

LIGIA AKEMI KIYUNA

Análise da atividade e expressão da proteína Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível papel protetor da enzima ALDH2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

LIGIA AKEMI KIYUNA

Análise da atividade e expressão da proteína Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível papel protetor da enzima ALDH2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar B. Ferreira

Versão original.

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kiyuna, Ligia Akemi

Análise da atividade e expressão da proteína
Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível
papel protetor da enzima ALDH2 / Ligia Akemi
Kiyuna; orientador Julio Cesar Batista Ferreira. --
São Paulo, 2018.
143 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Estresse oxidativo. 2. Disfunção cardíaca. 3.
microRNAs. 4. Dicer. 5. 4-HNE. I. Batista Ferreira,
Julio Cesar , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Ligia Akemi Kiyuna

Título da Dissertação: Análise da atividade e expressão da proteína Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível papel protetor da enzima ALDH2

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou a candidata:

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Análise da Atividade e Perfil de Expressão da Proteína Dicer em Condições de Estresse de Aldeídos: Possível Papel Protetor da Enzima ALDH2*", registrado sob o protocolo nº **6/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/03/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Julio Cesar Batista Ferreira**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Ligia Akemi Kiyuna (Pós-graduando), Luiz Henrique Marchesi Bazi (Pós-doutorando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Impact of Aldehydes on Dicer Activity and Expression Profile: Benefits of ALDH2 Activation*", protocol nº **6/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **3/8/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Julio Cesar Batista Ferreira**

- Team members: *Ligia Akemi Kiyuna (Graduate Student), Luiz Henrique Marchesi Bazi (Postdoctoral Researcher)*

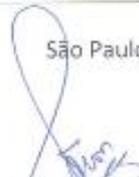
If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Ratus Norvegicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	90

São Paulo, 08 de março de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Secretário CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Julio Ferreira, por ter acreditado em mim e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e integrar o time LISB. Muito brigada por me ajudar a extrair o melhor de mim!

Ao Prof. Mário H. Hirata, por ter inicialmente aberto as portas de seu laboratório e me aceito como aluna de aprimoramento. Essa oportunidade foi muito importante para o meu retorno à universidade.

Ao Prof. Ian MacRae, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório por 6 meses. Sou muito grata não apenas pela hospitalidade e tempo dedicado, mas pela orientação na bancada e por todas as discussões de ciência. Um agradecimento especial aos seus alunos: Jess, Shanon, Todd, Yao, Luca e Phil. *Thank you so much!* E à Ellen, pela ajuda e amizade desde o meu primeiro dia!

Ao Prof. Edécio Cunha-Neto e à Profa. Ludmila Rodrigues, pela parceria e por todo o suporte na construção dessa história. Em especial, ao Darlan, meu companheiro de experimentos. Obrigada pelas risadas, músicas e *brainstorms!*

Ao Dr. Paulo Magno, pela realização dos exames ecocardiográficos.

Ao Prof. Guilherme Menegon Arantes e sua aluna Ariane, pelo profissionalismo e pela parceria nesse projeto.

Aos professores Marilene Demasi, Flávia Meotti e Marcelo Mori, pela participação em meu exame de qualificação e pela valiosa discussão científica. Todas as suas sugestões ajudaram na construção desse trabalho.

Aos meus colegas e amigos do time LISB, que me ensinaram quase tudo que aprendi no mestrado. Muito obrigada por todo o companheirismo e suporte no passar desses anos. Por ter me ajudado na preparação das minhas apresentações, e por estar na platéia durante cada uma delas. Muita gratidão! Muito obrigada por me incluir no time! Obrigada Kátia e Lucas (pelas nossas “*raves*” no lab!), Ju (por organizar esse grupo!), Bozi, Bechara, Laís, Marcinho (co-fundador do Lisb Cultural), Lis, Nicolás, Carlos, Van (uma vez Lisb, sempre Lisb), Gabriel e Ricardo. Em especial, ao meu colega são paulino e parceiro de bandeirão, Rudá! Por toda a paciência e discussões científicas. Eu aprendi muito com vocês.

Aos meus amigos do LBMAD, por tudo que me ensinaram dentro e fora do laboratório e, principalmente, pela amizade, que carrego até hoje. Muito obrigada Ju (pelas discussões sobre polissomos e miRNAs!), Aninha, Beth, Brayan e Cris. Foi muito bom conviver com todos vocês!

À Profa. Maria Luiza M.B. de Chaves e aos membros do LBCAF, pela hospitalidade e suporte nos últimos anos. Muito obrigada Nat, Carol, Denício e Marina! Tenho uma admiração e um carinho muito grande por todos vocês.

Aos meus amigos e irmãos, Bru, Risada, Samuel e Danilo por estarem ao meu lado em todos os momentos. Por acreditarem em mim e me fazerem acreditar também nos momentos em que desanimei. Vocês são a família que eu escolhi, são o meu pequeno conselho!

À minha amiga Vi (mestre), pela companhia nessa longa jornada! Companheira de cafés e *muffins*! Obrigada por estar ao meu lado e por confiar em mim.

À Ailma, minha amiga e irmã mais nova! Foi muito bom morar com você nesses últimos dois anos. Obrigada por me contagiar com sua alegria e otimismo diariamente!

Às minhas novas amigas Lívia e Daiane, que conheci durante o meu estágio em San Diego. Muito obrigada por todo o suporte, companhia e amizade durante minha estadia fora do país! Com vocês, eu me senti em casa.

Aos meus pais, Fátima e Nelson, que sempre me apoiaram e incentivaram em todas as minhas decisões e sonhos. Nada seria possível sem vocês ao meu lado.

Aos meus familiares, que mesmo de longe, me apoiaram e deram forças para que eu pudesse concluir mais essa etapa em minha vida! Muito obrigada tia Ana, avó Áurea, Lê, Rafa, Ramon, Lô e Thayne!

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Capes, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (2016/00900-0) e de estágio no exterior (2017/14426-0), e pelo suporte financeiro para a realização dessa pesquisa.

“O essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Kiyuna L.A. Análise da atividade e expressão da proteína Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível papel protetor da enzima ALDH2. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, processo exacerbado no quadro de estresse oxidativo. Em função de sua alta reatividade com biomoléculas, seu acúmulo tem sido relacionado ao estabelecimento e progressão de inúmeras doenças, incluindo as cardiovasculares. Recentemente, nosso grupo identificou a interação entre 4-HNE e a proteína Dicer em coração de ratos com insuficiência cardíaca (dados não publicados). Dicer é uma RNase importante na biogênese de microRNAs (miRNA), com papel na regulação gênica pós-transcricional, de modo que alterações em sua função poderiam afetar diversos processos celulares. Tanto a interação entre o aldeído e Dicer, quanto o efeito sobre a mesma não foram descritos na literatura. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do 4-HNE na atividade e a expressão da Dicer. Nossa hipótese é que o 4-HNE afete negativamente o perfil de atividade e expressão da Dicer. Para testar essa hipótese, utilizamos o modelo animal de disfunção cardíaca induzida cirurgicamente e avaliamos: a formação de adutos de 4-HNE-proteínas, atividade e expressão de Dicer, e os níveis de miRNAs cardíacos. Em cultura celular (H9C2, MEF e HEK293), por sua vez, avaliamos o efeito agudo de 4-HNE sobre as mesmas variáveis após sua adição no meio de cultura. E, por último, utilizando a proteína recombinante, analisamos o efeito direto do aldeído sobre a estabilidade e atividade da enzima *in vitro*. Como esperado, em ensaios com a proteína isolada, observamos que o 4-HNE interage diretamente com a RNase Dicer, e a formação de conjugados Dicer-4-HNE é responsável pela inibição e perda de estabilidade da proteína de forma tempo- e concentração-dependentes. No modelo animal, demonstramos um prejuízo na atividade de Dicer no coração de animais com disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio, sem alteração em sua expressão, acompanhado de diminuição dos níveis da maioria dos miRNAs analisados. Notavelmente, ambos os parâmetros, assim como os níveis de adutos de 4-HNE-proteínas, foram melhorados no grupo tratado com Alda-1, agonista alostérico

da enzima ALDH2 (responsável pela remoção do 4-HNE). Dessa forma, sugerimos a existência de associação entre os níveis de 4-HNE, atividade de Dicer e alteração na expressão de miRNAs no quadro de disfunção cardíaca. Consistente com os dados observados *in vivo*, em modelos celulares, a exposição aguda ao 4-HNE demonstrou reduzir a atividade de Dicer e afetar a via de biossíntese de miRNAs. Porém, não observamos proteção por Alda nesse modelo. Conjuntamente, nossos dados sugerem que a atividade de Dicer é modulada por 4-HNE em quadros de estresse agudo e crônico de aldeídos. Contudo, mais estudos são necessários a fim de elucidar o mecanismo pelo qual essa modulação ocorre. Visto que o acúmulo de 4-HNE e a desregulação na biogênese de miRNAs tem sido associados ao desenvolvimento de patologias, o estudo da interação entre Dicer e o aldeído é importante na compreensão dessas doenças e planejamento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Dicer. microRNAs. 4-HNE. Estresse oxidativo. Disfunção cardíaca.

ABSTRACT

Kiyuna L. A. Impact of aldehydes on Dicer activity and expression: potential benefits of ALDH2 activation. [Dissertation (Master thesis in Morphofunctional Sciences)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) is a major by-product of lipid peroxidation, a process that is exacerbated under oxidative stress conditions. This aldehyde is a very reactive molecule associated with the establishment and progression of many diseases, including cardiovascular diseases. We recently found using proteomics that 4-HNE directly targets Dicer in failing hearts, a critical enzyme for miRNA biology (unpublished data). Neither the aldehyde-Dicer adduction, nor its effect on protein stability and activity has been previously reported. Therefore, this study aimed to fill this gap by further investigating 4-HNE-Dicer interaction and characterizing its effect on Dicer profile. We hypothesize that 4-HNE will make adducts with Dicer and compromise its function and levels. Using an animal model of cardiac dysfunction, we evaluated the following parameters: levels of 4-HNE adducted proteins, Dicer levels and activity, and the levels of heart specific miRNAs (myomiRs). The same variables were analyzed in distinct cellular models (H9C2, MEF, HEK293) after acute exposure to 4-HNE. Additionally, we synthesized recombinant Dicer, and protein function and stability were assessed *in vitro*. As expected, the experiments with recombinant protein revealed that 4-HNE directly interacts with Dicer, and the formation of 4-HNE-DICER adduct causes loss of Dicer cleavage activity and stability in a time- and concentration-dependent manner. Regarding the animal model, Dicer activity, but not protein levels, dropped in failing hearts, which was paralleled by a reduction of mature miRNA levels. Of interest, animals with cardiac dysfunction chronically treated with a small molecule activator of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), termed Alda-1, displayed an elevated cardiac Dicer activity and mature miRNA levels compared with vehicle-treated animals. ALDH2 is the main enzyme responsible for 4-HNE clearance. In this context, this study points out a potential connection among 4-HNE levels, Dicer activity and myomiR levels in cardiac dysfunction. Consistent with our *in vivo* data, cells acutely exposed to 4-HNE showed an increase in 4-HNE-protein adducts followed by a reduction in Dicer activity and changes in miRNA biosynthesis. However, Alda showed no protective effect in the

latter model. Taken together, our findings using animal and cellular models suggest that Dicer activity is impaired in chronic (cardiac dysfunction) and acute aldehyde stress conditions. However, the molecular mechanisms involved in this response are still unclear. As both 4-HNE accumulation and microRNAs have been linked to innumerous pathologies, clarifying the modulation of Dicer activity under such conditions will certainly contribute to a better understanding the diseases and future therapeutic strategies.

Keywords: Dicer. microRNAs. 4-HNE. Oxidative stress. Cardiac dysfunction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Actina β
AGO2	Argonauta 2
Alda-1	<u>A</u> ldehyde <u>D</u> ehydrogenase <u>A</u> ctivator 1
ALDH2	Aldeído Desidrogenase 2
ANOVA	Análise de Variância
BLOSUM62	<u>B</u> LOcks <u>S</u> Ubstitution <u>M</u> atrix 62
CRYO-EM	<i>CRYO-Electron Microscopy</i>
Casp3	Caspase 3
Ct	<i>Treshold Cycle</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CoC	Citocromo C Oxidase
Cy3	Cianina 3
DABCYL	<i>4-([4-(Dimethylamino)phenyl]-azo)-benzoic acid succinimidyl ester</i>
DC	Disfunção Cardíaca
DCL	<i>Dicer Like Protein</i>
Dcr -/-	<i>Dicer knockout</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DIC	Doenças Isquêmicas do Coração
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxinucleotídeo
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
DTT	Ditiotreitol

DVE _d	Diâmetro Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo
DVE _s	Diâmetro Sistólico Final do Ventrículo Esquerdo
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases1/2</i>
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
EtOH	Etanol
FAM	Fluoresceína
FE	Fração de Encurtamento do Ventrículo Esquerdo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona
GST-4	Glutaciona S-transferase 4
HCl	Ácido clorídrico
HEK 293	<i>Human embryonic Kidney</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HITS-CLIP	<i>crosslinking immunoprecipitation coupled with highthroughput sequencing</i>
4-HNA	Ácido 4-hidroxi-nonanóico
4-HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
HO \cdot	Radical hidroxila
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Insuficiência Cardíaca

IM	Infarto do miocárdio
IP	Imunoprecipitação
KCl	Cloreto de potássio
K _m	Constante de Michaelis
LDH	Lactato desidrogenase
L-FABP	<i>Liver fatty acid-binding protein</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight</i>
MDA	Malondialdeído
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
miRNA/miR	Micro RNAs
Modo M	Modo monodimensional
mRNA	RNA mensageiro
MTT	<i>3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Nt	Nucleotídeo
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
³² P	Fósforo 32
<i>P-body</i>	<i>Processing bodies</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)

PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PPVEs	Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo em Sístole
PPVEd	Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo em Diástole
PQ	Paraquat
Pre-miR	MicroRNA precursor
Pri-miR	MicroRNA primário
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
rRNA	RNA ribossomal
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
-SH	Grupo Tiol
<i>Sham</i>	Grupo Controle (com tratamento fictício)
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIVd	Espessura do Septo Interventricular na Diástole
SIVs	Espessura do Septo Interventricular na Sístole
SOD	Superóxido Dismutase
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
TBS/ TBST	<i>Tris buffered saline / Tris buffered saline com Tween® 20</i>

TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>
TRBP	<i>trans-activation-responsive region RNA-binding protein</i>
TRIS	(Hidroximetil) Aminometano
tRNA	RNA transportador
3'UTR	<i>3' Untranslated Region</i>
UV	Ultravioleta
Wt	<i>Wild-type</i>
XPO5	Exportina 5

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

C, Cys	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutâmico
F, Phe	Fenilalanina
H, His	Histidina
K, Lys	Lisina
L	Leucina
V	Valina

Desoxinucleotídeos

dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina

Unidades

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Å	Angstrom
°C	Grau(s) celsius
g	Gramma
h	Hora

kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
Pg	Picograma
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
V	Volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Estresse Oxidativo, 4-Hidroxi-2-Nonenal (4-HNE) e Aldeído Desidrogenase 2 (ALDH2).....	23
1.2. Dados prévios do Laboratório: onde tudo começou.....	26
1.3. Dicer e a biogênese de miRNAs	27
1.3.1. DICER.	29
1.3.2. DICER e estresse oxidativo	32
2. HIPÓTESE	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Experimentos com animais: Sham x Disfunção Cardíaca.....	37
4.1.1. Amostra.....	37
4.1.2. Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio.....	37
4.1.3. Tratamento	37
4.1.4. Avaliação da Função Ventricular	38
4.1.5. Eutanásia e coleta de tecidos	39
4.2. Cultura de células.....	39
4.2.2. Morte Celular através da atividade da lactato desidrogenase (LDH)	41
4.3. Imunoprecipitação.....	41
4.4. <i>Western Blotting</i>	42
4.5. Expressão gênica	44
4.5.1. Extração e avaliação do RNA total	44
4.5.2. Quantificação e integridade do RNA.....	44
4.5.3. Transcrição Reversa.....	45
4.5.4. Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR) – método <i>Taqman</i>	45
4.5.5. Análise da expressão de miRNAs cardíacos	47
4.6. Atividade de ALDH2	48
4.7. Análise da via de processamento de shRNA em células RNAi-293-EGFP/RFP sob estresse oxidativo induzido	48
4.8. Análise da atividade de DICER.....	49
4.8.1. <i>Molecular Beacon</i> - hsa-pre-miR-122.....	49
4.8.2. <i>Molecular Beacon</i> – duplex de RNA/DNA	50

4.8.3. Substrato de RNA radioativo (³² P)	51
4.9. Análise de Fluorescência	52
4.10. Alinhamento Múltiplo da sequência primária de DICER	53
4.11. Expressão e purificação de DICER recombinante.....	53
4.12. Mutação sítio-específica de DICER.....	53
4.13. Transfecção e superexpressão de DICER em cultura celular	55
4.14. Análise da atividade de clivagem da Argonauta 2 (AGO2).....	56
4.15. Análise estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1. Experimentos em animais: sham x disfunção cardíaca tratados com Alda-1 ou veículo.	59
5.1.1. Caracterização do fenótipo: análises ecocardiográficas	59
5.1.2. Perfil de expressão e atividade da enzima ALDH2 e níveis de adutos de 4-HNE com proteínas	61
5.1.3. Perfil de expressão e atividade de DICER	65
5.1.4. Biogênese de miRNAs	67
5.1.4.1. Expressão relativa de pri-microRNAs e microRNAs maduros	67
5.1.4.2. Níveis de mRNA das proteínas da biogênese do miRNA.....	71
5.2. Ensaio celulares.....	74
6. DISCUSSÃO	97
6.1 Experimentos <i>in vivo</i>: Disfunção Cardíaca e Estresse Crônico de Aldeídos	97
6.1.1. Quatro semanas de tratamento com Alda-1 não protege o coração de animais com disfunção cardíaca pós IM.....	98
6.1.2. Redução na Atividade de Dicer e expressão de miomiRs.....	101
6.1.3. Níveis de miomiRs no coração: síntese x decaimento	103
6.1.4. Análise das demais proteínas da biogênese de miRNAs	106
6.2. Modelos celulares - exposição aguda ao 4-HNE reduz a atividade de Dicer e afeta biogênese de microRNAs	109
6.3. Ensaio <i>in vitro</i>: 4-HNE causa redução da atividade e estabilidade de Dicer de forma tempo- e concentração-dependentes	114
6.4. Limitações do estudo	120
7. CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS*	123
ANEXO 1. Análise da qualidade, pureza e integridade das amostras de RNA.....	133
ANEXO 2. Representação gráfica dos géis de eletroforese capilar das amostras utilizadas no estudo	134

ANEXO 3. Valores de Ct do gene endógeno ACTB e miRNAs miR-150 e miR-331	135
ANEXO 4. Validação da sonda molecular (<i>molecular beacon</i>) – duplex RNA/DNA	136
ANEXO 5. <i>Primers</i> utilizados na introdução de mutações sítio-específicas em Dicer e imagem ilustrativa da estratégia de sua inserção no vetor pFastBac.....	137
ANEXO 6. Dados Ecocardiográficos.....	138
ANEXO 7. Imagens dos géis de <i>Western Blotting</i>	139
ANEXO 8. Confirmação da deleção de Dicer na linhagem MEF Dcr -/-.....	140
ANEXO 9. Análise da Atividade de Dicer <i>in vitro</i>	141
ANEXO 10. Imunoprecipitação de Dicer em células H9C2	142

1. INTRODUÇÃO

Segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre doenças não transmissíveis, no ano de 2012, as doenças cardiovasculares foram identificadas como a principal causa de morte no mundo (31,25% das mortes) (1). Dentre elas, as doenças isquêmicas do coração (DIC) foram responsáveis por 7,4 milhões de óbitos, valor correspondente a 13,21% do total registrado globalmente no mesmo período. No Brasil, em 2016, as mortes por DIC representaram 8,9% do total computado no país (2), proporção semelhante àquela obtida em 2006 (8,8%) (2).

As DIC encontram-se entre as principais causas de insuficiência cardíaca (IC) (3), a qual também é a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório. Ela é definida pela incapacidade dos ventrículos em bombear a quantidade de sangue necessária para suprir as necessidades do organismo (4), apresentando, quando crônica, manifestações clínicas como retenção de fluidos, edema periférico e congestão pulmonar, em casos mais graves.

Diversos estudos descrevem um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no coração em insuficiência (5,6), caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Além da sua ação direta sobre os constituintes celulares, as EROs são responsáveis pela geração de outras moléculas pró-oxidantes, como é o caso do aldeído 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), produto da peroxidação lipídica. Esse aldeído apresenta alta reatividade com biomoléculas, sendo capaz de formar ligações de alta afinidade (adutos) com proteínas, lipídios e DNA, as quais estão associadas à modificação da função e degradação de seus alvos, de modo que seu acúmulo tem sido correlacionado ao desenvolvimento de inúmeras doenças como o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (7).

Experimentos prévios do nosso laboratório, utilizando ratos com insuficiência cardíaca (IC), identificaram um aumento significativo nos níveis de 4-HNE cardíaco, associado ao desenvolvimento da patologia (8). No mesmo trabalho, uma análise proteômica dos alvos do aldeído, identificou a endonuclease Dicer, proteína essencial na biogênese de miRNAs, como um deles (dados não publicados). Entretanto, tanto a interação com o aldeído, como o efeito da mesma sobre a proteína, não foram descritas na literatura.

1.1. Estresse Oxidativo, 4-Hidroxi-2-Nonenal (4-HNE) e Aldeído Desidrogenase 2 (ALDH2)

Espécies reativas de oxigênio, denominação ampla que inclui os radicais livres (como os radicais superóxido, hidroxila, peroxila) e espécies não radicalares (ex.: peróxido de hidrogênio), são, em diferentes graus, reativas com biomoléculas (9). No contexto celular, o desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes caracteriza o estresse oxidativo, situação onde a concentração de EROs encontra-se transiente ou cronicamente acima dos níveis considerados fisiológicos. Contudo, apesar da definição do quadro ser amplamente disseminada, o limiar desse equilíbrio não é claro, visto que não sabemos o suficiente sobre a ação biológica dos chamados “oxidantes” e “antioxidantes” (9), o que impõe obstáculos no desenvolvimento de intervenções eficientes sobre os processos que os envolvem e seus efeitos benéficos e/ou deletérios.

Até recentemente, as EROs, principalmente, os radicais livres, eram vistas apenas como “vilãs” e causa de patologias (9). Com a identificação da enzima superóxido dismutase (SOD) em 1969 (10) ampliaram-se os estudos na área da Biologia Redox na tentativa de compreender as funções biológicas dessas moléculas reativas, até então, vistas apenas como subprodutos de reações com alvos randômicos e efeitos deletérios para o organismo. Hoje, sabe-se que essas espécies são provenientes tanto de fontes exógenas, como drogas, xenobióticos, radiação ultravioleta (UV), como por vias endógenas, dentre elas a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, ou enzimática (ex.: xantina oxidase, NADPH oxidase, entre outras) (Figura 1) (9). Adicionalmente, nos últimos anos, além de estudos avaliando o seu papel no desenvolvimento de doenças, muitos trabalhos tem descrito a importância de algumas espécies na sinalização celular, como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (11,12).

Além das EROs, outros produtos pró-oxidantes são gerados quando a célula encontra-se em estresse oxidativo, como é o caso dos aldeídos malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). O último é reconhecido como o principal subproduto do processo denominado peroxidação lipídica (não enzimática), reação em cadeia na

qual os lipídios poli-insaturados da membrana são oxidados por moléculas radicalares (radicais livres) (Figura 1) (7,13).

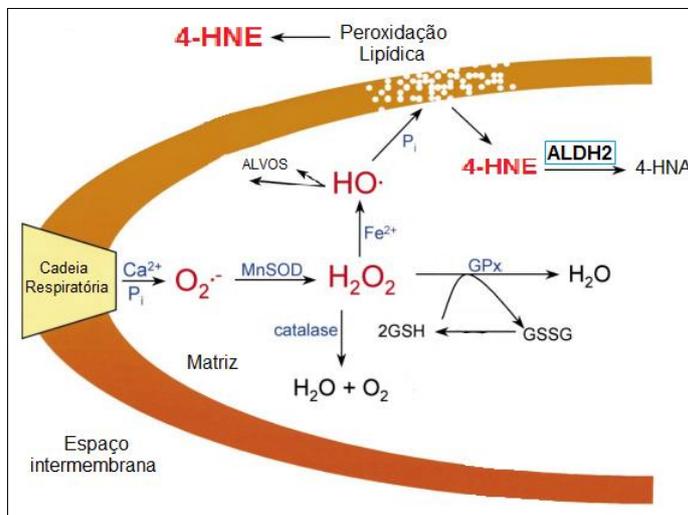


Figura 1. Geração de EROs na célula. Ilustração esquemática das principais espécies reativas de oxigênio (EROs) e suas conexões no interior da mitocôndria. Destaque para o processo de peroxidação lipídica da membrana mitocondrial, com formação do aldeído 4-HNE, e sua oxidação a 4-HNA (ácido 4-hidroxi-nonanoico) pela enzima mitocondrial ALDH2. A cadeia transportadora de elétrons (na membrana mitocondrial interna) apresenta pequenos "vazamentos" de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), sendo removido pela enzima Superóxido Dismutase (Mn-SOD) com

formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é reduzido à água (H_2O) pela catalase e glutatona peroxidase (GPx), processo onde a glutatona (GSH) é oxidada pela GPx (14). Imagem adaptada de Kowaltowski, A. et al, 2001 (14).

