3, n. 4, p. 189-196, Aug 2010.

CHIARINI, L. B.; FREITAS, A. R.; ZANATA, S. M.; BRENTANI, R. R. *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J**, 21, n. 13, p. 3317-3326, Jul 2002.

CHORGHADE, S.; SEIMETZ, J.; EMMONS, R.; YANG, J. *et al.* Poly(A) tail length regulates PABPC1 expression to tune translation in the heart. **Elife**, 6, 06 27 2017.

DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, 390, n. 6655, p. 88-91, Nov 1997.

DATTA, R.; BANSAL, T.; RANA, S.; DATTA, K. *et al.* Myocyte-Derived Hsp90 Modulates Collagen Upregulation via Biphasic Activation of STAT-3 in Fibroblasts during Cardiac Hypertrophy. **Mol Cell Biol**, 37, n. 6, 03 2017.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Lett**, 581, n. 19, p. 3702-3710, Jul 2007.

DE JONG, P. R.; SCHADENBERG, A. W.; JANSEN, N. J.; PRAKKEN, B. J. Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects. **Cell Stress Chaperones**, 14, n. 2, p. 117-131, Mar 2009.

DEMAND, J.; ALBERTI, S.; PATTERSON, C.; HÖHFELD, J. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. **Curr Biol**, 11, n. 20, p. 1569-1577, Oct 2001.

GAMERDINGER, M.; HAJIEVA, P.; KAYA, A. M.; WOLFRUM, U. *et al.* Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. **EMBO J**, 28, n. 7, p. 889-901, Apr 2009.

GARCÍA, R.; MERINO, D.; GÓMEZ, J. M.; NISTAL, J. F. *et al.* Extracellular heat shock protein 90 binding to TGF $\beta$  receptor I participates in TGF $\beta$ -mediated collagen production in myocardial fibroblasts. **Cell Signal**, 28, n. 10, p. 1563-1579, 10 2016.

HAJJ, G. N.; SANTOS, T. G.; COOK, Z. S.; MARTINS, V. R. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **J Comp Neurol**, 517, n. 3, p. 371-384, Nov 20 2009.

JOHNSON, B. D.; SCHUMACHER, R. J.; ROSS, E. D.; TOFT, D. O. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. **J Biol Chem**, 273, n. 6, p. 3679-3686, Feb 1998.

KE, X.; CHEN, J.; PENG, L.; ZHANG, W. *et al.* Heat shock protein 90/Akt pathway participates in the cardioprotective effect of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury to H9c2 cells. **Int J Mol Med**, 39, n. 4, p. 1001-1010, Apr 2017.

KNOWLTON, A. A.; BRECHER, P.; APSTEIN, C. S. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. **J Clin Invest**, 87, n. 1, p. 139-147, Jan 1991.

LACKIE, R. E.; MACIEJEWSKI, A.; OSTAPCHENKO, V. G.; MARQUES-LOPES, J. *et al.* The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. **Front Neurosci**, 11, p. 254, 2017.

LEE, C. T.; GRAF, C.; MAYER, F. J.; RICHTER, S. M. *et al.* Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. **EMBO J**, 31, n. 6, p. 1518-1528, Mar 2012.

LEE, S. D.; LAI, T. W.; LIN, S. Z.; LIN, C. H. *et al.* Role of stress-inducible protein-1 in recruitment of bone marrow derived cells into the ischemic brains. **EMBO Mol Med**, 5, n. 8, p. 1227-1246, Aug 2013.

LEVY, D.; GARRISON, R. J.; SAVAGE, D. D.; KANNEL, W. B. *et al.* Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med**, 322, n. 22, p. 1561-1566, May 31 1990.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys Acta**, 1823, n. 3, p. 624-635, Mar 2012.

LONGSHAW, V. M.; CHAPPLE, J. P.; BALDA, M. S.; CHEETHAM, M. E. *et al.* Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTII is regulated by cell cycle kinases. **J Cell Sci**, 117, n. Pt 5, p. 701-710, Feb 2004.

LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L. *et al.* Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci**, 25, n. 49, p. 11330-11339, Dec 2005.

LOTTEAU, S.; ZHANG, R.; HAZAN, A.; GRABAR, C. *et al.* Acute Genetic Ablation of Cardiac Sodium/Calcium Exchange in Adult Mice: Implications for Cardiomyocyte Calcium Regulation, Cardioprotection, and Arrhythmia. **J Am Heart Assoc**, 10, n. 17, p. e019273, 09 07 2021.

LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. **Circ Res**, 113, n. 6, p. 739-753, Aug 2013.

MANDAL, K.; TORSNEY, E.; POLONIECKI, J.; CAMM, A. J. *et al.* Association of high intracellular, but not serum, heat shock protein 70 with postoperative atrial fibrillation. **Ann Thorac Surg**, 79, n. 3, p. 865-871; discussion 871, Mar 2005.

MARBER, M. S.; MESTRIL, R.; CHI, S. H.; SAYEN, M. R. *et al.* Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. **J Clin Invest**, 95, n. 4, p. 1446-1456, Apr 1995.

MINOIA, M.; BONCORAGLIO, A.; VINET, J.; MORELLI, F. F. *et al.* BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. **Autophagy**, 10, n. 9, p. 1603-1621, Sep 2014.

MOHAMMED, S. F.; REDFIELD, M. M. Response to Letters Regarding Article, "Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction". **Circulation**, 132, n. 16, p. e206, Oct 20 2015.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nat Rev Cardiol**, 15, n. 7, p. 387-407, 07 2018.

NAKANO, M.; MANN, D. L.; KNOWLTON, A. A. Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. **Circulation**, 95, n. 6, p. 1523-1531, Mar 1997.