O 4-HNE é uma molécula altamente reativa devido a três sítios funcionais em sua estrutura química: a dupla ligação de carbono $\text{C}2=\text{C}3$, ao grupo carbonila $\text{C}1-\text{O}$ e ao grupo hidroxila no $\text{C}4$ (Figura 3) (13). O aldeído é capaz de formar ligações com proteína via adição de *Michael* (chamada de aduto de *Michael* no restante do texto), através da ligação de grupos tiol e amino (cisteína, histidina, lisina) à sua dupla ligação de carbono $\text{C}2=\text{C}3$; e formação de base de *Schiff* através da ligação de seu grupo carbonila $\text{C}1-\text{O}$ às aminas primárias (ex.: lisinas) (13).

Assim como é visto para as EROs, a formação de adutos de *Michael* entre 4-HNE com DNA, lipídios e proteínas é capaz de inativar, modificar a atividade e função de seus alvos, ou mesmo levá-los a degradação (Figura 2), de modo que o acúmulo de 4-HNE tem sido correlacionado ao desenvolvimento de inúmeras doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (7,15). Contudo, diferentemente da maioria das espécies reativas de oxigênio, o 4-HNE possui um maior tempo de meia vida (16). Além disso, a presença de um sítio hidrofílico ($\text{CHOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$) e um lipofílico ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-$) em sua estrutura química, permitem que a molécula transite entre os compartimentos celulares sem impedimento e, atinja localidades distantes de seu sítio de formação (Figura 3) (16).

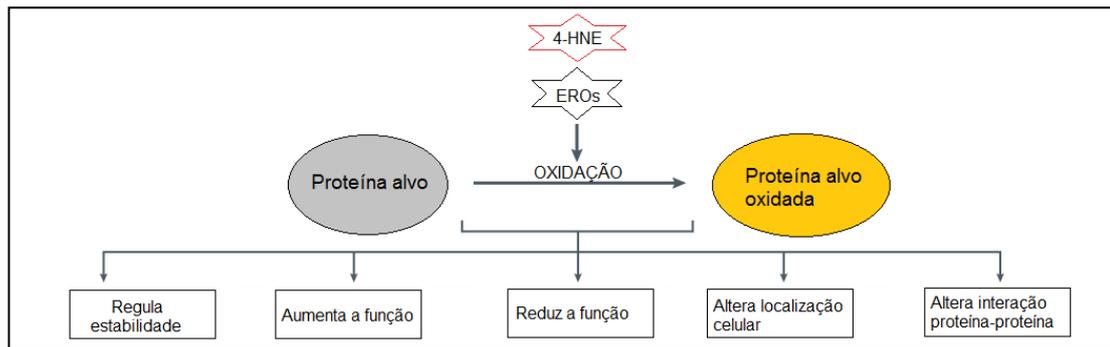


Figura 2. Esquema ilustrativo dos possíveis efeitos da oxidação de proteínas mediada por EROs e, possivelmente, por 4-HNE. Imagem adaptada de Holmström, K. M. & Finkel. T., 2014 (11).

Diversos estudos descrevem um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no coração em insuficiência (5,6), caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Seu excesso está associado à disfunção celular, peroxidação de lipídios e proteínas, dano ao DNA e morte celular. No contexto da IC, tal condição está relacionada ao decaimento da função contrátil cardíaca, sinalização de hipertrofia e remodelamento da matriz extracelular, processos envolvidos no remodelamento patológico do coração e desenvolvimento da insuficiência (6). Do mesmo modo que as EROs, níveis elevados de 4-HNE tem sido relacionados à cardiomiopatias e a própria IC (17).

A enzima mitocondrial aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), conhecida por seu papel no metabolismo do etanol, é responsável por oxidar (remover) o 4-HNE em um ácido menos reativo, o 4-hidroxi-nonanóico (4-HNA) (Figura 3), de modo a apresentar um papel relevante na defesa celular ao estresse de aldeídos (18). Nessa direção, estudos recentes observaram uma correlação inversa entre a atividade de ALDH2 e o dano cardíaco isquêmico, de forma que a enzima demonstrou ter papel cardioprotetor em isquemia (19,20).

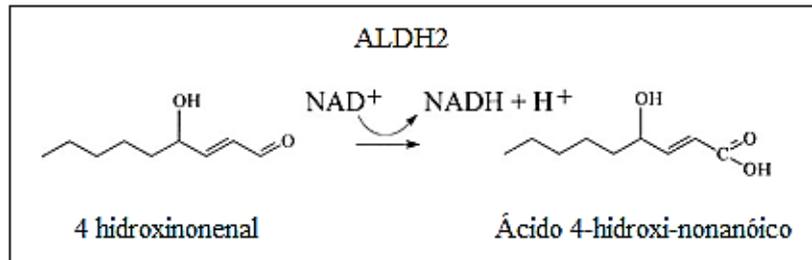


Figura 3. Oxidação da molécula de 4-hidroxinonenal em ácido 4-hidroxi-nonanoico, reação catalisada pela enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2). Imagem adaptada de Schaur, R.J., 2003 (13).

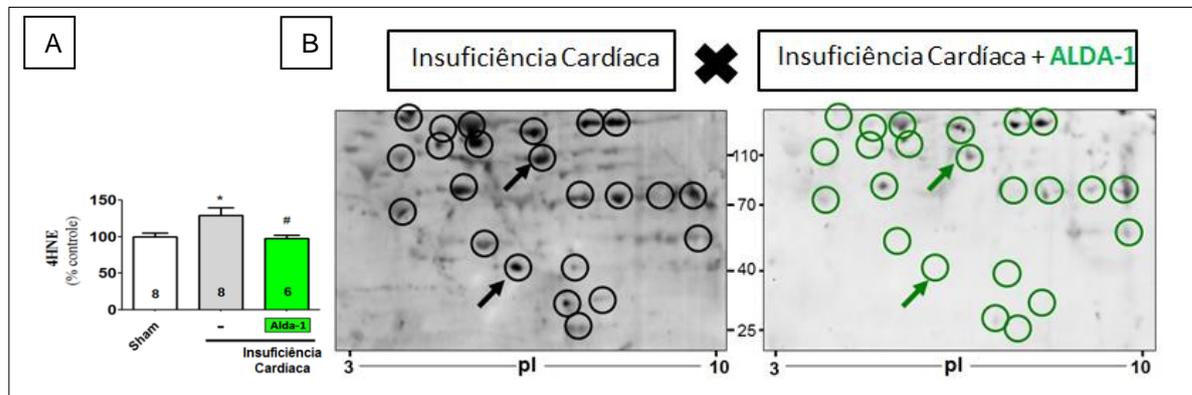
Em 2008, nossos colaboradores da Universidade de Stanford demonstraram que a ativação farmacológica da ALDH2 utilizando Alda-1, um agonista alostérico desenvolvido pelo grupo, protege o coração contra danos isquêmicos (19). A molécula Alda-1 (aldehyde dehydrogenase activator 1) foi identificada pelo grupo liderado por Mochly-Rosen (2008) por meio de um ensaio *high-throughput screen* (ensaio em larga escala), o qual detectou o aumento específico da atividade da enzima mitocondrial ALDH2 em até duas vezes (19). Ao ligar-se na entrada do sítio de ligação ao substrato (aldeído) da enzima, a Alda-1 promove redução do Km de ALDH2 por seu cofator NAD⁺ em 2.4 vezes e aumento de 4.4 vezes em sua eficiência catalítica (21).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a progressão da disfunção ventricular induzida por infarto do miocárdio é acompanhada pela redução da atividade da ALDH2 cardíaca, acúmulo de 4-HNE cardíaco e circulante, e disfunção mitocondrial (20). Ainda, foi demonstrado que o tratamento contínuo com Alda-1 é capaz de aumentar a atividade da ALDH2, reduzir a quantidade de 4-HNE e melhorar a função mitocondrial cardíaca, além de aumentar a contratilidade cardíaca dos animais tratados (20). Esses resultados sugerem o possível envolvimento de aldeídos, como o 4-HNE, na fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Entretanto, os mecanismos celulares envolvidos na degeneração induzida pelos aldeídos são desconhecidos.

1.2. Dados prévios do Laboratório: onde tudo começou

Nesse cenário, considerando o potencial do 4-HNE de formar adutos de *Michael* com proteínas, e sua elevada concentração no coração após infarto do miocárdio (8) (Figura 4.A), questionamos quais proteínas seriam alvos da modificação pelo aldeído e, qual a contribuição dessa interação no desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

Em estudo anterior do laboratório (dados não publicados), foi conduzida uma análise proteômica do tecido cardíaco de ratos com insuficiência cardíaca, onde foram analisadas as proteínas que apresentaram formação de adutos de 4-HNE em IC e, cujo quadro era minimizado ou prevenido com o uso de Alda-1 (Figura 4.B).



Dentre as proteínas encontradas com estas características, identificamos a endonuclease Dicer, a qual apresentou três sítios de formação de adutos com o aldeído, os resíduos K1324, H1325 e H1339. A Dicer é uma proteína chave no processamento do microRNA (miRNA), molécula importante em todos os processos celulares, visto seu papel na regulação gênica pós-transcricional (Figura 5). Tanto a interação Dicer-4-HNE (regulação pós-traducional) quanto seus efeitos na disponibilidade e função da proteína ainda não foram descritos na literatura.

1.3. Dicer e a biogênese de miRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos, que atuam na regulação gênica pós-transcricional via inibição da tradução e degradação do RNA mensageiro alvo (mRNA), por meio de sua ligação, principalmente, à região 3'UTR do último (22). Um único miRNA pode regular a expressão de diversos genes e, de forma similar, um único gene pode ser

modulado por muitos miRNAs . Estudos apontam que eles participam da regulação de quase todos os processos celulares, sendo estimado que, em mamíferos, os miRNAs regulam aproximadamente 30% dos genes codificantes (23).

Com relação a sua biogênese, o miRNA pode ser transcrito a partir de um gene independente ou originar-se de íntrons de genes codificantes (22). O transcrito primário, denominado pri-miR (miRNA primário), passa por duas etapas de processamento até atingir sua forma madura (Figura 5). A primeira fase é catalisada pelo complexo microprocessador formado pelas proteínas DROSHA-DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) no interior do núcleo (24,25), o qual cliva o pri-miR em uma molécula de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada pre-miR (miRNA precursor). O pre-miR é reconhecido e transportado para o citoplasma através da Exportina 5, um fator de transporte nuclear, onde seu processamento é finalizado (25).

No citoplasma, a Dicer atua em associação com a TRBP (*trans-activation-responsive region RNA-binding protein*) no processamento do pre-MiR em miRNA maduro (duplex) (26). Deste último, uma das fitas (fita guia) é preferencialmente incorporada pela RNase Argonata 2 (AGO2) no complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), onde guia a inibição da tradução e a degradação do mRNA alvo por complementariedade de bases (Figura 5) (22,27).

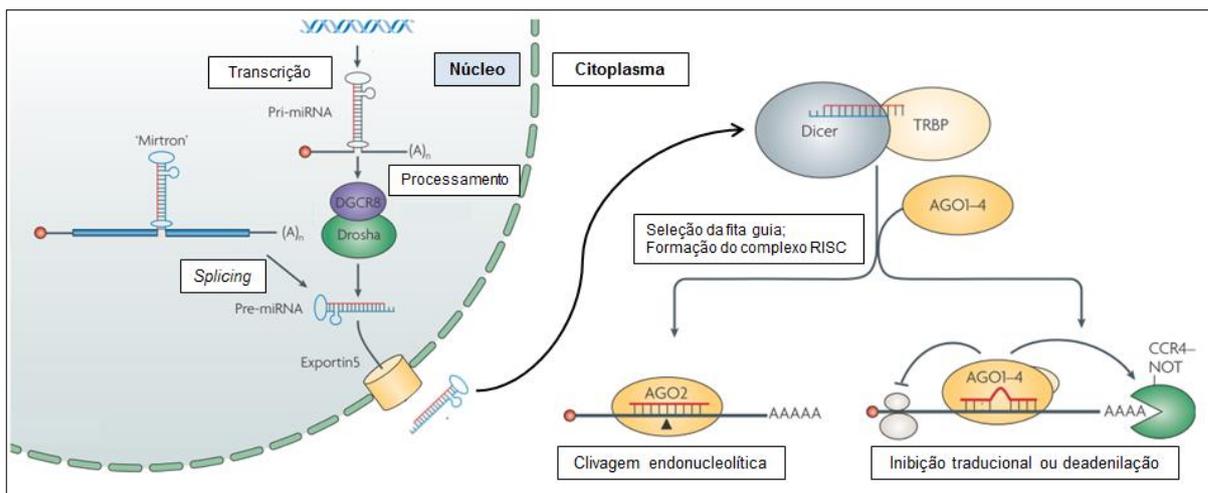


Figura 5. Representação ilustrativa da via canônica de biogênese do miRNA. Imagem adaptada de Filipowicz, W. et al, 2008 (23).

É importante ressaltar que além da via canônica apresentada acima, existem mecanismos alternativos de geração de miRNAs, os quais podem ser independentes

do complexo microprocessador ou de Dicer (28). Tais processos foram extensivamente revisados recentemente (29,30). Em 2016, um estudo reavaliou o papel de Dicer, Drosha e XPO5 na biogênese de miRNAs, através de um modelo celular nocaute para as proteínas de interesse (31). Enquanto que a deleção de Drosha aboliu a produção de miRNAs canônicos, as células nocaute para Dicer apresentaram expressão residual entre 14,4 - 21,4% do total de miRNAs expressos na linhagem controle. Os pesquisadores apontaram a existência de vias não canônicas de processamento do miRNA, independente de Dicer, e propuseram um modelo de clivagem do pre-miR dependente de AGO2, com efeito na seleção da fita guia (preferência da fita 5p) (31). Com relação à Exportina 5 (XPO5), a deleção da proteína afetou modestamente os níveis de miRNAs, de modo que os autores sugeriram a existência de outros mecanismos de transporte do pre-miR, independentes da proteína.

1.3.1. DICER

Em humanos, o gene DICER1 encontra-se localizado no cromossomo 14q32.13. A ribonuclease de 1.922 aminoácidos e peso molecular aproximado de 217kDa, apresenta estrutura única e multidomínios, os quais estão ilustrados na Figura 6.A, juntamente com sua organização espacial (Figura 6.B), proposta por Lau P. W. e colaboradores (2012) (32). Infelizmente, devido ao seu tamanho e complexidade, o cristal completo da proteína de mamíferos ainda não está disponível, sendo resolvido apenas o cristal da proteína do protozoário *Giardia lamblia* (33) (PDB - 2FFL). Nesse organismo e em modelos *in silico* presentes na literatura, é proposto que a Dicer funcione como uma “régua molecular”, através da disposição dos seus domínios, o que garante a clivagem dos seus substratos no mesmo local e com tamanho definido (33).

Nesse sentido, os domínios PAZ (local de ligação do dsRNA, extremidades 3' e 5') e RNaseIII (centro catalítico, onde ocorre a clivagem) são reconhecidos como as extremidades dessa “régua” (32,33) (Figura 6.B), com importante papel no comprimento do RNA resultante. Em *Drosophila*, por exemplo, a inserção de mutações pontuais no domínio PAZ desencadearam alterações no comprimento da fita de RNA resultante e redução em sua atividade de silenciamento (34). Por sua vez,

a clivagem do pre-miR por Dicer requer a ação coordenada de seus dois domínios catalíticos RNaseIII A e B (35). A inativação de qualquer um dos domínios leva a falha no processamento do substrato de RNA e alteração na produção de miRNAs (36). Por exemplo, a mutação e inativação do domínio RNaseIIIB tem sido diretamente associada a diversas formas de câncer em humanos (37).

Em 2018, Liu Z e colaboradores, utilizando a técnica de crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM, do inglês *CRYO-Electron Microscopy*), resolveram a estrutura da proteína Dicer humana em complexo com o seu substrato (pre-let-7) e seu cofator (TRBP) em nível quase atômico (resolução de 4,4 Å) (PDB 5ZAK e 5ZAL) (26) (ver Figura 37.D). A estrutura se mostrou consistente com os modelos anteriores (32,33), porém apresentou um maior detalhamento quanto a disposição dos domínios da proteína. Interessantemente, o modelo prevê um estágio intermediário de ligação entre Dicer e seu substrato, o qual parece ser uma fase prévia à clivagem, onde o pre-miR encontra-se ligado à proteína, mas afastado do centro catalítico. Tal modelo se assemelha ao descrito previamente por Taylor DW e colaboradores em 2013 (resolução > 20 Å) (38). Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram as conformações de Dicer frente ao reconhecimento de diferentes substratos de RNA (pre-miR e pre-siRNA) (38).

Com relação ao seu sítio catalítico, Dicer apresenta quatro regiões centrais (do inglês, *motifs*), as quais estão localizadas em seus dois domínios catalíticos RNaseIII A (E1316, D1320, D1561, E1564) e B (E1705, D1709, D1810 e E1813), sendo amplamente conservadas em todos os grupos de seres vivos (35) (Figura 6.A-B). Notavelmente, a estrutura desse sítio (dímero intramolecular) parece ser mantida por um núcleo hidrofóbico, além de ser envolto por múltiplos domínios, fornecendo potenciais sítios de regulação do mesmo (26). Na Figura 6.C, a região D1320 está destacada, visto que ela se encontra a apenas três aminoácidos de distância do primeiro resíduo identificado pelo nosso grupo como sítio de formação de aduto de *Michael* com 4-HNE (K1324).

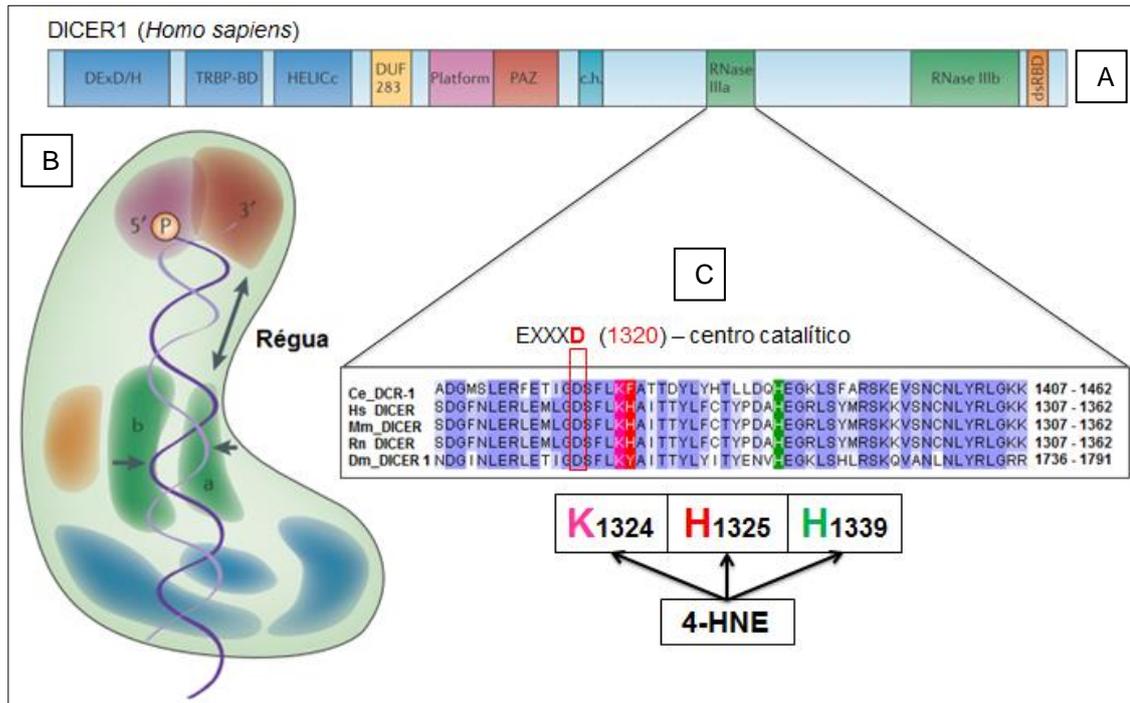


Figura 6. Domínios da DICER1 humana; (A) Representação gráfica da estrutura de DICER1, onde podem ser visualizados os domínios da proteína destacados em colorido; (B) Organização espacial de DICER1, proposta por Lau P. W. e colaboradores (2012) (32), as cores representam os domínios do item (A), Imagens (A) e (B) extraídas de Foulkes, W.D.; Priest, J.R.; Duchaine, T.F., 2014 (37); (C) Alinhamento múltiplo da sequência primária de DICER1 entre as espécies *Caenorhabditis elegans* (1407-1462), *Homo sapiens* (1307-1362), *Mus musculus* (1307-1362), *Rattus norvegicus* (1307-1362) e *Drosophila melanogaster* (1736-1791). Em destaque, o fragmento do domínio RNase IIIa, o qual apresenta os resíduos de interesse (rosa: K1324, vermelho: K1325, verde: K1339), possíveis sítios de formação de adutos de Michael de 4-HNE. Os demais aminoácidos estão coloridos baseados na porcentagem de identidade (Matriz BLOSUM62); Também em destaque um dos quatro centros catalíticos da proteína, o aminoácido D1320 (em mamíferos).

Vale mencionar que realizamos um alinhamento múltiplo da sequência primária de Dicer entre *Caenorhabditis elegans* (nematóide), *Homo sapiens* (homem), *Mus musculus* (camundongo), *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta) e *Rattus norvegicus* (rato), para avaliar a conservação dos sítios de interação com 4-HNE nesses organismos. Como resultado, verificamos que os resíduos K1324 e H1339 são conservados em todas as espécies analisadas, já o H1325 é conservado apenas nos mamíferos (Figura 6.C). A conservação dos resíduos poderia ser um indicativo de relevância evolutiva desse sítio para a proteína. Contudo, a interação desses resíduos com o aldeído nos demais organismos não foi avaliada.

Em vertebrados e nematóides, apenas um gene de Dicer foi identificado até o momento, e a proteína, como visto, tem a sua função relacionada à clivagem tanto de pre-miRs, na via dos miRNAs, como de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA), na

síntese de siRNA endógenos (pequeno RNA de interferência, do inglês *small interfering RNA*). Contudo, nos últimos anos, outras funções têm sido propostas à Dicer, como sua participação no reparo de danos ao DNA (39,40) e, aparente migração para o núcleo (41), onde atuaria no processo de silenciamento gênico transcricional. Movimento também descrito no nematóide *C. elegans*, porém, apenas no início da oogênese, processo induzido pela fosforilação da proteína (42).

Em insetos, como em *Drosophila melanogaster*, que apresentam 2 isoformas, ou em plantas, como a *Arabidopsis Thaliana*, a qual apresenta 4 isoformas (*Dicer Like* 1-4, DCL1-4), cada isoforma da proteína demonstra ser especializada na função que executa (ex.: síntese de miRNA ou siRNA), apesar de poder ocorrer sobreposição de funções, principalmente, em plantas (43). Interessantemente, tanto em *Drosophila* (44) como em humanos (45), sua participação na defesa anti-viral já foi proposta. Nesses grupos, a existência de formas especializadas para diferentes funções pode estar associada com mecanismos distintos de regulação. Em mamíferos, os quais apresentam apenas uma isoforma, a proteína deve ser finamente regulada, visto que a mesma proteína atua em diversos processos e deve responder de forma adequada a diferentes estímulos, tanto fisiológicos como de estresse.

1.3.2. DICER e estresse oxidativo

A biogênese dos miRNAs representa um processo finamente regulado, sendo coordenado temporal e espacialmente. Essa regulação ocorre em diferentes níveis (Figura 7), desde a transcrição do pri-miR, seu processamento (DICER e DROSHA) e modificação (via edição, metilação, uridilação e adenilação), carregamento na proteína Argonauta (seleção da fita guia e incorporação ao complexo RISC), e decaimento (30). Modificações na disponibilidade e atividade de proteínas envolvidas em qualquer etapa de sua biogênese poderiam levar a mudanças no perfil final de miRNAs e, conseqüentemente, de proteínas por eles reguladas. Nessa direção, estudos recentes têm apontado que o mau funcionamento da gênese dos miRNAs está associado a diversas doenças, como cardiomiopatias e câncer (46–48).

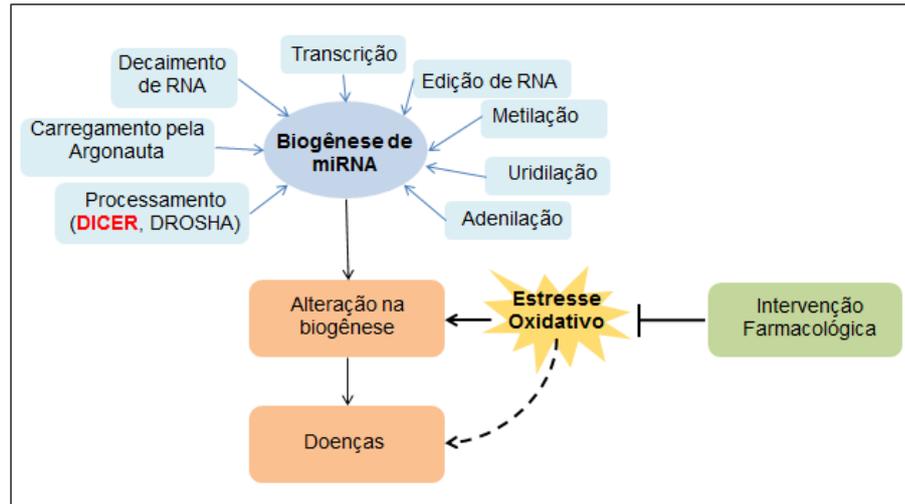


Figura 7. Regulação da biogênese de microRNAs. Ilustração esquemática dos fatores que atuam sobre a biogênese dos microRNAs e, como esse processo está relacionado ao desenvolvimento de doenças. Em amarelo, o possível papel da condição de estresse oxidativo como uma das causas da alteração no processo de biogênese. Destacada em vermelho, a DICER, proteína envolvida no processamento de miRNAs, a qual foi identificada em estudos preliminares do laboratório como um dos alvos do aldeído 4-HNE.

Entre as possíveis alterações na via de processamento do miRNA, a inativação parcial ou deleção de DICER têm sido associadas ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (47,48). Após deleção de DICER no coração de camundongos via sistema Cre-loxP, Chen e colaboradores (2008) observaram dilatação acentuada do ventrículo esquerdo, alteração nos níveis de proteínas contráteis e drástica redução nos níveis de miRNAs maduros, seguido de morte no quarto dia pós-nascimento (47). No mesmo estudo, os pesquisadores observaram redução nos níveis de Dicer no coração de pacientes no estágio final de IC induzida por cardiomiopatia dilatada. Interessantemente, seus níveis foram significativamente elevados no coração dos mesmos pacientes após instalação cirúrgica de aparelho de assistência ao ventrículo esquerdo.

Em 2012, Mori e colaboradores demonstraram que há redução nos níveis de Dicer e, conseqüentemente, na biogênese de miRNAs, em camundongos ao longo do envelhecimento (49). O declínio nos níveis de Dicer foi acompanhado pela diminuição da resistência ao estresse (ex.: de calor, estresse oxidativo), resposta também observada no nematoide *C. elegans*, o qual também apresentou redução no tempo de vida. Adicionalmente, em ensaios celulares no mesmo estudo, os pesquisadores verificaram que os níveis de Dicer estão reduzidos em função de estresse oxidativo

induzido (por Paraquat, peróxido de hidrogênio, UV), ou seja, a proteína, assim como o perfil de miRNAs, demonstra ser sensível a variações no estado redox celular.

Na mesma direção, estudos recentes em oncologia verificaram alteração nos níveis de Dicer e DROSHA em resposta a hipóxia (50,51). Twan van den Beucken et al (2014) encontraram, em condições de hipóxia, uma diminuição significativa na expressão da Dicer atribuída ao silenciamento de seu promotor e redução de sua transcrição (50). Sua menor expressão foi seguida de declínio na biogênese de miRNAs, principalmente da família miR-200.

No mesmo ano, Rajesha Rupaimoole e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes em células provenientes de tumor ovariano (51). Quando as células foram sujeitas a hipóxia prolongada (até 48 horas), houve uma redução significativa nos níveis de mRNA e proteína de Dicer e DROSHA, os quais foram recuperados quando retomadas as condições de normóxia, demonstrando a natureza dinâmica da regulação. Para validar o resultado obtido, os pesquisadores sequenciaram o pri-miRNA, pre-miRNA e miRNA maduro em normóxia e hipóxia, e observaram, como esperado, o acúmulo de pri-miRNA e redução de sua forma madura, sob hipóxia. Em ambos os estudos, o declínio nos níveis de DICER e DROSHA foi relacionado a um pior prognóstico (51).

Ambos, o quadro de estresse oxidativo (7,15,17) e a desregulação na biogênese de miRNAs (46–48), tem sido associados ao desenvolvimento de patologias. Nesse contexto, o estudo dos mecanismos pelos quais esses processos podem estar relacionados entre si é importante para uma melhor compreensão das doenças e maior êxito no desenvolvimento de terapias.

2. HIPÓTESE

Experimentos prévios do laboratório descreveram um aumento significativo nos níveis de 4-HNE cardíaco em animais com insuficiência cardíaca (IC), sendo a proteína Dicer identificada como um dos alvos do aldeído. Uma vez que modificações pós-traducionais de Dicer podem modular a sua atividade, nós levantamos a seguinte hipótese: a interação 4-HNE-Dicer causa redução na atividade de Dicer e alteração em sua expressão no quadro de estresse de aldeídos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do aldeído 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) sobre a expressão e atividade da proteína Dicer no quadro de estresse de aldeídos.

3.2. Objetivos Específicos

- (1) Validar a formação de adutos entre 4-HNE-Dicer no coração (área remota) de animais com disfunção cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio;
- (2) Analisar a expressão e atividade de Dicer no coração (área remota) de animais com disfunção cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio;
- (3) Avaliar a expressão de miRNAs específicos de músculos (miomiRs) no coração (área remota) de animais com disfunção cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio;
- (4) Verificar o papel protetor da ativação farmacológica da enzima ALDH2 sobre o fenótipo dos animais com disfunção cardíaca (função cardíaca), e se o mesmo se reflete sobre o perfil de expressão e atividade da Dicer;
- (5) Em modelos celulares, avaliar o efeito do tratamento agudo com 4-HNE sobre a atividade e expressão de Dicer;
- (6) Expressar a proteína Dicer *wild type* e mutante, com substituição dos resíduos de aminoácidos previamente identificados como alvos do 4-HNE;
- (7) Em ensaios *in vitro* com a proteína recombinante *wt* e *mut*, avaliar o efeito do aldeído 4-HNE sobre a estabilidade e atividade de Dicer.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Experimentos com animais: Sham x Disfunção Cardíaca

4.1.1. Amostra

O presente estudo teve a aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo (6/2016). Para a realização do projeto, foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* machos (200-250 gramas) provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan (São Paulo). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, localizado no prédio do ICB 3 da Universidade de São Paulo, com temperatura controlada entre 22°C – 25°C, ciclo claro-escuro 12:12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Esse estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.1.2. Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio

A cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio foi realizada em ratos com oito semanas de idade. Inicialmente, os animais foram anestesiados via inalatória com Isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil) e entubados para ventilação mecânica (70 pulsos/ minuto; 2,5 mL/pulso). Uma toracotomia esquerda, sob condições assépticas, foi realizada no terceiro espaço intercostal e o pericárdio aberto. No grupo “Disfunção Cardíaca” (DC) a artéria coronária descendente anterior foi ligada distalmente a 2mm de sua origem com fio de algodão/poliéster não absorvível (3-0 *PolySuture*, Covidien, Irlanda), finalizando com retirada do pneumotórax e fechamento do tórax. No grupo “Sham”, os animais foram submetidos ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a ligadura da artéria coronária esquerda. As cirurgias foram realizadas em nosso laboratório. No período pós-cirúrgico, os animais foram tratados com injeções subcutâneas de Dipirona (20mg/ dia) por 2 dias.

4.1.3. Tratamento

Quatro semanas após a cirurgia cardíaca de indução de infarto do miocárdio, os animais iniciaram um tratamento de quatro semanas com Alda-1 (10mg/Kg/dia) ou solução veículo (50% DMSO/ 50% PEG 400) por meio da implantação de mini-bombas osmóticas (Alzet, modelo 2 ml4, 2.5µL/hora) no dorso (Figura 8) (8). Os animais de ambos os grupos experimentais, “Disfunção Cardíaca” (n=12) e “Sham” (n=8), foram divididos em dois grupos adicionais de acordo com o tratamento recebido: (1) Sham tratado com veículo (n=4), (2) Sham tratado com Alda-1(n=4), (3) Disfunção Cardíaca tratado com veículo (n=6), e (4) Disfunção Cardíaca tratado com Alda-1 (n=6).

Alda-1 foi gentilmente cedida pela nossa colaboradora da Universidade de Stanford (EUA), Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen. Vale lembrar que a molécula Alda-1 é um modulador alostérico de ALDH2, enzima responsável pela remoção do 4-HNE. Para a implantação das mini-bombas osmóticas, os ratos foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil) via inalatória.

4.1.4. Avaliação da Função Ventricular

Para confirmar o desenvolvimento da disfunção cardíaca e avaliar o efeito do tratamento com Alda-1, a avaliação da função ventricular foi realizada por ecocardiografia modo M (monodimensional) em colaboração com o Dr. Paulo Magno Martins Dourado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a partir de um ecocardiógrafo (*Acuson Sequoia 512*, EUA) equipado com transdutor linear 15 megahertz. O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado em todos os animais 4 e 8 semanas após a cirurgia do infarto do miocárdio (Figura 8). Para realizar o procedimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) intraperitoneal. Foram obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DVE_d) e sistólico (DVE_s) final do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular na diástole (SIV_d), espessura do septo interventricular na sístole (SIV_s) e parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPVE_s) e diástole (PPVE_d). Essas medidas foram utilizadas para calcular a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FE), pela fórmula $FE (\%) = [(DVE_d - DVE_s) / DVE_d] \times 100$. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização de modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (52).

4.1.5. Eutanásia e coleta de tecidos

Vinte e quatro horas após o último exame ecocardiográfico, os animais (16 semanas) foram anestesiados com mistura de ketamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) intraperitoneal, e eutanasiados via decapitação. Coração, fígado e pulmões foram cuidadosamente dissecados e pesados. O peso total dos órgãos analisados foi corrigido pelo comprimento da tíbia e comparado entre os grupos. Amostras de coração e fígado foram congeladas em freezer -80°C para posteriores análises moleculares.

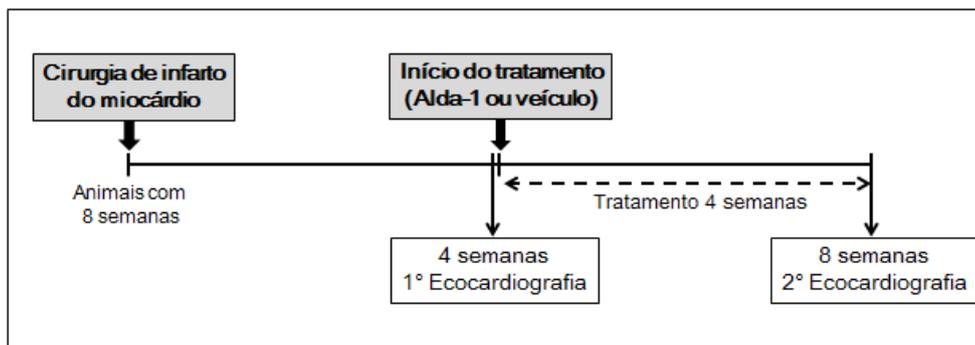


Figura 8. Esquema ilustrativo do desenho experimental.

4.2. Cultura de células

Foram utilizadas três linhagens celulares no presente estudo, a HEK 293 (*Human embryonic Kidney*) modificada (RNAi-293-EGFP/RFP) (53,54), e as linhagens imortalizadas de fibroblastos de camundongo (MEF; *wild type* e *Dcr -/-*) e de mioblastos de rato (H9C2). Todas foram mantidas sob as mesmas condições a 37°C e 5% CO₂ em meio DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma).

A linhagem RNAi-293-EGFP/RFP é caracterizada por expressar constitutivamente as proteínas EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) e RFP (*Red Fluorescent Protein*) e o shRNA anti-EGFP (*small hairpin RNA*). A linhagem, desenvolvida pelos grupos de Shan et al (2008) (53) e otimizada por Li et al (2012) (54), funciona como um sistema repórter para monitorar a via de processamento de siRNA (*small*

interfering RNA). O modelo prevê que alterações nas proteínas envolvidas no processamento do shRNA em siRNA anti-EGFP alteram os níveis finais de proteína alvo EGFP, e consequentemente, a fluorescência obtida. Considerando o mecanismo de ação do siRNA (degradação do mRNA EGFP), a fluorescência do EGFP será inversamente proporcional ao processamento do shRNA em siRNA (Figura 9). A fluorescência de EGFP foi normalizada pela RFP, uma proteína fluorescente normalizadora expressa constitutivamente no nosso modelo celular. Essa linhagem celular foi gentilmente cedida pelo nosso colaborador Prof. Dr. Marcelo Mori, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-SP).

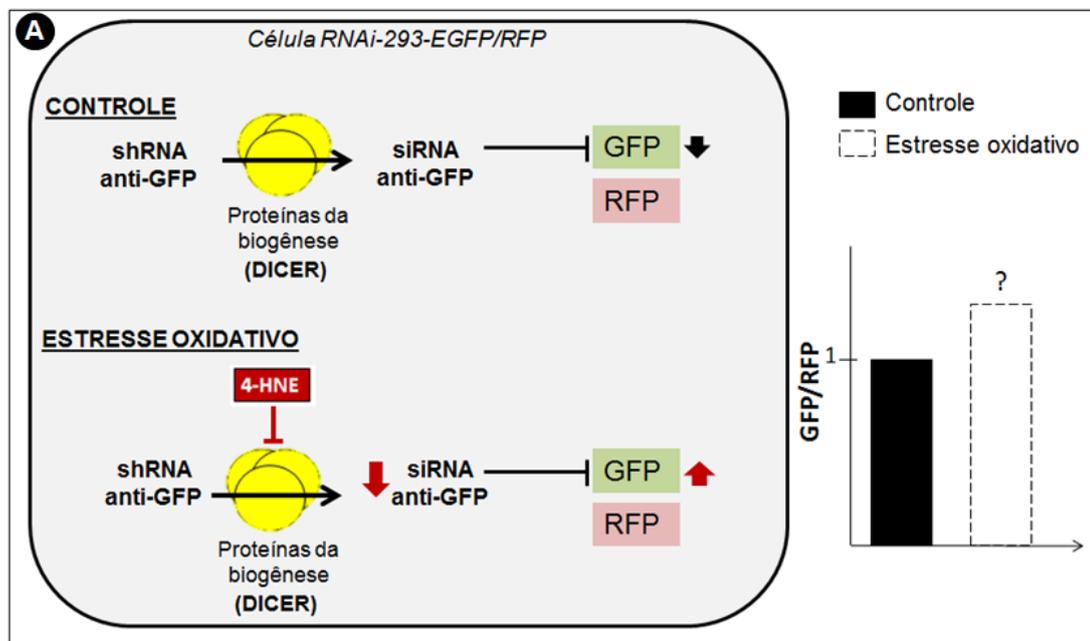


Figura 9. Esquema ilustrativo das células HEK 293 modificadas RNAi-293-EGFP/RFP. Modelo prevê que modificações nas proteínas (ilustradas em amarelo) envolvidas no processamento do shRNA anti-EGFP em siRNA anti-EGFP alteram os níveis finais de proteína EGFP. Considerando o mecanismo de ação do siRNA (degradação do mRNA EGFP), a fluorescência do EGFP é inversamente proporcional ao processamento do shRNA em siRNA; Além disso, a fluorescência EGFP é normalizada pela RFP (red fluorescent protein), uma proteína fluorescente normalizadora expressa constitutivamente no nosso modelo celular. No painel direito, o gráfico esquemático ilustra a resposta esperada em condições de estresse oxidativo e controle.

4.2.1. Tratamento com 4-HNE

O aldeído 4-HNE (Calbiochem, Millipore) foi adicionado diretamente no meio de cultura em dose única. A concentração selecionada para esse estudo foi de 50 μ M (diluição em etanol), a qual encontra-se no intervalo de tratamento mais utilizado em

trabalhos da literatura (38% de 179 estudos) (55). Vale mencionar que o aldeído interage com proteínas presentes no SFB (10%) do meio de cultura, de modo que a quantidade de 4-HNE que alcança as células deve ser inferior àquela fornecida inicialmente. Estima-se ainda que sua presença no meio de cultura dure aproximadamente entre 10-30 minutos (55,56). Como o objetivo desse ensaio era promover e avaliar o efeito agudo da interação entre 4-HNE e Dicer sobre a atividade da proteína, optamos por um tempo de exposição curto de 2 horas. Desse modo, esperávamos minimizar possíveis efeitos tardios do tratamento (ex.: *turnover* de proteínas, etc) sobre o *readout* (atividade de Dicer).

4.2.2. Morte Celular através da atividade da lactato desidrogenase (LDH)

O ensaio consiste na medida da atividade da enzima LDH liberada pelas células no meio de cultura por espectrofotometria. Uma vez que a lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica, sua presença no meio é um indicador de lise da membrana plasmática e marcador de morte celular.

Na reação foram adicionados piruvato de sódio 30 mM, NADH 6.6 mM, e Tris-HCl 200 mM (pH=7,3) em volume final de 200 µl. O ensaio baseia-se na conversão do piruvato em lactato, com geração concomitante de NAD⁺ a partir do NADH fornecido (pico de absorção em 340nm). A cinética enzimática de LDH foi analisada a partir das alterações na absorbância por um período de 30 minutos a 23°C.

4.3. Imunoprecipitação

Com a finalidade de avaliar a formação de adutos de 4-HNE com a proteína Dicer, realizamos o protocolo de imunoprecipitação da proteína seguido de *immunoblotting*.

Às amostras (500µg de proteínas) foi adicionado PBS (Cultilab, Brasil) até volume final de 1mL. Utilizando o método de captura indireto, a seguir, adicionou-se 20µL de *beads* de proteína A/G (*Protein A/G PLUS Agarose, Santa Cruz Biotechnology, EUA*), seguido de 1 hora de incubação em agitação leve a 4°C. Após esse período, adicionou-se 1 µg de anticorpo primário específico para a proteína alvo, no qual a amostra é incubada *overnight* em agitação leve a 4°C.

No dia seguinte, 40µL de *beads* de proteína A/G foram adicionados na amostra e seguiram-se 1-3 horas de incubação em agitação leve a 4°C. Nesse ponto, os

anticorpos já ligados à proteína alvo se ligam às *beads* adicionais. Posteriormente, foram realizadas centrifugações em baixa rotação e lavagens do *pellet* com PBS.

O último passo consiste na adição do tampão *Laemmli* e exposição das amostras à temperatura de 95°C por 5 minutos, de modo a liberar as *beads* da proteína e desnaturar a proteína. Após nova centrifugação, o sobrenadante é reservado e carregado em gel SDS-PAGE 6-8% para separação eletroforética da proteína, confirmação da eficiência do isolamento e análises por *imunoblotting*.

4.4. *Western Blotting*

Os níveis proteicos (ALDH2, DICER, TRBP, AGO2, pERK1/2, Casp3 clivada, GAPDH, α Tubulina) e os níveis de adutos de *Michael* entre 4-HNE-proteína foram analisados utilizando a técnica de *Western Blotting*. Primeiramente, foi adicionado o tampão *Laemmli* (TRIS-HCl 240 mM, SDS 0,8%, Glicerol 40%, Azul de bromofenol 0,02%, β -mercaptoetanol 200 mM) às amostras e, então, estas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. A seguir, as proteínas foram separadas de acordo com o seu peso molecular via eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8-12%) no aparelho para mini gel (Mini-Protean). Após separação, as mesmas foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando-se um aparelho Mini-Trans Blot da Bio-Rad. Para testar a eficácia dos procedimentos anteriores, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (0,1%).

Visto que a Dicer apresenta um alto peso molecular (~217kDa), o protocolo de transferência foi otimizado para análise dessa proteína. A transferência foi realizada *overnight* (16 horas) em 4°C, na potência de 45V, em tampão TRIS-Glicerina sem metanol. Para as demais proteínas analisadas, foi utilizado o protocolo padrão do laboratório, o qual consiste em 1:30h, na potência de 120V, em tampão com 20% de metanol.

Com o objetivo de minimizar as ligações inespecíficas do anticorpo primário com a membrana, a mesma foi incubada em 10 mL de solução bloqueadora (5% leite em TBS-T - Tris-Base 50 mM, NaCl 0,9%, *Tween* 20 0.1%) por 1 hora, em temperatura ambiente. Estas membranas foram, posteriormente, incubadas com os anticorpos primários para as respectivas proteínas (Tabela 1), diluídos em solução bloqueadora (1:1.000), a 4°C *overnight*. Na sequência, as mesmas foram lavadas 3x10 min com

TBS-T (Tris-Base 50 mM, NaCl 0,9%, Tween 20 0,1%), incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase (diluição 1:10.000). Por fim, a imunodeteccção foi realizada por quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (*Enhancer Chemi-Luminescence*, Amersham Biosciences, USA).

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados no método de western blot para análise da expressão relativa de proteínas.

As análises semi-quantitativas foram realizadas no programa gratuito *Image J* (*Scion Corporation based on NIH image*). Os valores obtidos para cada proteína

Anticorpos	Código
Anti-DICER	ab111971
Anti-DICER	ab167444
Anti-ALDH2	sc-48837
Anti-adutos de <i>Michael</i> de 4-HNE	Calb-393207
Anti-GAPDH	ImmunoChemical 2-RGM2
Anti-Tubulina	Sigma T6074
Anti-AGO2	ab180947
Anti-TRBP	ab156870
Anti-Caspase 3 clivada	Cell Signaling 9661
Anti-ERK1/2 fosforilada	Cell Signaling 19762

analisada foi dividido pelo valor da proteína normalizadora (amostra/normalizador da própria amostra). Quando as amostras eram divididas em mais de um gel (devido ao número de amostras), uma amostra do grupo controle era mantida em todos os géis e utilizada, posteriormente, para normalizar todas as amostras desse mesmo gel, fazendo com que os valores dos diferentes géis estivessem na mesma escala. As proteínas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e α -tubulina foram utilizadas como normalizador. Em alguns casos, o *Ponceau* foi utilizado para normalização.

As figuras apresentadas no decorrer do trabalho incluem apenas os *blots* representativos. As imagens completas de *western blotting*, com todas as amostras analisadas, podem ser encontradas no Anexo 7 (Figura S5).

4.5. Expressão gênica

4.5.1. Extração e avaliação do RNA total

Aproximadamente 100mg de tecido cardíaco foram cortados da região do ventrículo esquerdo (área remota) de cada um dos 20 animais. Este corte foi feito seguindo o procedimento padronizado pelo laboratório de nosso colaborador Prof. Dr. Edécio Cunha Neto (InCor), o qual foi otimizado para evitar o descongelamento do tecido, reduzindo as chances de degradação das amostras. Os tecidos foram mantidos em tubos *ependorf* 1,5mL dentro de nitrogênio líquido até o momento do corte, quando foram retirados do tubo e envolvidos em papel alumínio. Com a ajuda de um martelo, cada peça foi então quebrada em pedaços menores, os quais foram novamente imersos em nitrogênio e posteriormente pesados.

Os cortes foram colocados em tubos contendo esferas de cerâmica e o equipamento *Precllys* (Bertin Technologies) foi utilizado para lise e homogeneização. A lise foi realizada em tampão de lise do kit *mirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion, Estados Unidos) a 6.500rpm, 3 ciclos de 15 segundos com pausa de 10 segundos entre cada ciclo.

A extração foi realizada utilizando-se o kit *mirVana* (Ambion, Estados Unidos), seguindo-se o protocolo do fabricante. O material foi armazenado a -80°C.

4.5.2. Quantificação e integridade do RNA

A quantificação e a análise de pureza das amostras foram realizadas pelo aparelho de espectrofotometria NanoDrop TM 2000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EUA). O grau de pureza foi avaliado através das razões de absorbância 260/280 e 260/230. Foram consideradas satisfatórias as amostras cuja razão 260/280 foi de aproximadamente 2,0, e de 260/230 que estavam entre 1,8 e 2,2 (Anexo 1, Tabela S1).

O aparelho *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA) foi utilizado na avaliação da integridade das amostras de RNA. Esta tecnologia baseia-se na realização de uma eletroforese capilar e na utilização de fluoróforos que se ligam ao RNA aplicado na matriz do gel. Após realização da leitura, o aparelho gera eletroferogramas e calcula

a integridade das amostras baseando-se na razão entre a intensidade das bandas de rRNA 18S e 28S. O resultado é dado na forma de um *score* entre 0 a 10, chamado *RNA Integrity Number*, RIN. Um RIN acima de 5 indica RNA com boa qualidade, suficiente para ser utilizado em reações de PCR, enquanto que um RIN igual ou superior a 8 indica RNA com qualidade excelente e que pode ser utilizado para aplicações mais exigentes, como um *array* (Fleige; Pfaffl, 2006). Assim, nossas amostras obtiveram RINs excelentes, com média de 8,44, variando entre 7,8 e 9,3 (Anexos 1 e 2, Tabela S1 e Figura S1).

4.5.3. Transcrição Reversa

Para a análise de mRNA e pri-miRs, a transcrição reversa foi realizada utilizando-se OligodT e primers randômicos (*random primers*). Para esta reação, foram utilizados 0,5uL de oligodT (500ug/mL), 0,5uL de *random primers*, 1uL de dNTPs (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2,5ug de RNA, sendo aquecidos por 5 minutos a 65°C e 2 minutos a 42°C em termociclador (Verit, Applied Biosystems). Em seguida, foram adicionados 4uL de tampão 5x (250mM de TRIS-HCl, 375mM de KCl e 15mM de MgCl₂, pH 8,3), 2uL de DTT, 1uL de *RNAse OUT*™ e 1uL de *Super Script II* (200U/uL), de modo que a reação prosseguiu a 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, e 4°C até sua retirada do aparelho e armazenamento a -20°C.

Para as amostras de miRNA, as reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando-se um *pool* de primers específicos para cada miRNA. Um *pool* de 10 primers (Tabela 2) foi feito utilizando-se 2,5uL cada primer 20X para uma concentração final de 0,05X em 1mL (segundo protocolo disponibilizado pela *Applied Biosystems*). A transcrição reversa foi realizada utilizando-se 6uL do *pool* de primers, 3uL de amostra (90ng), 0,3uL dNTPs, 100mM com DTT, *Multiscribe Reverse Transcriptase* (50U/uL), 1,5uL de Tampão de transcrição reversa 10X, inibidor de RNAse (20U/uL) e água livre de nuclease. As amostras foram então colocadas no termociclador (*Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, EUA*), com velocidade máxima de rampa, e com o seguinte ciclo: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 4°C até retirado do equipamento e armazenamento a -20°C.