NICHTOVA, Z.; NOVOTOVA, M.; KRALOVA, E.; STANKOVICOVA, T. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. **Gen Physiol Biophys**, 31, n. 2, p. 141-151, Jun 2012.

NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, 9, n. 9, p. 3638-3646, Sep 1989.

NISHIZAWA, J.; NAKAI, A.; HIGASHI, T.; TANABE, M. *et al.* Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart. **Circulation**, 94, n. 9, p. 2185-2192, Nov 1996.

NISHIZAWA, J.; NAKAI, A.; MATSUDA, K.; KOMEDA, M. *et al.* Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. **Circulation**, 99, n. 7, p. 934-941, Feb 1999.

NOGUEIRA, I. P. Recrutamento da Stress inducible protein (STI-1) desempenha função protetora na resposta ao estresse cardíaco. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós graduação em fisiologia e farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais: 78 p. 2020.

OKUBO, S.; WILDNER, O.; SHAH, M. R.; CHELLIAH, J. C. *et al.* Gene transfer of heat-shock protein 70 reduces infarct size in vivo after ischemia/reperfusion in the rabbit heart. **Circulation**, 103, n. 6, p. 877-881, Feb 2001.

PATTISON, J. S.; SANBE, A.; MALOYAN, A.; OSINSKA, H. *et al.* Cardiomyocyte expression of a polyglutamine preamyloid oligomer causes heart failure. **Circulation**, 117, n. 21, p. 2743-2751, May 2008.

PEREIRA, L.; CHENG, H.; LAO, D. H.; NA, L. *et al.* Epac2 mediates cardiac  $\beta$ 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak and arrhythmia. **Circulation**, 127, n. 8, p. 913-922, Feb 2013.

PLUMIER, J. C.; ROSS, B. M.; CURRIE, R. W.; ANGELIDIS, C. E. *et al.* Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. **J Clin Invest**, 95, n. 4, p. 1854-1860, Apr 1995.

RANEK, M. J.; STACHOWSKI, M. J.; KIRK, J. A.; WILLIS, M. S. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 373, n. 1738, Jan 2018.

ROFFÉ, M.; BERALDO, F. H.; BESTER, R.; NUNZIANTE, M. *et al.* Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 29, p. 13147-13152, Jul 2010.

RÖHL, A.; WENGLER, D.; MADL, T.; LAGLEDER, S. *et al.* Hsp90 regulates the dynamics of its cochaperone Sti1 and the transfer of Hsp70 between modules. **Nat Commun**, 6, p. 6655, Apr 2015.

SANTOS, I. N.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Stress and cardiac beta adrenoceptors. **Stress**, 9, n. 2, p. 69-84, Jun 2006.

SATO, S.; FUJITA, N.; TSURUO, T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 20, p. 10832-10837, Sep 2000.

SHARMA, S. K.; DE LOS RIOS, P.; CHRISTEN, P.; LUSTIG, A. *et al.* The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. **Nat Chem Biol**, 6, n. 12, p. 914-920, Dec 2010.

SIMM, A.; SCHLÜTER, K.; DIEZ, C.; PIPER, H. M. *et al.* Activation of p70(S6) kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, 30, n. 10, p. 2059-2067, Oct 1998.

SOARES, I. N.; CAETANO, F. A.; PINDER, J.; RODRIGUES, B. R. *et al.* Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Mol Cell Proteomics**, 12, n. 11, p. 3253-3270, Nov 2013.

SPADARI, R. C.; CAVADAS, C.; DE CARVALHO, A. E. T. S.; ORTOLANI, D. *et al.* Role of Beta-adrenergic Receptors and Sirtuin Signaling in the Heart During Aging, Heart Failure, and Adaptation to Stress. **Cell Mol Neurobiol**, 38, n. 1, p. 109-120, Jan 2018.

ST RAMMOS, K.; KOULLIAS, G. J.; HASSAN, M. O.; ARGYRAKIS, N. P. *et al.* Low preoperative HSP70 atrial myocardial levels correlate significantly with high incidence of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. **Cardiovasc Surg**, 10, n. 3, p. 228-232, Jun 2002.

STÜRNER, E.; BEHL, C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. **Front Mol Neurosci**, 10, p. 177, 2017.

TROST, S. U.; OMENS, J. H.; KARLON, W. J.; MEYER, M. *et al.* Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70. **J Clin Invest**, 101, n. 4, p. 855-862, Feb 1998.

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

YANG, M.; CHEN, J.; ZHAO, J.; MENG, M. Etanercept attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by decreasing inflammation and oxidative stress. **PLoS One**, 9, n. 9, p. e108024, 2014.

YU, B.; SLADOJEVIC, N.; BLAIR, J. E.; LIAO, J. K. Targeting Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) in cardiovascular fibrosis and stiffening. **Expert Opin Ther Targets**, 24, n. 1, p. 47-62, 01 2020.

ZANATA, S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; HAJJ, G. N. *et al.* Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**, 21, n. 13, p. 3307-3316, Jul 2002.

ZHAN, X.; LI, J.; ZHOU, T. Targeting Nrf2-Mediated Oxidative Stress Response Signaling Pathways as New Therapeutic Strategy for Pituitary Adenomas. **Front Pharmacol**, 12, p. 565748, 2021.

ZHANG, Y.; JIANG, D. S.; YAN, L.; CHENG, K. J. *et al.* HSP75 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis. **J Cell Biochem**, 112, n. 7, p. 1787-1794, Jul 2011.

ZHU, W. Z.; ZHENG, M.; KOCH, W. J.; LEFKOWITZ, R. J. *et al.* Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 4, p. 1607-1612, Feb 2001.