4.5.4. Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR) – método *Taqman*

A determinação da expressão relativa de primiRNAs, mRNAs e miRNAs foi realizada utilizando-se a Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR). As reações de qPCR, realizadas em triplicatas, foram montadas em placas de 384 poços (*MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate With Barcodes* – Thermo Fisher Scientific, EUA) e corridas no termociclador *QuantStudio™ 12K Flex* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Seguindo-se as recomendações do fabricante, cada reação continha: 10uL de *TaqMan Universal Master Mix II no UNG* (contendo a enzima *AmpliAq Gold® DNA polymerase*, dNTPs, tampão de enzima, MgCl₂, e a referência passiva de fluorescência ROX®) (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1uL do primer específico para o alvo de interesse (20X), 1,33uL da amostra de cDNA e 7,67uL de água livre de nucleases, em um total de 20uL de reação. O termociclador foi programado para a ciclagem padrão do fabricante de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Como normalizador das reações foi utilizado o gene endógeno ACTB (actina beta), o qual foi validado após avaliação de sua expressão nos diferentes grupos experimentais.

A quantificação da expressão relativa dos genes e miRNAs avaliados foi feita utilizando o método Ct (*Threshold Cycle*) comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (57). Onde Ct é o número do ciclo da reação de PCR no qual a fluorescência gerada cruza a linha de base (*threshold*). Os valores de Ct são logarítmicos e são inversamente relacionados à quantidade de produto amplificado (*amplicon*) gerado na reação (quanto menor o Ct, maior a quantidade de *amplicon* na reação). A expressão diferencial (*fold change*) entre os grupos foi calculada pela fórmula $2^{- (\Delta Ct \text{ do gene alvo} - \Delta Ct \text{ do gene endógeno})}$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), onde o gene alvo é o gene analisado e o gene endógeno foi o ACTB (ver Anexo 3, Figura S2.A). A lista de primers utilizados pode ser encontrada na Tabela 2. No caso dos microRNAs, a normalização foi feita a partir dos Cts médios dos miR-150 e miR-331, os quais não apresentaram variação entre os grupos analisados em estudo anterior (ver Anexo 3, Figura S2.B-D). A análise de *outliers* foi realizada através do software *online* gratuito *QuickCalcs Outlier Calculator* (GraphPad Software, <https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

Tabela 2. Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para o mRNA das proteínas da biogênese dos miRNAs.

Identificação do mRNA	Código
Dicer1	Hs00229023_m1
Drosha	Hs00203008_m1
TARBP2	Hs00998379_m1
DGCR8	Hs00256062_m1
AGO2	Hs01085579_m1
XPO5	Hs00382453_m1
ACTB	Hs01060665_g1

4.5.5. Análise da expressão de miRNAs cardíacos

Foram analisados seis miRNAs específicos de músculo (MiomiRs), amplamente expressos no coração: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-499 (ver Tabela 3). O objetivo dessa análise foi avaliar se os níveis dos miRNAs produzidos no coração estariam variando em função da condição e tratamento dos animais, e possível relação com alterações na via de biogênese.

Tabela 3. Relação de miRNAs e primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR.

Identificação dos miRNAs	Número de acesso no banco de dados*	Código
rno-miR-133a-3p	MIMAT0000839	002246
rno-miR-133a-5p	MIMAT0017124	464986
rno-miR-133b-3p	MIMAT0003126	002247
rno-miR-208a-3p	MIMAT0000880	463567
rno-miR-208a-5p	MIMAT0017155	462036
rno-miR-208b-3p	MIMAT0017845	002290
rno-miR-208b-5p	MIMAT0017844	461846
rno-miR-1b	MIMAT0037263	002222

rno-miR-499-3p	MIMAT0017227	002427
rno-miR-499-5p	MIMAT0003381	001352
mmu-miR-150-5p	MIMAT0000160	000473
mmu-miR-331-3p	MIMAT0000571	000545

*miRBase (<http://www.mirbase.org>)

4.6. Atividade de ALDH2

A atividade da enzima ALDH2 foi avaliada por espectrofotometria (19). Na reação, são adicionados pirofosfato de sódio (50mM, pH 9,5), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺ – 2,5mM), acetaldeído (10mM) e DL-Ditiotreitol (DTT - 0,1%) em volume final de 200µL. O ensaio baseia-se na oxidação do acetaldeído, um aldeído produto do metabolismo primário do etanol (Figura 10), em ácido acético e geração do NADH (forma reduzida), a partir do NAD⁺ (forma oxidada) fornecido. A cinética enzimática de ALDH2 foi analisada a partir das alterações na absorbância decorrentes da formação de NADH (pico de absorção em 340nm), por um período de 20 minutos.

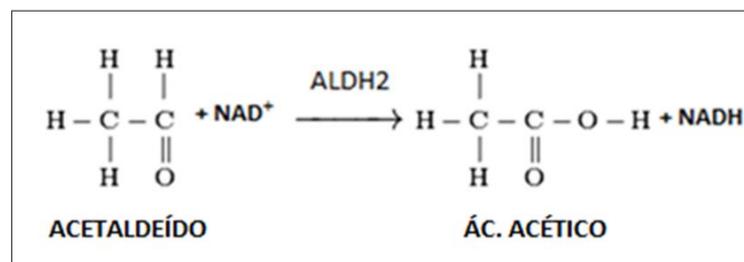


Figura 10. Oxidação do acetaldeído pela ALDH2: Aldeído Desidrogenase 2.

4.7. Análise da via de processamento de shRNA em células RNAi-293-EGFP/RFP sob estresse oxidativo induzido

Com a finalidade de avaliar se há comprometimento da via de processamento do shRNA em siRNA em condições de estresse de aldeídos, e o possível papel protetor da enzima ALDH2, a linhagem RNAi-293-EGFP/RFP (HEK 293 modificada) (Figura 9) foi exposta ao aldeído 4-HNE em diferentes concentrações (5µM, 25 µM e 50 µM; diluição em etanol) (55), com e sem adição de Alda-1, ativador da atividade de ALDH2.

As células foram mantidas em placas de cultura de 96 poços (TPP), contendo $2,0 \times 10^4$ células/poço, sendo cada coluna (8 poços), posteriormente, utilizada para um tratamento distinto (n=8). Para verificar a existência de efeito temporal dos tratamentos sobre a resposta celular ao estresse, a fluorescência celular foi analisada em diferentes períodos: 30 minutos, de hora em hora entre a 1^a-12^a horas. Detalhes sobre a análise de fluorescência são fornecidos no item 4.9 e Figura 9.

O Enoxacino (50 μ M) foi utilizado como controle positivo do constructo celular, uma vez que possui a capacidade de aumentar a produção de siRNA (53). As concentrações do Enoxacino e da solução veículo de Alda-1, o solvente orgânico DMSO (sulfóxido de dimetilo – 0,25%), foram testadas previamente em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Marcelo Mori. Adicionalmente, foram utilizados controles sem adição do agente estressor (4-HNE), com e sem acréscimo de DMSO (0,25%), com Alda-1.

4.8. Análise da atividade de DICER

Para as análises da atividade da endonuclease DICER foram utilizados diferentes métodos, de acordo com o material (lisado celular/tecidual ou proteína recombinante). Nos itens a seguir estão listadas as três metodologias usadas no estudo.

4.8.1. *Molecular Beacon* - hsa-pre-miR-122

A atividade de Dicer foi avaliada *in vitro* através do uso da sonda molecular (*molecular beacon*) FAM-hsa-pre-miR-122-DABCYL, sintetizada pela GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO, EUA), a qual corresponde ao pre-miR-122 humano ligado ao fluoróforo FAM e ao *quencher* DABCYL nas extremidades 5' e 3', respectivamente (sequência - 5'FAM-CAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCCAU UA UCACACUAAAUAGCUACUGC-DABCYL 3'). O ensaio baseia-se na clivagem específica da sonda pela DICER, a qual é acompanhada de emissão de fluorescência, uma vez que o processo distancia o fluoróforo (FAM) do apagador (DAB) (58). Desse modo, é possível correlacionar a emissão de fluorescência à atividade de DICER (Figura 11.A e C).

O ensaio foi realizado em lisado de células e tecido cardíaco nas condições experimentais descritas em itens anteriores. A concentração da sonda padronizada durante o desenvolvimento do projeto foi de 50nM em volume final de 100µL, com o período de análise de fluorescência entre 2-3h a 37°C.

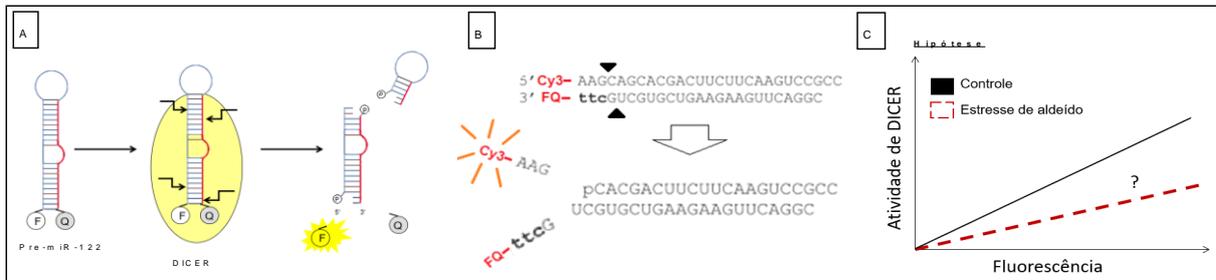


Figura 11. Esquema ilustrativo das sondas moleculares baseadas em fluorescência. Ao lisado celular e/ou tecidual foi adicionada uma sonda molecular (molecular beacon), que consiste no substrato da Dicer; **(A)** molécula precursora do miR-122 (Pre-miR-122) marcada com um fluoróforo (F) e um quencher (Q); **(B)** Duplex de RNA marcado com um fluoróforo (Cy3) e um "quencher" (FQ); destaque em negrito para as bases de DNA (TTC) adicionadas na extremidade de uma das fitas de RNA; as setas pretas indicam os pontos de clivagem pela DICER; **(C)** Gráfico esquemático da hipótese; a clivagem do substrato de RNA em ambos os modelos ocorre via DICER, e a liberação do fluoróforo no processo emite fluorescência, de modo que a atividade de DICER pode ser correlacionada aos níveis de fluorescência.

4.8.2. Molecular Beacon – duplex de RNA/DNA

Durante o estágio no exterior no laboratório do Prof. Dr. Ian MacRae, desenvolvemos um novo ensaio de atividade de Dicer *in vitro*. De modo semelhante ao primeiro, o ensaio baseia-se na clivagem específica do substrato de RNA pela DICER, acompanhada de emissão de fluorescência. Nesse modelo, o substrato consiste em uma "quimera" de RNA dupla fita (dsRNA) e DNA ligado a um fluoróforo e um *quencher* (5'-CY3 - 3'-Iowa Black® FQ) (iDT) (59), onde uma das extremidades apresenta 2 nucleotídeos extras não pareados (3' *overhang*) (sítio reconhecido pela Dicer), e a outra possui o mesmo comprimento e total complementaridade (*blunt end*) somada à adição das bases de DNA (sítio não reconhecido por Dicer) (Figura 11.B). As seqüências de ambas as fitas de RNA do constructo estão listadas na Tabela 4. O desenho do substrato está fundamentado no trabalho de Scott D. Rose e colaboradores (2005), o qual descreveu a formação de dois produtos de clivagem após processamento desse substrato por Dicer (60). No anexo 4 (Figura S3), pode ser observada a confirmação dos dois produtos de clivagem em ensaio *in vitro*

realizado com a proteína Dicer *wt* recombinante. Tal característica é importante, uma vez que permite a confirmação da especificidade da clivagem.

Todos os ensaios foram conduzidos por ~2 horas (ou até atingir um *plateau*) a 37°C em tampão de ensaio (20mM TRIS-HCl, 12.5mM NaCl, 2,5mM MgCl₂, pH 6.8, 50-100nM *beacon*) (58). Da mesma forma que a primeira sonda molecular, esse ensaio foi utilizado para a avaliação da atividade de Dicer em lisado celular.

Tabela 4. Sequência das fitas de RNA da sonda molecular (molecular beacon).

Sequência das fitas de RNA (5' → 3')
5CY3-rArArGrCrArGrCrArGrCrArGrCrUrUrCrUrUrCrArArGrUrCrCrGrCrC
5Phos-rCrGrGrArCrUrUrGrArArGrArArGrUrCrGrUrGrCrUrG CTT -FQ

*rN, base de RNA; N negrito, base de DNA.

4.8.3. Substrato de RNA radioativo (³²P)

Esse ensaio foi utilizado para a análise da atividade da Dicer recombinante (*wt* e *mut*) em condição basal e frente exposição ao 4-HNE. As proteínas utilizadas foram produzidas conforme descrito no item 4.11. Todos os ensaios foram conduzidos por 1 hora a 37°C em tampão de reação (20mM Tris-HCl, 12.5mM NaCl, 2.5mM MgCl₂, pH 6.8) (58), com adição de tRNA na concentração final de 0.25mg/mL.

O substrato utilizado consistiu em um RNA de dupla fita (34nt) marcado com o isótopo radioativo de fósforo ³²P na extremidade 5' de uma das fitas (ver sequência na Figura 12.A) (61). O substrato foi desenhado de tal modo que foi possível avaliar simultaneamente a atividade de ambos os domínios RNaseIII A e B de Dicer, visto que os mesmos geravam produtos marcados com comprimentos distintos, 12nt e 22nt, respectivamente. Vale mencionar que a concentração da enzima na reação foi ajustada de tal modo que a taxa de formação do produto encontrava-se em sua fase linear ou, em outras palavras, a fase onde a clivagem de RNA pela Dicer era diretamente proporcional a quantia de enzima.

Para avaliar o efeito de 4-HNE sobre a atividade de Dicer, a enzima foi pré-incubada com o aldeído (Millipore-Sigma) em diferentes concentrações (10uM-1mM) a 37°C antes da adição do substrato de RNA e início do ensaio de atividade (Figura

filtros FITC (comprimentos de onda de excitação e emissão de aproximadamente 495 nm/518 nm, respectivamente), para detecção de EGFP e, *Texas Red* para RFP (615 nm/615 nm). Os dados coletados foram analisados através dos programas gratuitos *Image J* (*Scion Corporation based on NIH image*) e *Python* versão 3.5.1 (*Python Software Foundation*).

A análise de fluorescência das sondas moleculares (Item 4.8 e 4.9) foi realizada no fluorímetro *Biotek™ Synergy 2 Microplate Reader* (*Fisher Scientific*, EUA), com uso do filtro para 6-FAM (494 nm/520 nm) e Cy3 (530nm/ 570nm). Para a obtenção dos dados foi utilizado o *software* do próprio equipamento Gen5™ (*Fisher Scientific*, EUA).

4.10. Alinhamento Múltiplo da sequência primária de DICER

A sequência primária de aminoácidos da proteína DICER de todas as espécies listadas no projeto, assim como a anotação de seus domínios funcionais, foram obtidas no banco de dados Uniprot (disponível em <http://www.uniprot.org/>). O alinhamento múltiplo das sequências primárias foi realizado através do Software gratuito *Jalview 2* (62), com base na matriz de substituição BLOSUM62 (BLOcks SUBstitution Matrix) (Figura 6.C).

4.11. Expressão e purificação de DICER recombinante

Resumidamente, DICER recombinante (*wt* e mutante) foi produzida em células de inseto da linhagem sf9 (*Spodoptera frugiperda*), por meio do sistema de baculovírus (*Bac-to-Bac*; Invitrogen) (63). As proteínas expressas em células sf9 foram purificadas pela combinação de três técnicas: purificação por afinidade com resina Ni-NTA (Qiagen), coluna *HisTrap Ni-NTA* (GE Healthcare) e cromatografia de exclusão (gel filtração) em Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) (63). A concentração de proteínas foi mensurada via ensaio de *Bradford*.

Os experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Ian MacRae (*Scripps Research Institute*, San Diego/CA – EUA) durante o período de estágio no exterior (Bolsa Fapesp 2017/14426-0).

4.12. Mutação sítio-específica de DICER

Com o objetivo de avaliar o papel dos resíduos de DICER pré-identificados como alvos do 4-HNE (K1324, H1325, H1339) na resposta da proteína ao estresse de aldeídos, foram produzidas proteínas recombinantes mutantes, onde os aminoácidos alvos foram substituídos por Alanina em duas diferentes combinações: K1324A e H1325A (dupla mutação, mutante DICER 1); K1324A, H1325A e H1339A (tripla mutação, mutante DICER 2) (Figura 13.A).

Adicionalmente, uma terceira proteína mutante foi produzida (L1323F e V1351F; dupla mutação, mutante DICER 3) (Figura 13.B), baseada no modelo computacional de interação entre DICER-4-HNE desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Guilherme Menegon Arantes, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo. Este modelo prevê que o aldeído estaria ancorado a um potencial sítio hidrofóbico localizado no domínio RNaseIIIa de DICER, em proximidade com os sítio pré-identificados K1324 e H1325. De acordo com esse modelo, a substituição dos aminoácidos por fenilalanina (Phe) nesse sítio, em teoria, iria impedir fisicamente a interação do 4-HNE com o sítio hidrofóbico e, conseqüentemente, com o domínio de Dicer. Notavelmente, o trabalho recém publicado por Liu Z e colaboradores (2018) confirmou a presença do núcleo hidrofóbico modelado em nosso estudo na estrutura resolvida de Dicer (4.4Å) (26).

Para introdução sítio específica das mutações no gene de Dicer, foi utilizado o kit comercial NEBuilder® HiFi DNA Assembly (New England Biolabs), seguindo-se o protocolo fornecido pela empresa. As mutações foram inseridas no vetor pFastBac para uso posterior no sistema de baculovírus e expressão da proteína recombinante (Item 4.11). Todos os constructos foram confirmados via sequenciamento, método de Sanger. Para amplificação do plasmídeo foi utilizada a bactéria competente *E. Coli* OminiMAX (Thermo Fisher Scientific). As seqüências dos *primers* utilizados para a inserção das mutações podem ser encontradas na Tabela S2 (Anexo 5), assim como uma imagem ilustrativa da localização dos primers no vetor (Figura S3).

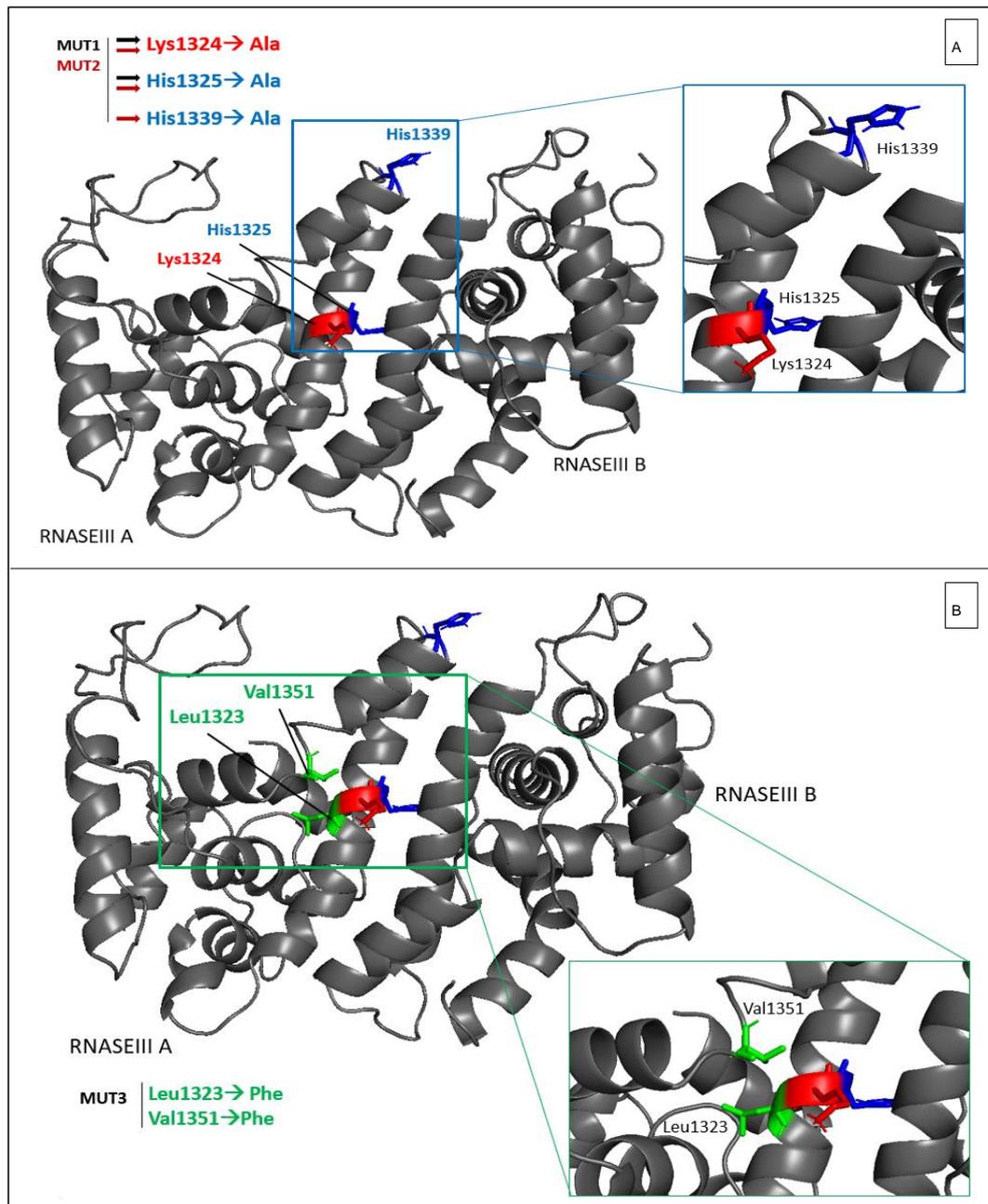


Figura 13. Modelo computacional do domínio RNaseIIIA e domínio RNaseIIIB (PDB - 2EB1) (64) de DICER. (A) Localização das mutações 1 (K1324A, H1325A) e 2 (K1324A, H1325A, H1339A); (B) Localização das mutações 3 (L1323F, V1351F); resíduos substituídos destacados em verde. Fonte própria. Imagens confeccionadas no software PyMOL.

4.13. Transfecção e superexpressão de DICER em cultura celular

Células da linhagem MEF *knockout* para a proteína DICER (MEF Dicer1 *-/-*) (Anexo 8, Figura S6) (65) foram transfectadas com vetor pcDNA5 codificando Dicer *wild type*. Para a transfecção foi utilizada a Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), seguindo-se o protocolo do fornecedor. Utilizamos 2,5µg de DNA (2µL de

Lipofectamina por 1µg de DNA). As células foram transfectadas por um período de 24 horas. Tanto a linhagem celular como o plasmídeo foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ian J. MacRae.

4.14. Análise da atividade de clivagem da Argonauta 2 (AGO2)

O ensaio consiste em incubar a proteína AGO2 recombinante (26nM) pré-carregada com uma fita guia de RNA (miR-122) com um substrato de RNA complementar marcado com ³²P (100nM) em volume final de 20µL (63). Sabe-se que quando há o pareamento perfeito miRNA- RNA alvo, a proteína AGO2 cliva seu substrato, gerando um produto menor marcado com ³²P. Desse modo, torna-se possível a avaliação da atividade de clivagem de AGO2. Os ensaios foram realizados na temperatura de 37°C por 30 minutos em tampão de ensaio (100nM NaCl, 20mM Tris, 2mM MgCl₂ e 0.5mM TCEP; pH 8.0). tRNA foi adicionado na reação na concentração final de 0.10 mg/mL. A reação foi interrompida com a adição de formamida (20µL). Como descrito previamente, os produtos da reação foram analisados em gel PAGE desnaturante (15%) e visualizado com o auxílio do Typhoon Scanner 9410 (GE Healthcare). Os resultados estão apresentados como porcentagem do grupo controle.

4.15. Análise estatística

Para as análises de normalidade das variáveis foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk*. Variáveis com distribuição normal foram analisadas posteriormente pela Análise de Variância (ANOVA) de um ou dois caminhos, seguida de *post hoc* de *Dunnnett* e *Sidak*, respectivamente. Com relação às variáveis sem distribuição normal e aquelas com número amostral pequeno, foram adotados testes não paramétricos, *Kruskal-Wallis* seguido de *post hoc* de *Dunn*. Foram adotados como estatisticamente significativos os resultados com $p \leq 0,05$.

A análise dos dados e a confecção dos gráficos foram feitos no programa *GraphPad Prism®*, versão 7.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

Os resultados estão divididos de acordo com o modelo experimental adotado: (I) animais (*in vivo*), (II) linhagens celulares (H9C2, MEF, HEK293) e (III) proteína recombinante (*in vitro*). O resumo esquemático de todas as etapas, assim como as principais perguntas a serem respondidas por cada modelo, podem ser encontrados na Figura 14.

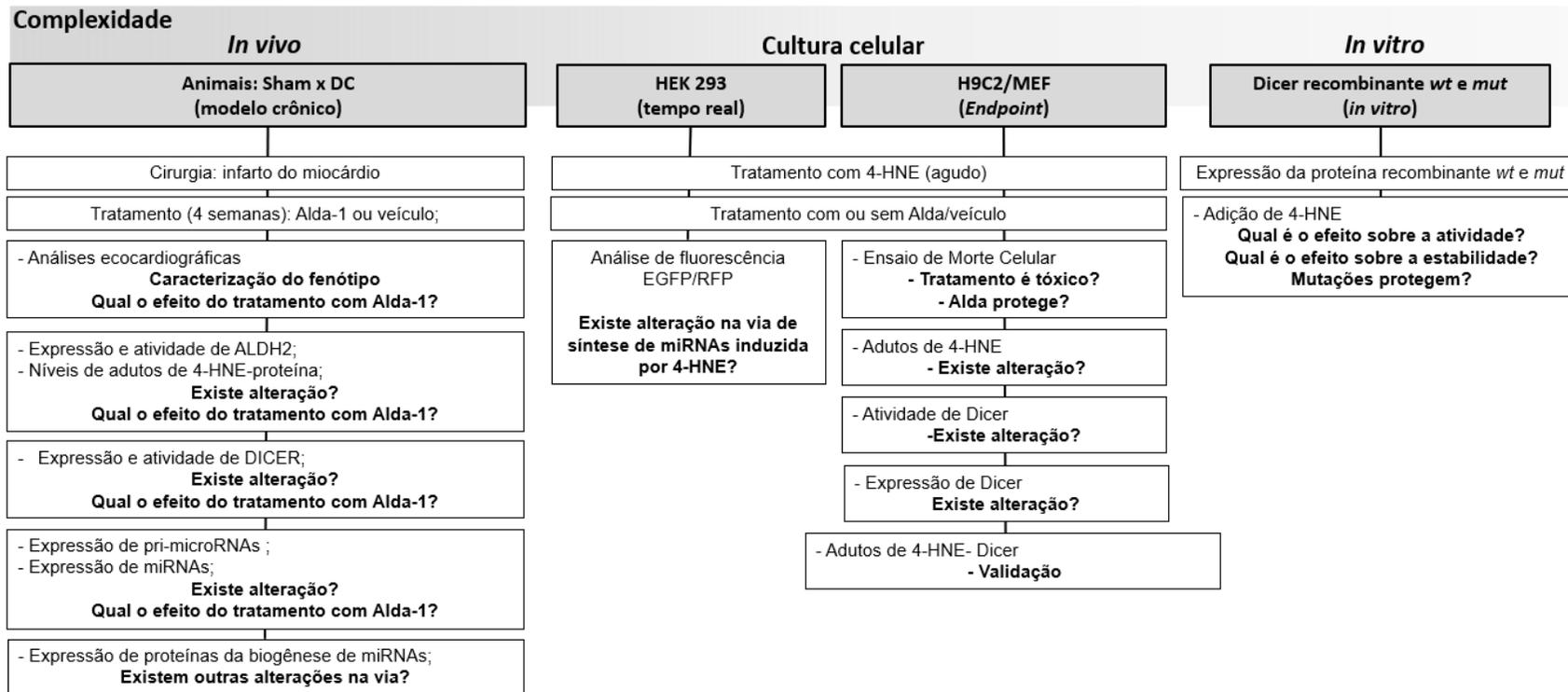


Figura 14. Fluxograma representativo dos modelos experimentais utilizados no trabalho e dos ensaios realizados (ou planejados). Em destaque (negrito), as principais perguntas a serem respondidas por etapa.

5.1. Experimentos em animais: sham x disfunção cardíaca tratados com Alda-1 ou veículo

Originalmente, para o desenvolvimento desse estudo, iríamos utilizar as amostras do trabalho conduzido pela aluna Kátia Gomes durante o seu mestrado no laboratório (2012-2014) (8), uma vez que as análises que identificaram a Dicer como um dos alvos do aldeído 4-HNE foram realizadas nesse material. Contudo, em vista da escassez e reduzida qualidade das amostras (em decorrência do tempo de armazenamento) para realização de todas as análises propostas, decidimos repetir o experimento em um novo lote de animais, o qual teve aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (6/2016).

Nos itens seguintes, seguem os dados relacionados à caracterização do fenótipo dos animais do novo lote experimental.

5.1.1. Caracterização do fenótipo: análises ecocardiográficas

Como previsto em protocolo (Item 4.1.4), os animais foram submetidos a dois exames ecocardiográficos durante o estudo, sendo eles realizados 4 (Pré-tratamento) e 8 semanas (Pós-tratamento) após a cirurgia de indução de infarto do miocárdio (IM) (Figura 15.A). O primeiro teve como objetivo obter os valores basais de cada animal pós-cirurgia, identificar aqueles que desenvolveram disfunção cardíaca ($FE < 30\%$) e dividir os grupos experimentais por condição (Sham e DC) e tratamento (Alda-1 ou seu veículo). O segundo, por sua vez, tinha o intuito de avaliar o efeito do tratamento sobre a função cardíaca e remodelamento ventricular esquerdo após IM. Os resultados de ambos os ecocardiogramas estão apresentados na Tabela S3 (Anexo 6) e representados graficamente na Figura 15. B-H.

Como pode ser observado, os animais que passaram pela cirurgia de ligadura da artéria coronária (grupo DC) apresentaram redução significativa na fração de encurtamento ventricular esquerda após 4 semanas (Figura 15.B, Pré-tratamento), a qual foi acompanhada por dilatação da câmara ventricular esquerda, condição caracterizada por aumento significativo no diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole e sístole (Figura 15.D e G, Pré-tratamento). Com relação aos demais dados ecocardiográficos avaliados, não houve alteração significativa na espessura da

parede do ventrículo esquerdo em diástole e sístole (Figura 15.E e H, Pré-tratamento) e na espessura do septo interventricular em diástole, contudo, a última apresentou redução significativa na sístole oito semanas após a cirurgia (Figura 15.C e F, Pós-tratamento).

Após quatro semanas de tratamento com Alda-1, contudo, não verificamos uma melhora nos parâmetros analisados no grupo Disfunção Cardíaca (DC Alda-1) quando comparados com o grupo DC tratado com seu veículo (DC veículo) (Figura 15. B-H, Pós-tratamento). Resultado que não corrobora ao observado no primeiro trabalho de Gomes e colaboradores (2014) (8). Vale ressaltar que no estudo da Katia Gomes os animais infartados foram tratados com Alda-1 por um período maior (6 semanas).

Desse modo, a cirurgia foi capaz de induzir a disfunção cardíaca nos animais, os quais tiveram prejuízo na função cardíaca (redução da FE) e dilatação da câmara ventricular, contudo, o experimento realizado não conseguiu reproduzir o fenótipo encontrado previamente no laboratório, no qual os animais tratados com Alda-1 apresentaram melhora na função cardíaca, quando comparados com aqueles tratados com veículo (8).

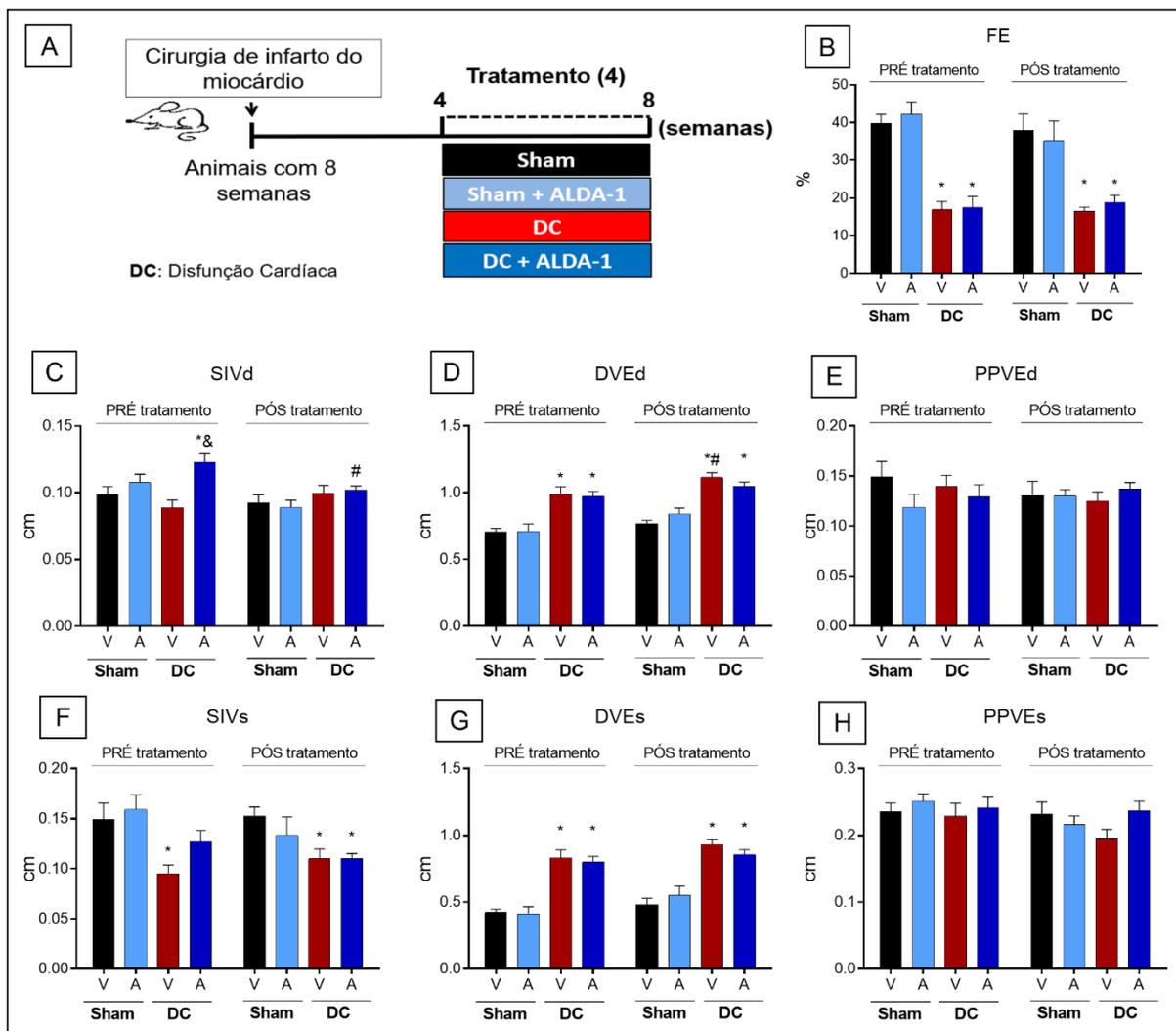


Figura 15. Delineamento experimental e representação gráfica das análises ecocardiográficas pré e pós tratamento dos grupos Sham Veículo (Sham V), Sham Alda-1 (Sham A), Disfunção Cardíaca veículo (DC V) veículo e Disfunção Cardíaca Alda-1 (DC A). (A) Esquema ilustrativo do delineamento experimental; (B) Fração de Encurtamento (FE); (C) Septo intraventricular na diástole (SIVd), (D) Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE), (E) Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEd), (F) Septo intraventricular na sístole (SIVs), (G) Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE), (H) Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVEs). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA duas vias, seguida de *post hoc* de Bonferroni. * $p \leq 0.05$ vs Sham veículo; # $p \leq 0.05$ vs Pré-tratamento; & $p \leq 0.05$ vs DC veículo.

5.1.2. Perfil de expressão e atividade da enzima ALDH2 e níveis de adutos de 4-HNE com proteínas

Os próximos passos envolveram a avaliação da efetividade do tratamento com Alda-1 na ativação da enzima ALDH2 mitocondrial e remoção do aldeído 4-HNE. Uma

vez que o objetivo central do projeto consistia na avaliação do efeito do 4-HNE sobre a proteína Dicer, assim como um possível papel protetor de Alda-1 sobre a resposta, essa caracterização se fez muito importante para as etapas seguintes. Para tanto, inicialmente, tanto a atividade como a expressão da enzima foram avaliados em amostra do ventrículo esquerdo dos animais (área remota – livre de infarto).

Como pode ser observado na figura 16.A e B, os animais não apresentaram diferença significativa na expressão proteica de ALDH2 independentemente da condição ou tratamento. Com relação à atividade da enzima, como descrito anteriormente, ela foi avaliada por ensaio de cinética via espectrofotometria no lisado de tecido cardíaco de duas formas distintas, com (Figura 16.D) ou sem (Figura 16.C) adição de Alda-1/DMSO. Inicialmente, a atividade de ALDH2 foi avaliada sem adição do tratamento, contudo, como Alda-1 é uma molécula pequena e instável no lisado, não detectamos sua ação sobre a proteína no momento do ensaio, como pode ser observado na Figura 16.C, onde não há diferenças na atividade da enzima entre nenhum dos grupos analisados.

Para confirmar a ação de Alda-1 sobre a enzima ALDH2 nos animais tratados e estimar o seu efeito no tecido, seu lisado foi tratado com 20 μ M de Alda-1 ou DMSO (veículo) *in vitro* (incubação por 10 minutos em gelo), e um novo ensaio foi realizado (8). O resultado do último teste está representado graficamente na Figura 16.D, onde é possível verificar que os animais DC tratados com Alda-1 apresentaram maior atividade da ALDH2 quando comparados com o grupo DC veículo, porém nenhum dos grupos diferiu significativamente dos animais dos grupos Sham.

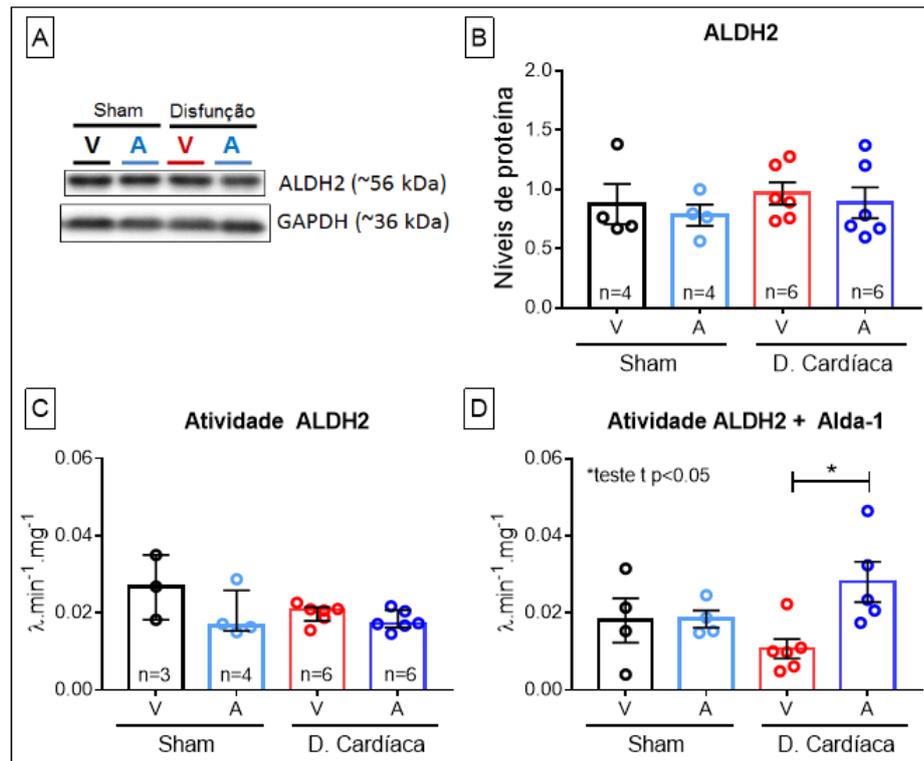


Figura 16. Expressão e atividade de ALDH2 em tecido cardíaco de animais Sham (S) e Disfunção Cardíaca (DC) tratados com Alda-1 (A) e veículo (V); (A) Blot representativo da proteína ALDH2 em lisado total de tecido cardíaco; o carregamento no gel foi normalizado por GAPDH, e a normalização entre os diferentes géis foi realizada via amostra 20, presente nos dois géis; Sendo V, veículo; A, Alda; **(B)** Quantificação dos níveis proteicos de ALDH2; Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via, seguido de *post hoc* de Dunnett; **(C)** Atividade de ALDH2 em lisado total de tecido cardíaco; Os dados estão representados como mediana e intervalos interquartis; eles foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de *post hoc* de Dunn; **(D)** Atividade de ALDH2 em lisado total de tecido cardíaco após 10 minutos de incubação com Alda-1 (20 μ M) ou veículo (DMSO); Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via, seguido de teste t entre grupos D. Cardíaca V x A, * $p < 0,05$.

A ALDH2 é uma das principais enzimas envolvidas na metabolização do aldeído 4-HNE, produto do processo de peroxidação lipídica e amplamente produzido em condições de estresse oxidativo (15). Nesse contexto, com o objetivo de verificar se o tratamento com Alda-1 foi eficiente na remoção do aldeído, ao aumentar a atividade de ALDH2, foram avaliados os níveis de adutos de *Michael* de 4-HNE com proteínas através da técnica de *western blot* no lisado de tecido cardíaco dos animais. Os resultados estão resumidos na Figura 17.

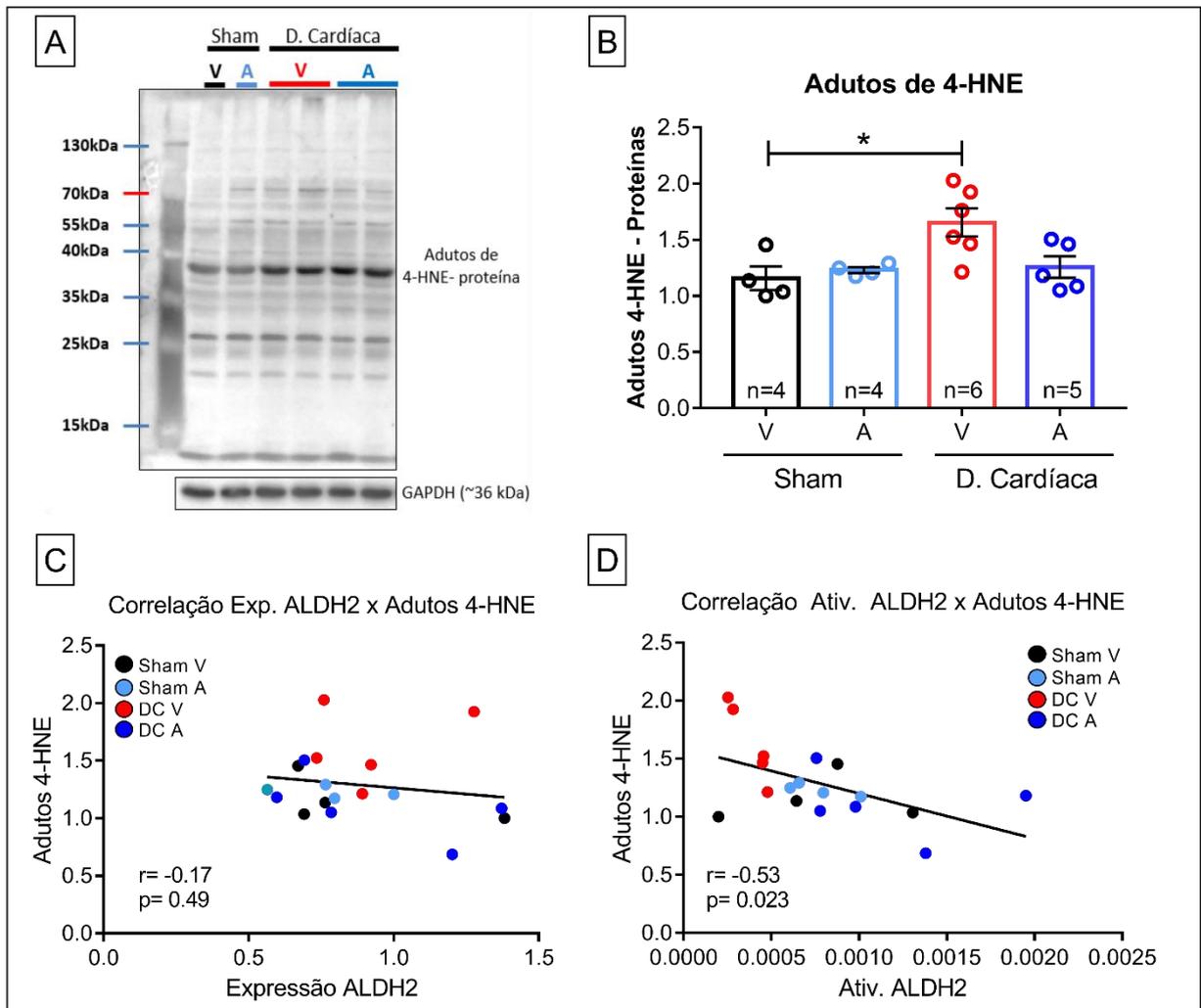


Figura 17. Adutos de 4-HNE com proteínas em tecido cardíaco de animais Sham (S) e Disfunção Cardíaca (DC) tratados com Alda-1 (A) e veículo (V); (A) Blot representativo dos adutos de Michael entre 4-HNE e proteínas, o carregamento no gel foi normalizado por GAPDH, e a normalização entre os diferentes géis foi realizada pela amostra 21, presente nos dois géis; Sendo V, veículo; A, Alda; **(B)** Quantificação dos adutos de 4-HNE com proteínas; Os dados estão representados como média ± Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via, seguido de *post hoc* de Dunnett, sendo * $p < 0.05$ vs Sham V; **(C)** Análise de correlação de Pearson entre expressão proteica de ALDH2 e adutos de 4-HNE-proteínas; **(D)** Análise de correlação de Pearson entre atividade de ALDH2 (+ Alda-1) e adutos de 4-HNE-proteínas; r, coeficiente de correlação de Pearson; p, valor de alfa (significativo quando $p < 0.05$).

Ao final de 8 semanas após a cirurgia de IM, sendo 4 delas de tratamento, os animais com disfunção cardíaca tratados apenas com veículo apresentaram aumento significativo nos níveis de adutos de 4-HNE-proteína quando comparados com aqueles do grupo Sham (Figura 17.A-B). Por sua vez, os animais com DC tratados com Alda-1 não apresentaram alteração nos níveis de 4-HNE. Com a finalidade de avaliar se os níveis de adutos de 4-HNE estariam relacionados à expressão ou à atividade da enzima ALDH2, foi feita uma análise de correlação entre essas variáveis.

Como pode ser observado nos gráficos da Figura 17. C e D, os níveis de 4-HNE não apresentaram correlação com a expressão proteica da enzima, porém, exibiram uma correlação negativa significativa com a atividade de ALDH2, ou seja, os maiores níveis de 4-HNE foram encontrados, principalmente, nos animais cuja atividade de ALDH2 era menor.

Esses resultados sugerem que há aumento na produção de 4-HNE no coração dos animais com disfunção cardíaca e que a atividade da enzima foi, possivelmente, um dos fatores determinantes nos níveis de aldeído no tecido, não a sua expressão proteica, visto que essa não variou entre os grupos. Dessa forma, o tratamento com Alda-1 demonstrou ser eficiente tanto na ativação da proteína como na remoção do aldeído alvo nesses animais. A resposta encontrada corrobora com aquela observada por Gomes e colaboradores (2014) (8).

A formação de adutos de *Michael* entre 4-HNE e alvos biológicos, como DNA, lipídios e proteínas, é capaz de inativar, modificar a atividade e função dos mesmos, ou até levá-los a degradação. Em estudo anterior do laboratório, a proteína Dicer foi identificada como um dos alvos do aldeído em animais com disfunção cardíaca de etiologia isquêmica, e tal interação foi minimizada nos animais tratados com Alda-1 (dados não publicados). Contudo, não há registros na literatura sobre tal interação e sobre o efeito da mesma na proteína. Nos próximos itens, irei discorrer sobre os resultados obtidos nas análises da Dicer e da biogênese de miRNAs.

5.1.3. Perfil de expressão e atividade de DICER

Após a caracterização do fenótipo dos animais e avaliação da eficiência do tratamento com Alda-1 com relação à remoção do 4-HNE no coração dos animais tratados, o próximo passo consistiu na análise da expressão e atividade da Dicer no tecido cardíaco. Como pode ser observado na Figura 18. A-C, não foram encontradas alterações significativas nos níveis de mRNA (Figura 18.C) e proteína (Figuras 18.A-B) de Dicer entre os grupos. Contudo, ao avaliar-se o processamento de pre-miRNAs pela enzima (*in vitro*), foi possível verificar uma redução significativa de $47\% \pm 8,7\%$ ($p=0,017$) na atividade de Dicer no grupo Disfunção Cardíaca tratado com veículo (DC V), quando comparado aos animais Sham veículo (Sham V) (Figura 18.D). Os animais

DC tratados com Alda-1 (DC A) apresentaram uma tendência à diminuição da atividade, porém, não foi estatisticamente significativa ($p=0.19$).

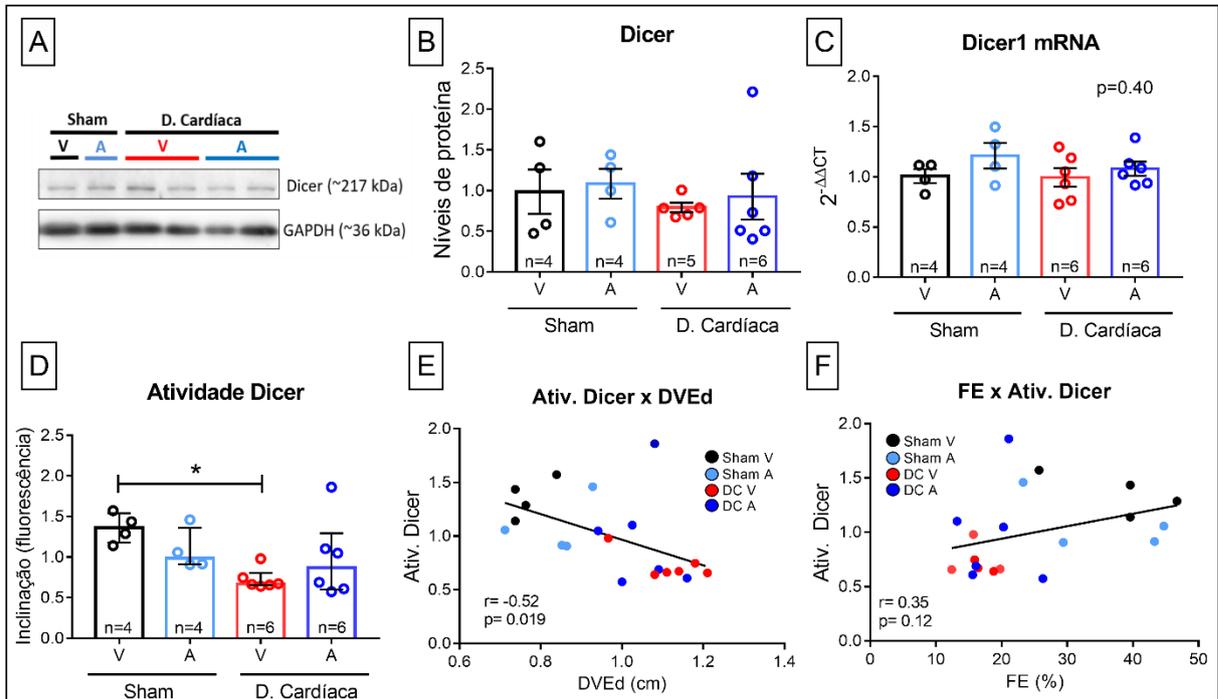


Figura 18. Expressão gênica e proteica e atividade de DICER em tecido cardíaco de animais Sham (S) e Disfunção Cardíaca (DC) tratados com Alda-1 (A) e veículo (V); (A) Blot representativo da proteína Dicer, o carregamento no gel foi normalizado por GAPDH, e a normalização entre os diferentes géis foi realizada pela amostra 20, presente nos dois géis; Sendo V, veículo; A, Alda; **(B)** Quantificação dos níveis proteicos de Dicer; **(C)** Expressão relativa de mRNA de Dicer1, os valores estão expressos em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change) e foram normalizados pelo gene ACTB (actina beta); Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via, seguido de post hoc de Dunnett; **(D)** Atividade de Dicer; Os dados estão representados como mediana e intervalos interquartis; eles foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de *post hoc* de Dunn, sendo $*p < 0,05$ vs Sham V; **(E)** Análise de correlação de Pearson entre atividade de Dicer e a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FE); **(F)** Análise de correlação de Pearson entre a atividade de Dicer e o diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (DVEd); r, coeficiente de correlação de Pearson; p, valor de alfa (significativo quando $p < 0,05$).

Na mesma direção, as análises de correlação entre a atividade de Dicer e os parâmetros ecocardiográficos apontaram para uma associação entre o remodelamento ventricular (DVEd) e a redução da atividade da enzima. Como observado na Figura 18.E, a atividade de Dicer apresentou uma correlação negativa significativa com o diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo em sístole ($r = 0.52$; $p = 0.0019$). Contudo, não observamos correlação entre a atividade da enzima e a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo ($r = 0.35$; $p = 0.12$) (Figura 18.F).

5.1.4. Biogênese de miRNAs

5.1.4.1. Expressão relativa de pri-microRNAs e microRNAs maduros

Após identificar uma redução na atividade de Dicer nos animais com disfunção cardíaca tratados com veículo, nos questionamos se a mesma poderia se refletir nos níveis de miRNAs no coração, visto que a Dicer é uma proteína essencial em sua biogênese. O primeiro passo consistiu na análise da expressão do miRNA primário (pri-miR) com o intuito de avaliar se os miRNAs estariam sendo regulados transcricionalmente. Na figura 19.A, é possível visualizar a posição do pri-miR na via de biogênese do miRNA (destaque em laranja). Como visto, o pri-miR consiste no transcrito primário do miRNA e é clivado ainda no núcleo pelo complexo Drosha-DGCR8 (microprocessador) dando origem ao miRNA precursor (pre-microRNA), substrato da Dicer.

Foram avaliados os níveis de seis diferentes pri-miRs específicos de músculo (miomiRs): pri-miR-1, pri-miR-133a, pri-miR-133b, pri-miR 208a, pri-miR-208b e pri-miR-499. Como pode ser observado na figura 19.B-G, nenhum dos pri-miRs apresentou níveis alterados entre os grupos avaliados, ou seja, os miRNAs analisados não demonstraram estar sob regulação ao nível transcricional nas condições avaliadas no estudo.

Contudo, vale apontar que três animais do grupo DC Alda apresentaram uma tendência à diminuição dos pri-miRs 208a, 208b e 499 (Figura 19. E-G). Esses animais são os mesmos que apresentaram menor atividade da Dicer dentro do grupo DC A, como pode ser visto na figura 18.D. Interessantemente, os mesmos animais também apresentaram níveis elevados dos respectivos miRNAs 208b (3p e 5p) e 499 no grupo DC A (Figura 20. H-J).

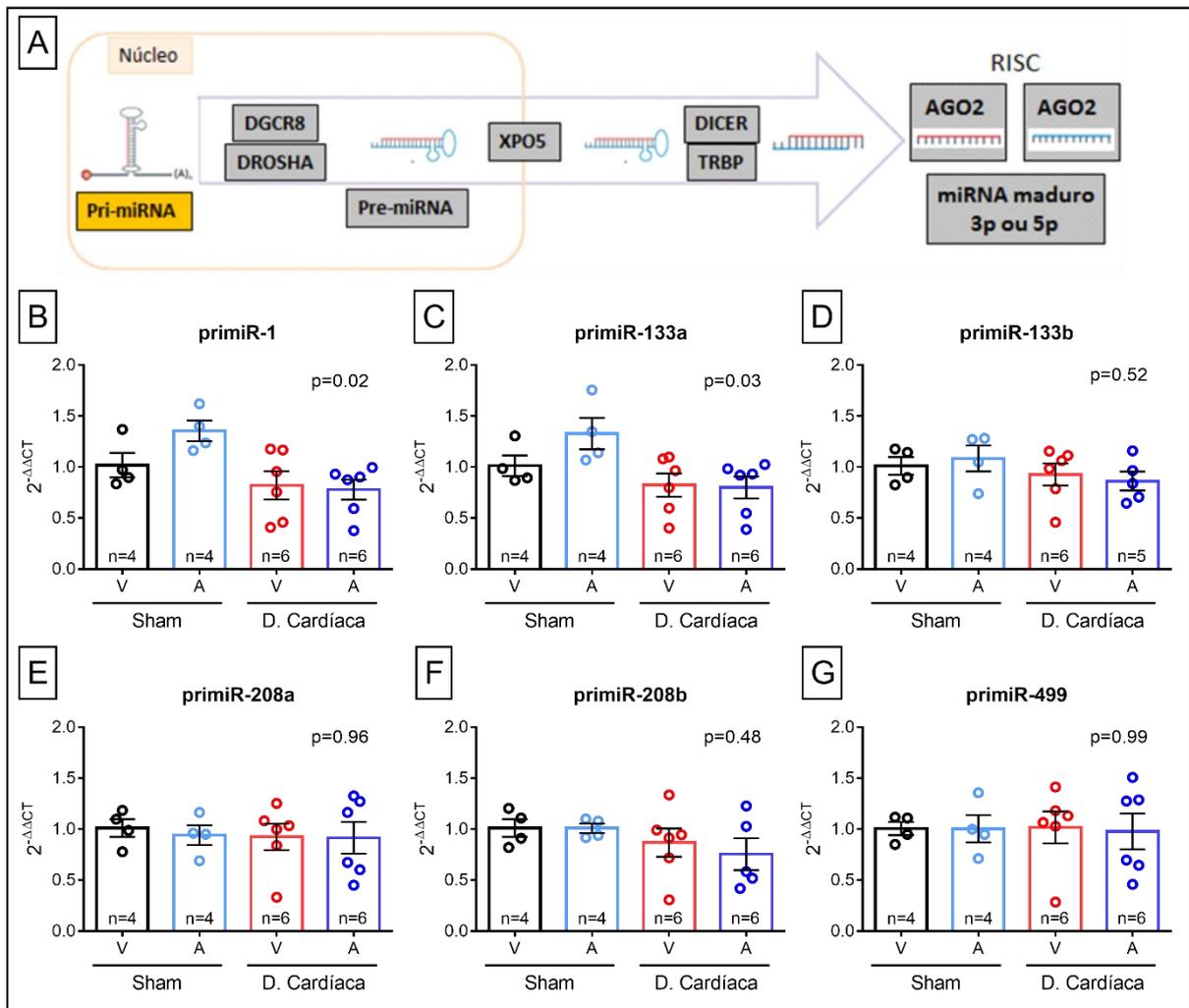


Figura 19. Representação gráfica da expressão relativa de microRNAs primários específicos do coração (pri-miRs). (A) Esquema ilustrativo da via de biogênese do miRNA, com destaque para a posição do pri-miR (laranja); (B) pri-miR-1; (C) pri-miR-133a; (D) pri-miR-133b, (E) pri-miR 208a, (F) pri-miR-208b, (G) pri-miR-499; Os valores estão expressos em $2^{-\Delta\Delta ct}$ e foram normalizados pelo gene ACTB (actina beta); Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via, seguido de *post hoc* de *Dunnett*.

Na etapa seguinte, foi analisado o nível via *PCR real time* das fitas 3p e 5p dos miRNAs maduros (Figura 20.A) correspondentes aos pri-miRs avaliados, com o objetivo de verificar se os seus níveis foram alterados em função do desenvolvimento da disfunção cardíaca e do tratamento. Alterações nesse nível sugerem regulação pós-transcricional na expressão dos miRNAs, visto que não identificamos modificação na expressão dos transcritos primários (pri-miRs). As representações gráficas dos resultados referentes às fitas 3p e 5p podem ser observadas na Figura 20.B-J

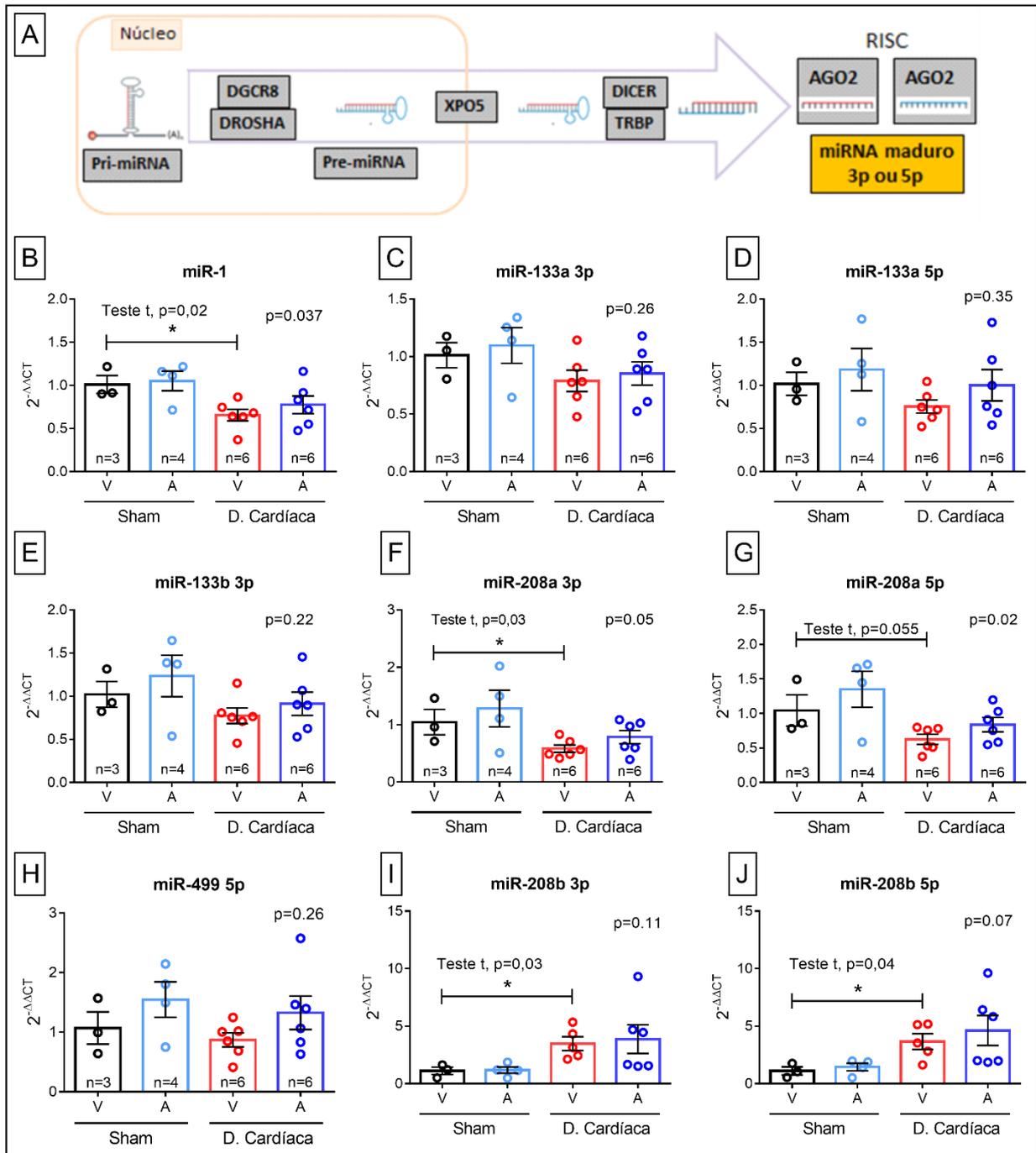


Figura 20. Representação gráfica da expressão relativa de microRNAs maduros (miRs) específicos do coração – fitas 3p e 5p. (A) Esquema ilustrativo da via de biogênese do miRNA, com destaque para a posição do miRNA maduro fitas 3p e 5p (laranja); **(B)** miR-1-3p; **(C)** miR-133a-3p; **(D)** miR-133a-5p, **(E)** miR 133b-3p, **(F)** miR-208a-3p; **(G)** miR-208a-5p; **(H)** miR-499-5p; **(I)** miR-208b-3p; **(J)** miR-208b-5p. Os valores estão expressos em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e foram normalizados pela média de Cts dos miRNAs miR-150 e miR-331; Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via (ver valor de p no canto superior direito dos gráficos); para os miRNAs miR-208a, miR-208b e miR-1, foi realizado teste t de Student bicaudal, sendo $*p<0,05$ vs Sham V.

Com relação à fita 3p, foram identificados três padrões de resposta: (I) redução do miR-1 ($p=0.02$) e miR-208a ($p=0.03$) no grupo DC veículo, com recuperação no grupo tratado com Alda-1 (Figura 20.B e F), (II) tendência a redução do miR-133a e miR-133b no grupo DC V (Figura 20.C e E), e (III) aumento do miR-208b no grupo DC ($p=0.03$) (Figura 20.I). Não foi possível analisar o miR-499-3p, visto que sua quantidade na amostra estava, possivelmente, muito reduzida, amplificando apenas após o 36° ciclo no qPCR. Os resultados obtidos para a fita 5p foram semelhantes àqueles vistos para a fita 3p. Observamos uma redução do miR-208a-5p no grupo DC veículo ($p=0.055$), acompanhada de aumento do miR-208b-5p nos grupos DC, sendo estatisticamente significativo apenas no grupo tratado com veículo ($p=0.04$) (Figura 20.G e J).

Possivelmente, devido à dispersão dos dados e ao reduzido número amostral do grupo Sham ($n=3$), não foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos a partir da análise ANOVA duas vias (seguida do *post hoc* de Dunnett). Contudo, um teste t de Student apontou alterações significativas dos miRNAs miR-1, miR-208a (3p e 5p) e miR-208b (3p e 5p) no grupo DC veículo, quando comparado ao grupo Sham veículo, as quais foram prevenidas nos animais DC tratados com Alda-1.

Esses dados também estão representados na forma de *heatmap* na Figura 21, a qual favorece a visualização simultânea dos níveis de todos os miRNAs nas condições analisadas. Sumarizando, os miRNAs miR-1 e miR208-a encontraram-se reduzidos nos animais com disfunção cardíaca tratados com veículo (DC V), sendo que os miRNAs miR-133a e miR-133b apresentaram tendência de redução no mesmo grupo. O tratamento com Alda-1 demonstrou minimizar essa tendência, visto que os animais do grupo DC A apresentaram valores intermediários, próximos àqueles obtidos no grupo Sham V (Figura 21). De forma contrária, o miR-208b (3p e 5p) apresentou um aumento nos animais com disfunção cardíaca.

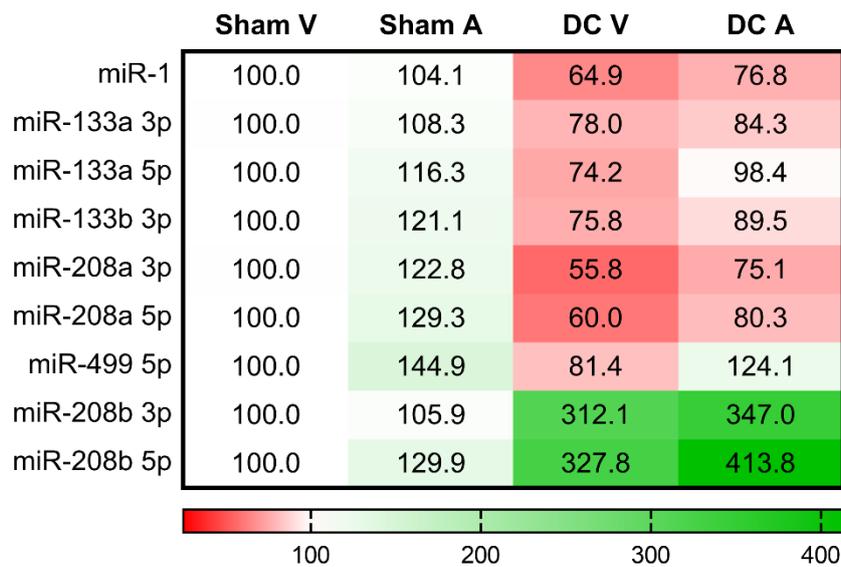


Figura 21. Heatmap dos miRNAs analisados. Os valores representam a porcentagem de cada grupo com relação ao grupo Sham V (100%); Sendo: V, veículo; A, Alda; DC, Disfunção Cardíaca. Escala de cor: verde representa aumento da expressão e, vermelho representa redução na expressão com relação ao grupo Sham V.

Além da edição pela Dicer, a biogênese do miRNA envolve outras etapas desde a transcrição até a sua incorporação no complexo RISC (Figura 22.A), cujo comprometimento também poderia levar a alterações nos níveis de miRNAs. Nesse contexto, para compreender melhor a relevância das alterações observadas na atividade de Dicer, é importante avaliar o funcionamento do restante da “maquinaria” de biossíntese.

5.1.4.2. Níveis de mRNA das proteínas da biogênese do miRNA

Foi analisado o nível de mRNA de outros integrantes da via biogênese do miRNA por qPCR, sendo eles: Drosha, DGCR8, XPO5, TRBP e AGO2. A posição de cada proteína na via, assim como a representação gráfica dos seus níveis cardíacos estão apresentados na Figura 22.

No núcleo, após sua transcrição, o pri-miRNA sofre sua primeira clivagem pela RNase Drosha (Figura 22.B), que atua em conjunto com a proteína DGCR8 (Figura 22.C) (complexo microprocessador), dando origem ao pre-miRNA (perde sua cauda poli-A e o cap 5'). Depois de formado, o pre-miRNA é transportado ativamente para o citoplasma pela exportina 5 (XPO5, figura 22.D). Não foi encontrada diferença nos

níveis cardíacos dessas três proteínas entre os grupos estudados, contudo, tanto a Drosha como a XPO5 apresentaram tendência de redução nos animais com disfunção cardíaca (DC).

Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA passa por uma segunda clivagem pela Dicer (Figura 18. A-C), a qual atua em associação com a TRBP (Figura 22.E), gerando um duplex de miRNA. Posteriormente, esse duplex tem uma das fitas (3p ou 5p) incorporada no complexo RISC, cuja proteína efetora em mamíferos é a argonata 2 (AGO2) (Figura 22.F). Do mesmo modo, os níveis das proteínas Dicer e AGO2 não exibiram diferenças entre os grupos estudados. Contudo, houve uma redução significativa na expressão gênica de TRBP nos animais com disfunção cardíaca (Figura 22.E). Tal diferença não foi encontrada no nível proteico, o qual foi analisado via a técnica de *western blot*. Como pode ser observado na Figura 23. A-B, os níveis proteicos de TRBP não variaram entre os grupos analisados. O mesmo resultado foi obtido para a proteína AGO2 (Figura 23. C-D).

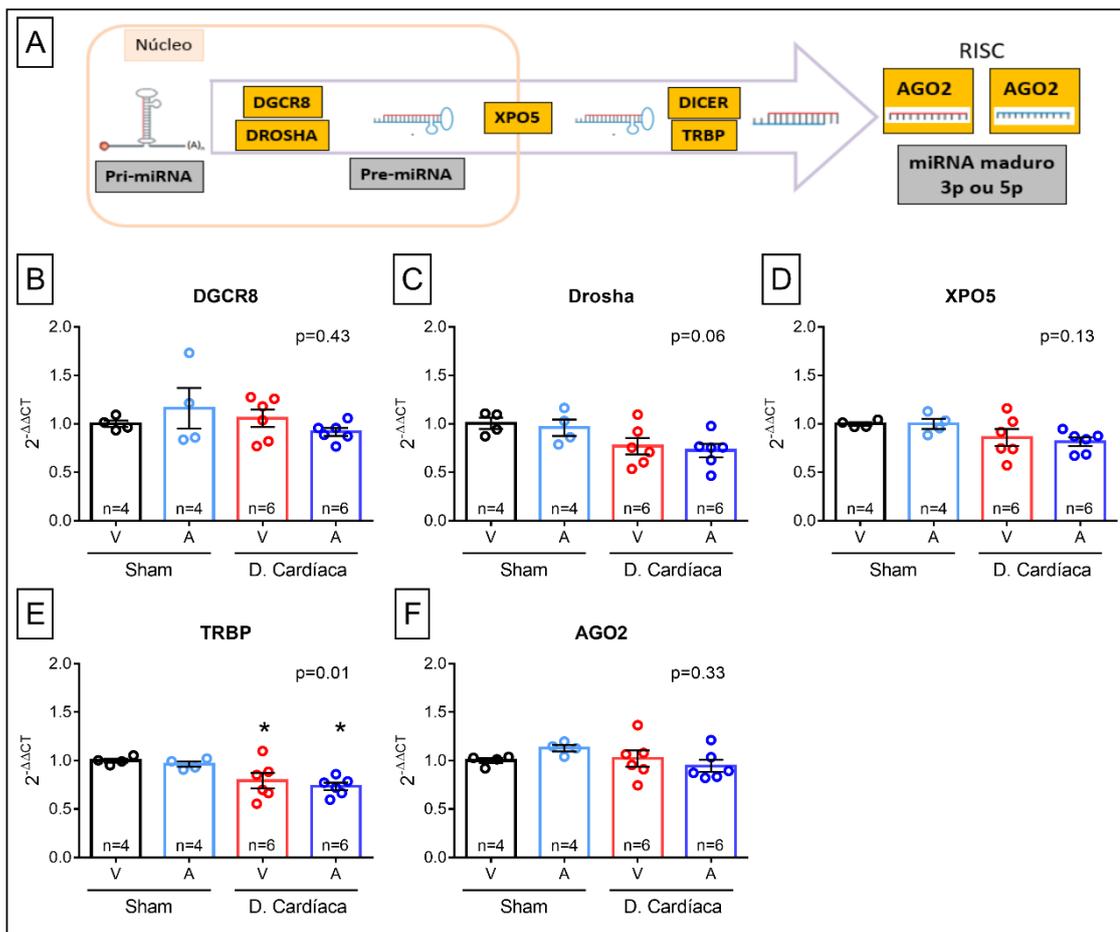
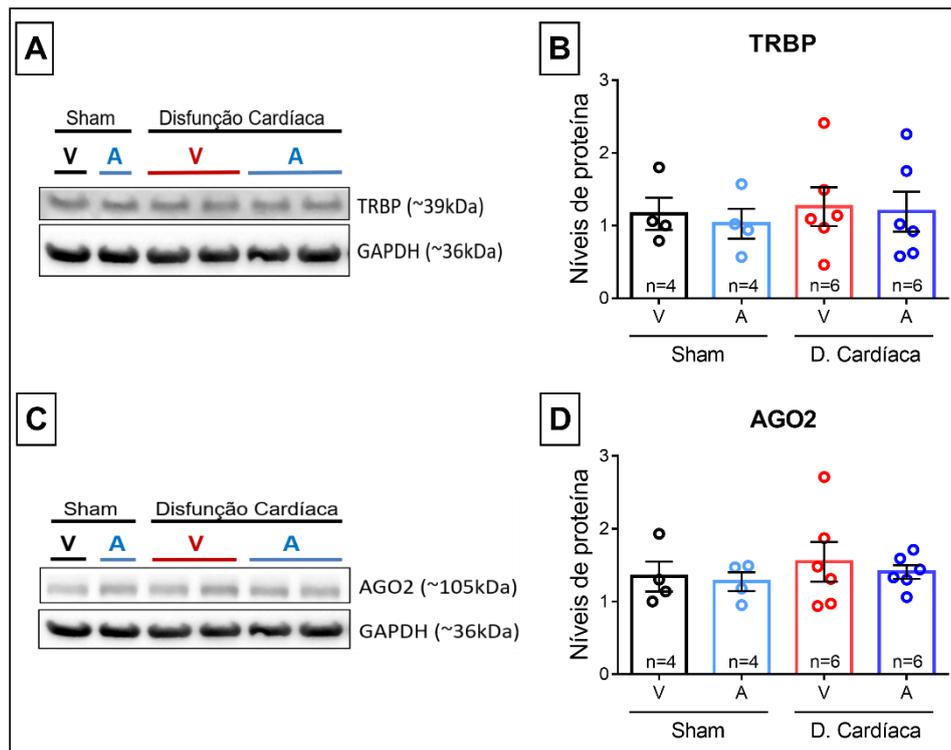


Figura 22. Representação gráfica da expressão relativa das proteínas da biogênese do miRNA. (A) Esquema ilustrativo da via de biogênese do miRNA, com destaque para a posição das proteínas da biogênese (coloridas); (B) DGCR8 (núcleo); (C) Drosha (núcleo); (D) XPO5 (membrana nuclear); (E) TRBP (citoplasma); (F) AGO2 (citoplasma); Sendo V, veículo; A, Alda; Os valores estão expressos em $2^{-\Delta\Delta ct}$ e foram normalizados pelo gene ACTB (actina beta); Os dados estão representados como média \pm Erro Padrão da Média; eles foram analisados pelo teste ANOVA uma via, seguido de *post hoc* de *Dunnnett*, sendo $*p < 0.05$ vs Sham V.



Até o momento, observamos que os animais com disfunção cardíaca tratados com veículo detiveram os maiores níveis de adutos de 4-HNE-proteína e apresentaram redução na atividade de Dicer e expressão dos miRNAs cardíacos miR-208a e miR-1. Contudo, não podemos afirmar que as respostas encontradas apresentam relação causal com os níveis de 4-HNE ou com a interação do aldeído com a Dicer. Apesar disso, a recuperação dos parâmetros analisados nos animais tratados com Alda-1 (grupo DC Alda), molécula ativadora de ALDH2 (responsável pela

remoção do 4-HNE), fornece um indício importante de que o 4-HNE (ou sua remoção) pode estar envolvido na resposta.

Uma limitação do modelo animal utilizado é que o mesmo só nos permite identificar a interação e inferir o seu papel no fenótipo observado. Nessa direção, com o intuito de estudar a relação causa e efeito da interação de 4-HNE e Dicer sobre a atividade e expressão da proteína, as próximas fases do projeto foram realizadas em modelos celulares e ensaios *in vitro* com a proteína purificada. Os resultados serão apresentados nos próximos itens.

5.2. Ensaios celulares

A partir dos resultados obtidos no modelo animal, onde verificamos uma redução da atividade da Dicer e alterações nos níveis de miRNAs cardíacos em animais com disfunção ventricular, nos questionamos se tais respostas poderiam ser parcialmente explicadas pela interação de 4-HNE-Dicer. Para estudar essa interação e responder a esse questionamento, escolhemos três linhagens celulares permanentes: (I) a linhagem imortalizada de mioblastos de rato, H9C2 (ver item 4.2); (II) a linhagem imortalizada de fibroblastos embrionários de camundongo *knockout* para a proteína Dicer (MEF *Dcr* ^{-/-}); e (III) a HEK293 (*Human embryonic Kidney*) modificada (RNAi-293-EGFP/RFP) (53,54). Apesar do valor do modelo *in vivo*, onde a complexidade do sistema é muito superior ao encontrado em cultura celular, o último permite maior controle das condições experimentais, assim como a sua manipulação, de modo a fornecer uma importante ferramenta de estudos de causa e resposta.

5.2.1. H9C2 – 4-HNE reduz atividade de Dicer

No laboratório, o primeiro passo consistiu na realização do ensaio de morte celular, com a finalidade de verificar se o tratamento com 4-HNE (50µM, 2 horas; Item 4.2.1) estaria induzindo morte e identificar seu mecanismo principal, necrose e/ou apoptose, no período de análise. Essa etapa teve como objetivo encontrar uma condição de estresse de aldeído moderado, onde fosse possível observar a modificação de

proteínas por 4-HNE e estudar o efeito da mesma sobre a atividade de Dicer. Desse modo, utilizamos o ensaio de atividade de LDH para avaliar necrose nos períodos de 2 horas e 24 horas, e *western blot* para marcadores de apoptose (caspase 3 clivada e ERK fosforilada) (Figura 24.A).

Como pode ser observado na Figura 24.B, após 2 horas de tratamento, não foi detectada morte por necrose, visto que a liberação da enzima LDH no meio de cultura do grupo tratado não diferiu do controle. Contudo, a análise de marcadores de apoptose, indicou que a sinalização de morte havia sido ativada nesse intervalo, com clivagem de caspase 3 e fosforilação da ERK1/2 no mesmo período (Figura 24.C). Em contrapartida, 24 horas após dose única do aldeído, as células apresentaram um aumento significativo na morte por necrose (+185,5%), se comparadas ao grupo controle (Figura 24.B). O tratamento com Alda (40 μ M) não foi capaz de proteger as células (Figura 24.B).

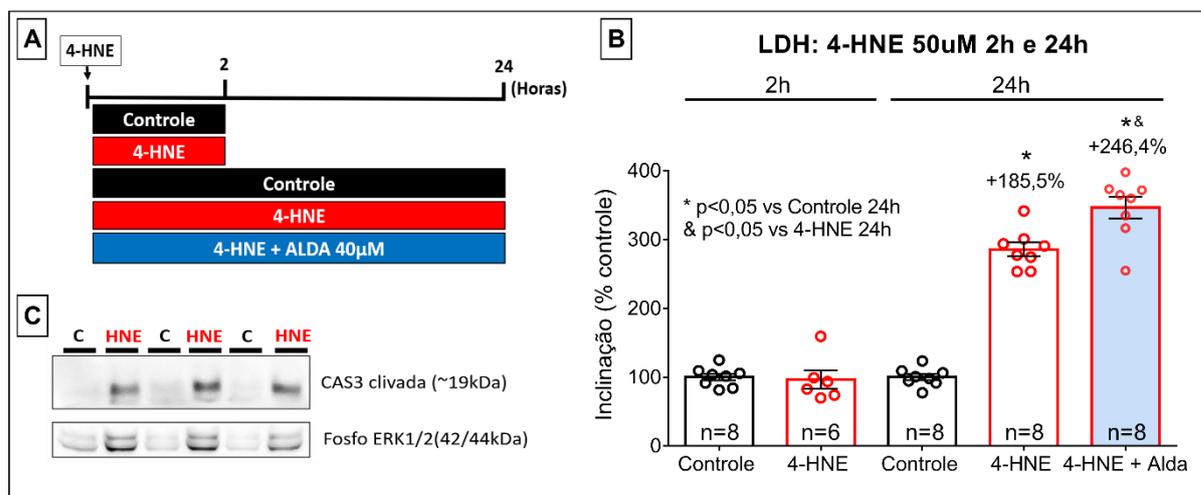


Figura 24. Caracterização das células H9C2 tratadas com 4-HNE 50 μ M por 2h e 24h. (A) Desenho experimental; **(B)** Ensaio de morte celular (LDH) em células H9C2 tratadas com 4-HNE 50 μ M por 2h e 24h (com veículo e Alda 40 μ M); Dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de *Dunn*, onde * $p < 0,05$ vs Controle 24h; &, $p < 0,05$ vs 4-HNE 24h; **(C)** *Blot* representativo dos marcadores de apoptose, Caspase 3 clivada (CAS3) e ERK1/2 fosforilada de células H9C2 tratadas com 4-HNE 50 μ M por 2h.

A seguir, avaliamos se o tratamento (4-HNE 50 μ M, 2 horas) era capaz de alterar os níveis de adutos de aldeído-proteína. Como pode ser observado na Figura 25, 2 horas de exposição ao aldeído foram capazes de induzir um aumento de 55,1% nos níveis de adutos entre 4-HNE-proteínas, quando comparado ao grupo controle. Infelizmente, devido à limitações técnicas, não foi possível a realização de

imunoprecipitação de Dicer para validar a interação da proteína com 4-HNE nesse modelo.

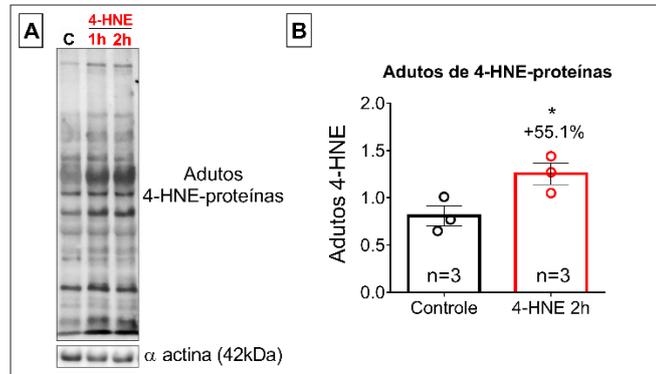


Figura 25. Níveis de adutos de 4-HNE em células H9C2 tratadas com 4-HNE 50µM por 2h. (A) Blot representativo de adutos de 4-HNE-proteínas, normalizado por alfa-actina; **(B)** Quantificação dos adutos de 4-HNE-proteínas; os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, analisados por teste t de Student bicaudal, onde $*p < 0,05$ vs Controle.

Por último, foram analisados o nível proteico e a atividade de Dicer no lisado celular após o tratamento com 4-HNE (50µM, 2 horas) (Figura 26). Como pode ser observado na Figura 26.A, foram detectadas duas bandas referentes à Dicer em ambos os grupos, sendo que as células tratadas com 4-HNE exibiram um acúmulo da banda mais pesada. A quantificação de ambas as bandas apontou um aumento significativo nos níveis de Dicer (+100%) nas células após exposição ao aldeído (Figura 26.B). Apesar do aumento aparente nos níveis de Dicer, contudo, as células tratadas com 4-HNE apresentaram uma redução significativa na atividade da enzima (-32,6%) quando comparadas ao grupo controle (Figura 26. C-D).

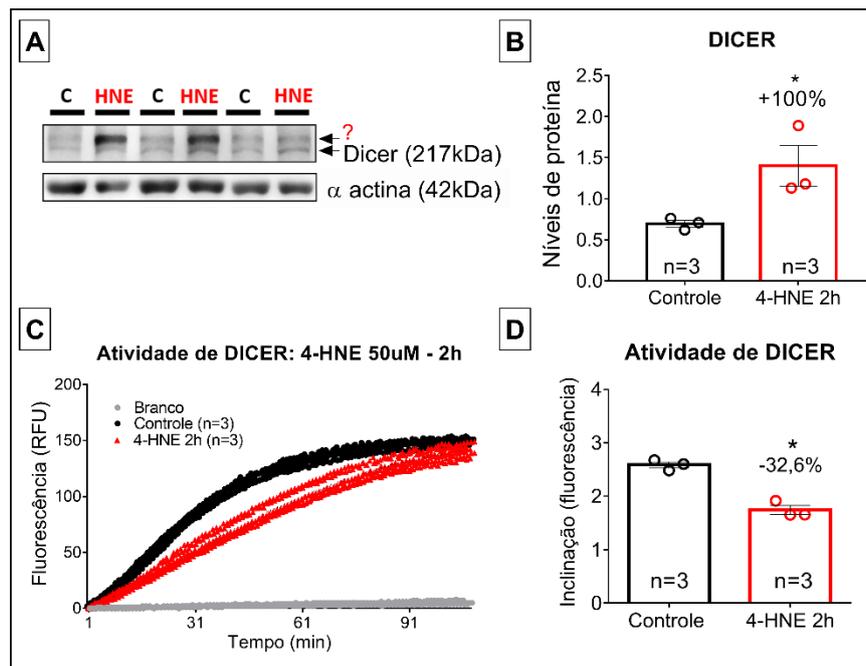


Figura 26. Atividade e níveis proteicos de Dicer em células H9C2 tratadas com 4-HNE 50 μ M por 2h. (A) *Blot* representativo de Dicer, normalizado por alfa-actina; destaque (seta vermelha) para banda acima de 217kDa também marcado pelo anticorpo anti-Dicer; (B) Quantificação dos níveis proteicos de Dicer; os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, analisados por teste t de Student bicaudal, onde * $p < 0,05$ vs Controle; (C) Representação gráfica da curva de fluorescência do ensaio de atividade de Dicer; (D) Quantificação da atividade de Dicer, avaliada através do cálculo da inclinação das curvas em Figura 26.C; os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, analisados por teste t de Student bicaudal, onde * $p < 0,05$ vs Controle.

5.2.2. MEF – 4-HNE reduz nível proteico e atividade de Dicer

A seguir, repetimos os ensaios em fibroblastos embrionários de camundongo (MEF), devido a disponibilidade da linhagem *knockout* para a proteína Dicer (MEF Dcr $-/-$), a qual poderia ser utilizada como controle negativo do ensaio. Adicionalmente, a superexpressão de Dicer foi usada como um controle positivo. Como pode ser observado na Figura 27.A-B, as células com deleção de Dicer (ver confirmação em Figura S6, Anexo 8) apresentaram uma redução de 41% na atividade da enzima se comparada às células *wild-type*. Notavelmente, as células que superexpressavam Dicer (MEF +Dcr) apresentaram um aumento significativo de 732% na atividade de Dicer se comparada às células *wt*. A partir desses dados, concluímos que a resposta observada nas células MEF +Dcr (superexpressão) eram geradas especificamente por Dicer, em excesso nessa condição. Desse modo, as células +Dcr foram utilizadas nos próximos passos para a avaliação do efeito do 4-HNE sobre a atividade de Dicer.

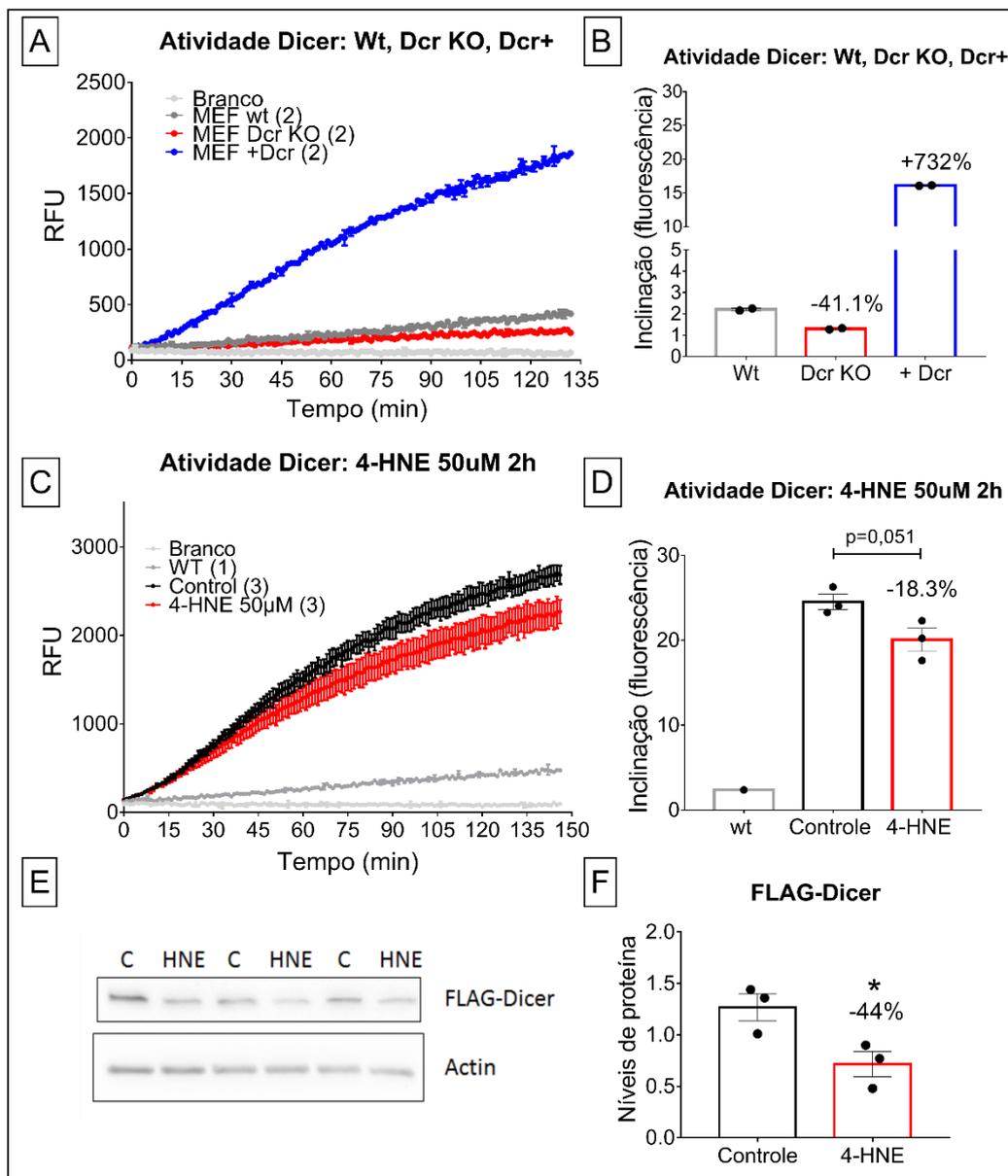


Figura 27. Atividade de Dicer em lisado de células MEF tratadas com 4-HNE 50µM por 2 horas. (A) Representação gráfica da curva de fluorescência do ensaio de atividade de Dicer em células MEF *wt*, MEF *Dcr*^{-/-} e MEF +Dcr; (B) Quantificação da atividade de Dicer, avaliada através do cálculo da inclinação das curvas em Figura 27.A; os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; (C) Representação gráfica da curva de fluorescência do ensaio de atividade de Dicer em células MEF *wt* e MEF +Dcr tratadas com 4-HNE 50µM por 2 horas; (D) Quantificação da atividade de Dicer, avaliada através do cálculo da inclinação das curvas em Figura 27.C; os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; analisados por teste t de Student bicaudal, onde *p<0,05 vs Controle; (E) Blot representativo de FLAG-Dicer, normalizado por actina; (F) Quantificação de FLAG-Dicer; os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média, analisados por teste t de Student bicaudal, onde *p<0,05 vs Controle.

No passo seguinte, da mesma forma que em H9C2, as células MEF +Dcr foram tratadas com 4-HNE 50µM por 2 horas. Após esse período, o lisado celular foi utilizado para a avaliação do nível proteico e atividade de Dicer. Como pode ser observado na Figura 27.C-D, as células tratadas com 4-HNE exibiram redução de 18,3% na atividade de Dicer (p=0,051). Consistente

com esse resultado, a análise de *western blot* detectou uma diminuição de 44% nos níveis de FLAG-Dicer nas células tratadas com o aldeído (Figura 27. E-F), o que poderia explicar a redução na atividade enzimática observada no grupo. Nesse ensaio, o 4-HNE parece ter induzido degradação de Dicer nas mesmas condições de tratamento anteriores (4-HNE 50 μ M, 2 horas).

Nos testes seguintes, avaliamos se o mesmo tratamento era capaz de afetar a via de biogênese de miRNAs.

5.2.3. HEK (RNAi-293-EGFP/RFP) – 4-HNE causa prejuízo na via de biogênese do microRNA

Como visto anteriormente, a linhagem HEK (RNAi-293-EGFP/RFP) funciona como um sistema repórter para monitorar em tempo real a via de biogênese do miRNA (ver item 4.2). O modelo prevê que alterações nas proteínas envolvidas no processamento do shRNA (expresso constitutivamente nessa linhagem) em siRNA anti-EGFP alteram os níveis finais de proteína EGFP e, conseqüentemente, a fluorescência observada (Figura 9 e Figura 28.A). Desse modo, ele foi selecionado como ferramenta para avaliarmos se o estresse induzido por 4-HNE seria capaz de levar a alterações na via de biogênese. Nossa hipótese previa que a via seria prejudicada pelo quadro de estresse, de modo que após o tratamento com 4-HNE, esperávamos observar um aumento na fluorescência em decorrência de uma menor síntese de siRNA anti-EGFP, e conseqüente aumento nos níveis de EGFP (Figura 28.B).

Inicialmente, as células foram tratadas com Enoxacino (50 μ M), controle positivo do constructo celular (Figura 28.C), uma vez que possui a capacidade de aumentar a produção de siRNA, reduzindo EGFP. Como pode ser observado na Figura 28.C, as células tratadas com Enoxacino apresentaram uma tendência de redução da razão EGFP/RFP após 2 horas de tratamento ($p=0,055$), sendo estatisticamente significativa apenas no período de 1 hora pós-tratamento. De forma contrária, o tratamento com 4-HNE (50 μ M, 2 horas) levou a um aumento na razão EGFP/RFP, quando comparado ao grupo controle (tratado com etanol, solvente de 4-HNE) no mesmo período, o qual foi significativo em todos os tempos de análise (30min – 2 horas) (Figura 28. D-E). Vale mencionar, que o experimento foi realizado duas vezes e ambos os resultados estão apresentados na Figura 28.

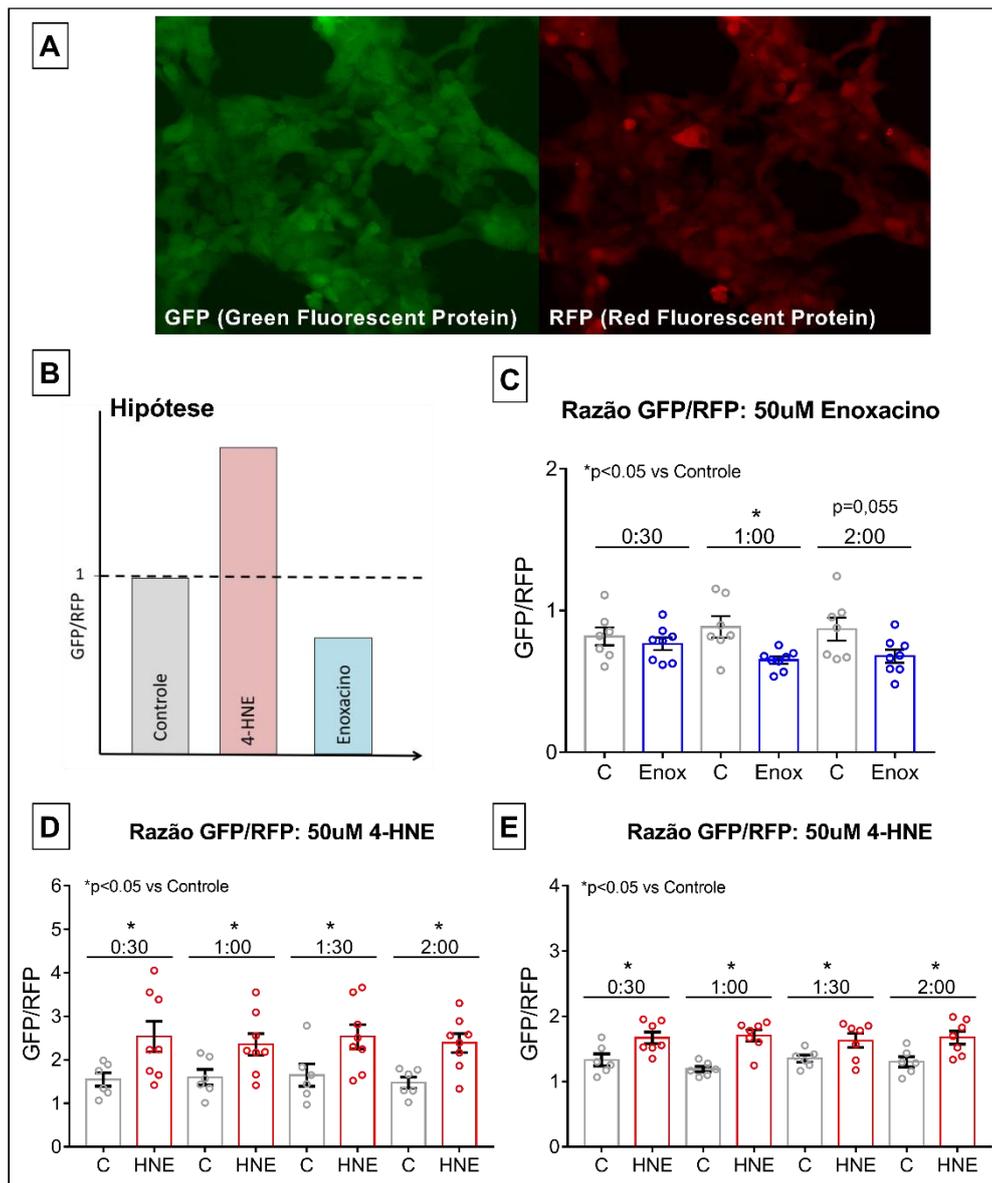


Figura 28. Efeito do 4-HNE sobre a biogênese de micro-RNAs em células HEK RNAi-293-EGFP/RFP. (A) Foto de células HEK RNAi-293-EGFP/RFP em aumento de 20x (Fonte própria; obtidas em InCell – GE); nos painéis da esquerda para a direita: filtro para FITC (detecção de GFP) e filtro para *Texas Red* (detecção de RFP); (B) Esquema ilustrativo da hipótese; (C) Análise da razão GFP/RFP das células tratadas com Enoxacino 50µM por 2 horas, controle positivo de ensaio; (D) **Experimento 1**, Análise da razão GFP/RFP das células tratadas com 4-HNE 50µM por 2 horas; (E) **Experimento 2**, Análise da razão GFP/RFP das células tratadas com 4-HNE 50µM por 2 horas; os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; analisados por teste t de Student bicaudal, onde *p<0,05 vs Controle no mesmo tempo de análise.

Em ambos os experimentos, os resultados se mostraram reprodutíveis e indicaram um aumento na fluorescência induzido pelo tratamento com 4-HNE (50µM, 2 horas). Baseando-se no constructo celular, uma possível justificativa para tal resposta seria o prejuízo na via de biogênese do siRNA, redução em sua síntese e, conseqüente aumento na expressão de seu alvo, a proteína fluorescente EGFP.

Nesse contexto, o tratamento demonstrou ser capaz de atuar sobre a via de biossíntese, sendo um indício de que o quadro de estresse de aldeídos é capaz de modular a síntese de miRNAs.

Em paralelo com os ensaios em cultura celular, onde buscamos um tratamento onde pudéssemos observar a indução de estresse de aldeídos e a formação de adutos entre 4-HNE-proteínas, também conduzimos ensaios *in vitro*, com o objetivo de avaliar de forma mais direta a ação do 4-HNE sobre a atividade e a estabilidade de Dicer.

5.3. Ensaios *in vitro* com Dicer recombinante

5.3.1. 4-HNE reduz a atividade de DICER de modo concentração- e tempo-dependente

Para avaliar o efeito de 4-HNE sobre Dicer *in vitro*, a proteína recombinante *wild-type* (1µg, 230nM) foi pré-incubada com uma concentração crescente do aldeído (10µM-1mM) por uma hora a 37°C. Após esse período, 10mM DTT foi adicionado à reação para remover o 4-HNE remanescente, antes da adição do substrato de dsRNA (100nM) (Figura.29.A). Inicialmente, com o objetivo de confirmar a interação 4-HNE-Dicer, as amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE (gradiente 4-20%) e os adutos de 4-HNE-Dicer foram detectados via *imunoblotting* com o auxílio de um anticorpo anti-4-HNE. Como pode ser observado na Figura. 29.B, Dicer foi diretamente modificada pelo aldeído de forma dose-dependente.

A seguir, os efeitos funcionais de tal interação foram avaliados através de um ensaio de atividade enzimática baseado na clivagem de um substrato de RNA marcado com o radioisótopo de fósforo ³²P (61) (Item 4.8.3). Consistente com as análises de *western blot*, o tratamento com 4-HNE reduziu a atividade de Dicer de forma dose-dependente. Enquanto 1 hora de exposição a 10µM 4-HNE não afetou a atividade da enzima, 1mM 4-HNE causou ~90% de inibição (Figura 29.C-D). Notavelmente, apesar do efeito inibitório na atividade catalítica de Dicer, o tratamento com 4-HNE não alterou o comprimento do produto de clivagem (22nt/12nt) (Figura 29.C). Ambos os domínios catalíticos RNaseIIIa e RNaseIIIB apresentaram uma resposta similar, uma redução dose-dependente da atividade após 1 hora de exposição ao aldeído (Figura 29.D). Desse modo, a interação Dicer-4-HNE foi

diretamente proporcional à concentração de aldeído e inversamente proporcional a atividade da endonuclease.

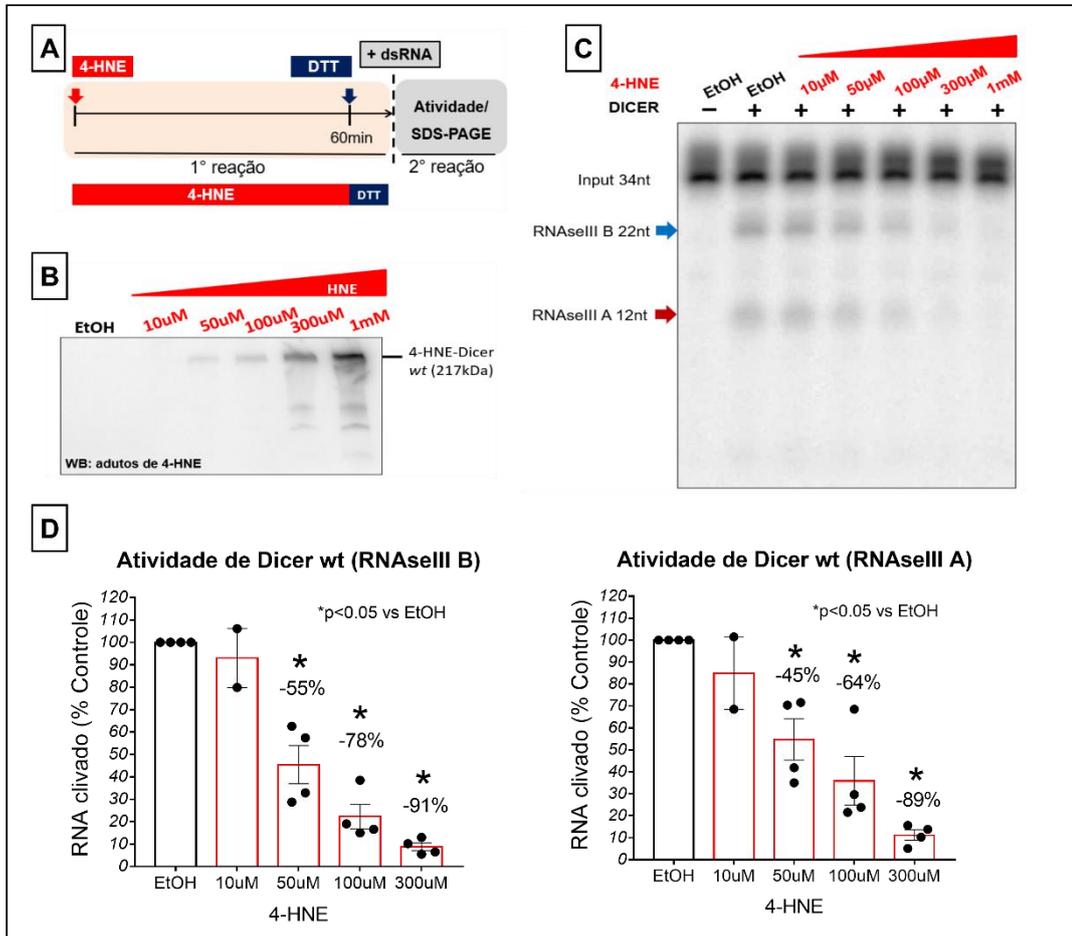


Figura 29. Efeito de 4-HNE sobre a atividade de Dicer. (A) Desenho experimental; (B) *Blot* representativo dos adutos de 4-HNE-Dicer após tratamento da proteína recombinante *wt* com uma concentração crescente de 4-HNE (10 μ M-1mM) por 1 hora; (C) Gel representativo do ensaio de atividade de Dicer *wt* (230nM, 100nM substrato RNA, 1 hora) exposta a concentração crescente de 4-HNE (10 μ M-1mM) por 1 hora; Em destaque, os produtos de clivagem dos domínios RNaseIII A (vermelho, 12nt) e RNaseIII B (azul, 22nt); (D) Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt* exposta a concentração crescente de 4-HNE (10 μ M-1mM) por 1 hora (géis analisados não estão presentes nessa imagem); A atividade dos domínios RNaseIIIA e RNaseIIIB estão expostos em gráficos separados; o grupo controle (EtOH) foi tratado com 3,6% de etanol (solvente de 4-HNE) pelo mesmo período; os dados estão exibidos como porcentagem do grupo controle (100%) e apresentados como média \pm erro padrão da média, sendo * $p < 0,05$ vs grupo controle (EtOH).

O próximo passo teve como objetivo avaliar o papel do tempo de exposição ao 4-HNE na interação aldeído-proteína e atividade de Dicer. Inicialmente, avaliamos se a interação 4-HNE-Dicer ocorria de modo tempo-dependente. Para tanto, Dicer *wt* recombinante (1 μ g) foi incubada com 100 μ M e 300 μ M 4-HNE por um período crescente de tempo (5-60min), sendo DTT (10mM) utilizado para parar a reação de

modificação pelo aldeído em cada ponto de análise (Figura 30). Após o ensaio, as amostras foram analisadas por *western blot*. Como pode ser observado na Figura 30.A, a interação 4-HNE-Dicer aumentou em função do tempo e a taxa de modificação pelo aldeído variou de acordo com a concentração do mesmo. Enquanto 5 minutos de exposição a 300 μ M 4-HNE levou a um aumento de ~40% na interação 4-HNE-Dicer, quando comparado ao grupo controle (tratado com 3,6% etanol), 1 hora de exposição à mesma concentração causou um aumento de ~2.400% na modificação de Dicer pelo aldeído. Por sua vez, 1 hora de exposição a 100 μ M 4-HNE induziu apenas um aumento de 68% (Figura 30.A). Desse modo, a interação 4-HNE-Dicer demonstrou ser dependente de ambos, tempo e concentração do aldeído.

A seguir, caracterizamos a atividade de Dicer *wt* exposta a concentrações crescentes de 4-HNE (50, 100 e 300 μ M) por diferentes períodos de tempo de exposição (5min, 15min, 30min, 45min, 60min) (Figura 30.C). Para estudar o efeito de 4-HNE sobre a atividade de Dicer, foi utilizado um modelo de decaimento exponencial, onde o tempo de meia-vida da atividade de Dicer foi considerado o tempo (em minutos) necessário para que sua atividade atingisse metade do valor original, aqui considerado 100% (grupo controle). Consistente com as análises de *western blot*, o pré-tratamento de Dicer com concentrações crescentes de 4-HNE promoveu uma redução concentração- e tempo-dependente na atividade de Dicer (Figura 30.C).

Após incubação com 300 μ M 4-HNE, a atividade de Dicer apresentou um tempo de meia-vida de 9,4 e 10,7 minutos (RNAselIIB e RNAselIIIA, respectivamente), enquanto que 100 μ M e 50 μ M 4-HNE levaram a 31,3min e 56,4 min, respectivamente, para o domínio RNAselIIB (Figura 30.C). Apesar de os valores obtidos para o domínio RNAselIIIA nas concentrações de 100 μ M e 50 μ M 4-HNE não se ajustarem na análise de decaimento exponencial de uma fase (*one phase decay analysis*), ambos os domínios (A e B) apresentaram resposta similar após 1 hora de exposição às mesmas concentrações de aldeído (*endpoint*), uma redução de ~50% e 71% de atividade, respectivamente (os valores são uma média de ambos os domínios para as concentrações de 100 μ M e 50 μ M 4-HNE, respectivamente). Todas as replicatas de cada tratamento e domínio RNAselIII podem ser vistas em detalhe na Figura S6 (Anexo 9).

Notavelmente, o pré-tratamento de Dicer com DTT (10mM), anterior à adição de 4-HNE (300 μ M) na reação, foi capaz de prevenir tanto a interação Dicer-4-HNE (Figura 30.A – grupo 60*) quanto a perda de atividade de Dicer induzida pela mesma (Figura 30.B). De forma contrária, a adição de DTT após exposição ao 4-HNE (em cada ponto de análise) não foi capaz de resgatar a atividade de Dicer nem de reverter a interação 4-HNE-Dicer. Uma possível explicação para o observado seria que o DTT, em alta concentração, poderia reagir com o 4-HNE livre impedindo que o mesmo modificasse Dicer. Desse modo, DTT seria capaz de remover 4-HNE livre do meio reacional, mas não de reverter as interações Dicer-4-HNE já estabelecidas. Alternativamente, DTT poderia reduzir os grupos sulfidril (-SH) de Dicer e protegê-los contra o ataque do aldeído.

Independentemente do mecanismo, esses resultados sugerem fortemente que a redução na atividade de Dicer é causada pela interação direta entre Dicer-4-HNE, visto que a perda de atividade só foi observada quando a proteína foi modificada pelo aldeído. Na mesma direção, como 4-HNE e DTT foram adicionados em todas as reações antes da adição do substrato de RNA (e início do ensaio de atividade), uma potencial modificação do substrato de RNA pelo aldeído não demonstrou ser responsável pelas alterações observadas na atividade de clivagem de Dicer.

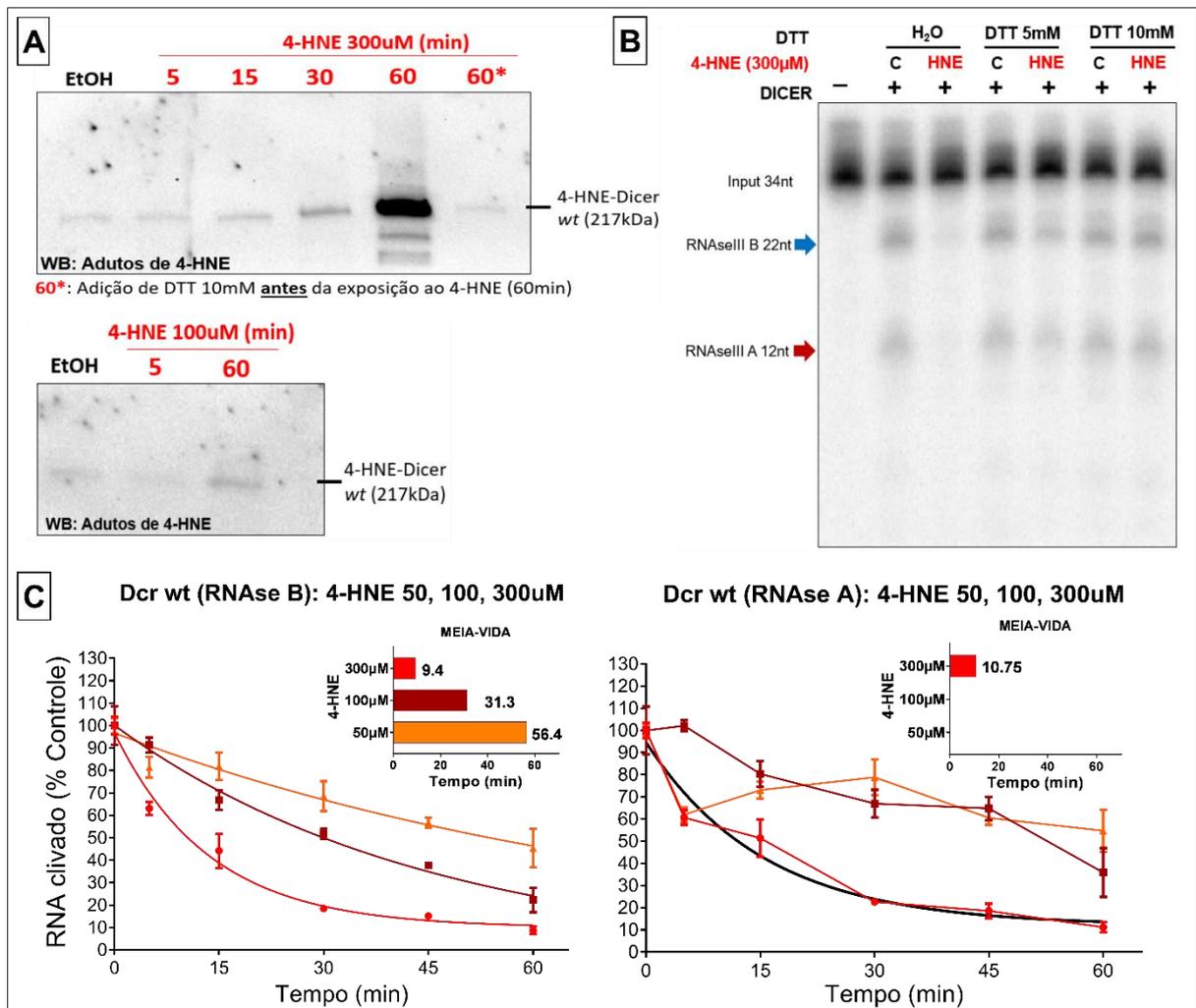


Figura 30. Efeito do 4-HNE sobre a atividade de Dicer – experimentos de curso temporal. (A) *Blot* representativo dos adutos de 4-HNE-Dicer após tratamento da proteína recombinante *wt* com 300µM 4-HNE (5- 60 minutos) e 100µM 4-HNE (5 e 60 minutos); o grupo controle foi tratado com 3,6% etanol (solvente de 4-HNE); 60*, amostra pré-tratada com 10mM DTT antes da adição de 4-HNE; (B) Gel representativo do ensaio de atividade de Dicer *wt* (230nM, 100nM substrato RNA, 1 hora), onde as amostras foram pré-incubadas com 5mM e 10mM DTT ou H₂O (controle, solvente de DTT) antes da incubação com 300µM 4-HNE por 60 minutos a 37°C; amostras pré-tratadas com DTT apresentaram proteção contra efeito inibitório de 4-HNE; (C) Análise de decaimento exponencial da atividade de Dicer após tratamento com 4-HNE 50µM (n=3), 100µM (n=5) e 300µM (n=5) por 5-60 minutos; os dados estão apresentados como porcentagem do controle (100%); A atividade dos domínios RNaseIIIA e RNaseIIIB foram analisados separadamente.

Até esse ponto, nossos dados demonstraram um impacto negativo da interação 4-HNE-Dicer sobre a atividade de Dicer, o qual se mostrou dependente da concentração de 4-HNE e tempo. Nesse contexto, o próximo passo teve como objetivo melhor investigar a relação entre as duas variáveis na atividade de Dicer. Nós questionamos se uma menor concentração de 4-HNE, mais próximo aos valores descritos *in vivo*, poderia afetar a atividade de Dicer se a proteína fosse exposta ao aldeído por um

maior período de tempo. Como já apresentado na Figura 29.C-D, 1 hora de tratamento com $10\mu\text{M}$ 4-HNE não alterou a atividade de Dicer. Então, testamos a mesma condição ($1\mu\text{g}$ Dicer *wt*, $10\mu\text{M}$ 4-HNE) por períodos de incubação mais longos (1h, 2h e 4h) e avaliamos a atividade de clivagem após o tratamento. Como pode ser observado na Figura 31, em acórdância com o primeiro ensaio, 1h e 2h de exposição ao aldeído não afetou a atividade de Dicer, contudo, 4h de tratamento apresentou uma tendência de inibição da enzima (32-34% de redução da atividade). Possivelmente, não encontramos significância estatística ($p=0,07$) devido ao reduzido número de replicatas por condição experimental ($n=2$).

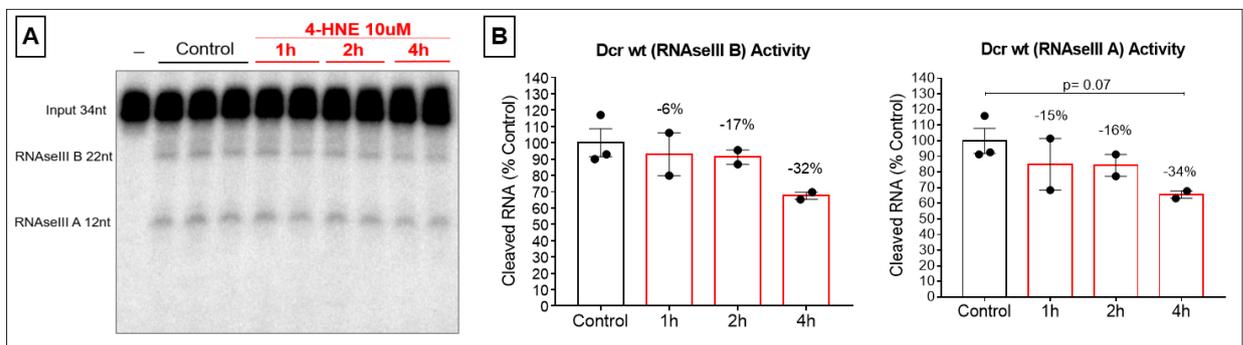


Figura 31. Curso temporal da atividade de Dicer - $10\mu\text{M}$ 4-HNE. (A) Gel representativo do ensaio de atividade de Dicer *wt* (230nM , 100nM substrato RNA, 1 hora), onde as amostras foram incubadas com $10\mu\text{M}$ 4-HNE por 1-4 horas; (B) Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt*; o grupo controle foi tratado com 3,6% etanol (solvente de 4-HNE) por 4 horas; a atividade dos domínios RNaseIIIA e RNaseIIIB estão expostos em gráficos separados; os dados estão exibidos como porcentagem do grupo controle (100%) e apresentados como média \pm erro padrão da média, sendo $*p<0,05$ vs grupo controle (EtOH).

Em contraste, apenas 5 minutos de exposição a uma alta concentração de 4-HNE ($300\mu\text{M}$) levou a um aumento de 45% na interação Dicer-4-HNE (Figura 32.A-B) e $\sim 38\%$ de redução na atividade de clivagem de Dicer (Figura 32. C-D). Interessantemente, como observado previamente (Figura 32.A-B), 1 hora de tratamento com $300\mu\text{M}$ 4-HNE levou a um aumento exponencial na modificação de Dicer por 4-HNE após 30 minutos de incubação, alcançando até 2.400% de aumento após 60 minutos, quando comparado ao grupo controle (EtOH 3,6%). Tal modificação de Dicer foi acompanhada de inibição substancial em sua atividade de clivagem no mesmo período (Figura 32.C, destacado em vermelho). Uma possível explicação para a súbita mudança na taxa de modificação pelo aldeído nessa condição seria a desestabilização e desnaturação de Dicer induzida por 4-HNE em algum ponto entre 30-60 minutos. A exposição e rápido ataque de novos sítios hidrofóbicos antes

internalizados poderia justificar o aumento exponencial observado na interação Dicer-4HNE. Nesse contexto, a etapa seguinte teve como objetivo verificar se o tratamento com 4-HNE era capaz de causar agregação de Dicer, uma indicação de desnaturação proteica.

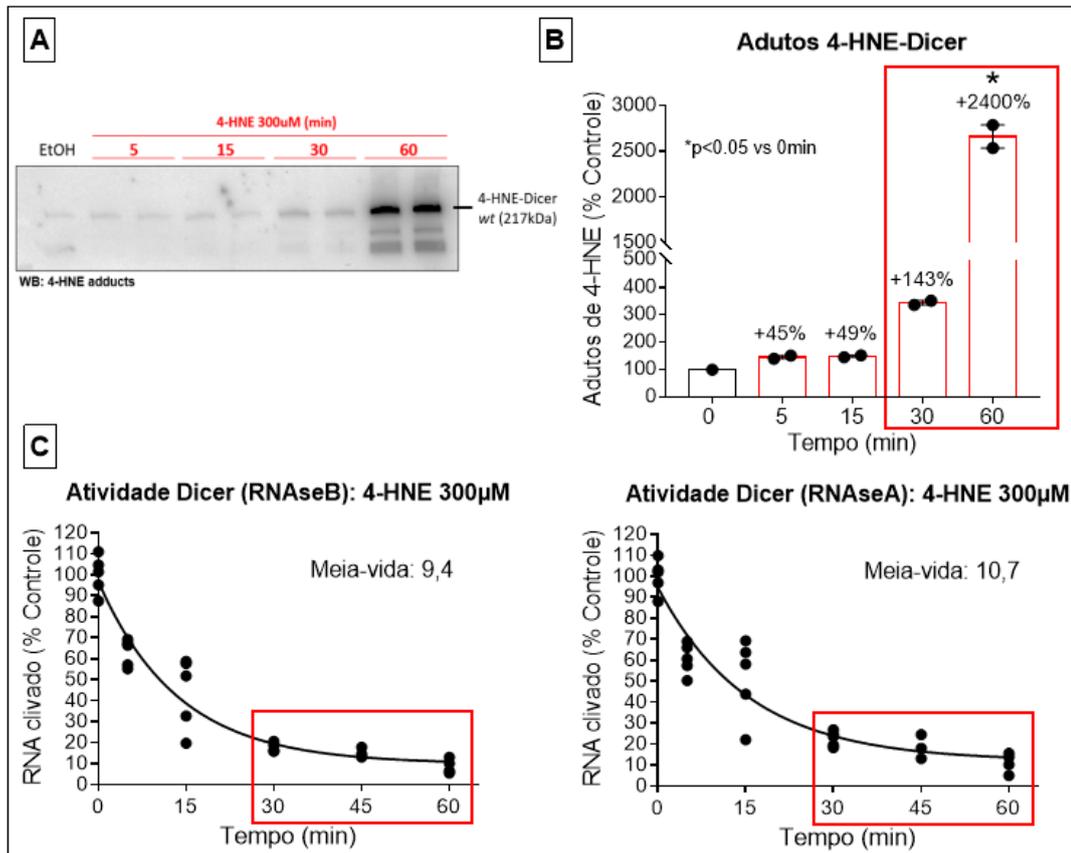


Figura 32. Análise temporal da modificação e atividade de Dicer exposta a 300µM 4-HNE. (A) *Blot* representativo dos adutos de 4-HNE-Dicer após tratamento da proteína recombinante *wt* com 300µM 4-HNE (5- 60 minutos); (B) Quantificação da interação Dicer-4-HNE; os dados estão exibidos como porcentagem do grupo controle (100%) e apresentados como média \pm erro padrão da média, sendo $*p < 0,05$ vs grupo controle (EtOH); (C) Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt* após exposição a 300µM 4-HNE (5-60 minutos); a atividade dos domínios RNaseIIIA e RNaseIIIB estão expostos em gráficos separados; os dados estão apresentados como porcentagem do grupo controle (100%), sendo cada amostra exibida individualmente sobre a curva de decaimento exponencial; Em destaque (vermelho), período entre 30-60min onde ocorre um “*shift*” na taxa de modificação de Dicer por 4-HNE.

5.3.2. 4-HNE induz agregação de Dicer

Para testar a hipótese de que 4-HNE induz a desnaturação e agregação de Dicer, a proteína recombinante *wt* foi incubada com concentrações crescentes de 4-HNE

(10 μ M-1mM) por 1 hora a 37°C. Após o tratamento, as amostras foram analisadas em SDS-PAGE (gradiente 4-20%). Visto que grandes agregados proteicos não são capazes de adentrar o gel analítico, se o tratamento com 4-HNE estivesse induzindo a agregação de Dicer, o agregado ficaria retido no topo do gel e seria visível após coloração do mesmo (com *Denville Blue*TM). Como observado na Figura 33.A, altas concentrações de 4-HNE (100 μ M-1mM) levaram ao acúmulo de Dicer no topo do gel, o qual foi mais pronunciado nas concentrações de 300 μ M e 1mM 4-HNE. Esse resultado corroborou a hipótese de que 4-HNE induz a desnaturação e agregação de Dicer, o que poderia estar relacionado com a inibição da proteína observada em altas concentrações do aldeído. Nesse contexto, para melhor caracterizar o processo de agregação induzido por 4-HNE, nós selecionamos a concentração de 300 μ M 4-HNE, visto que a mesma apresentou um fenótipo mais claro, e analisamos os mesmos pontos avaliados no ensaio de atividade (5min, 15min, 30min e 60min).

Surpreendentemente, como observado na Figura 33.C, as proteínas não ficaram retidas no topo do gel, como previamente observado. Contudo, diferentemente do primeiro experimento (Figura.33.A), as amostras nesse ensaio foram tratadas com DTT, o agente redutor selecionado para parar a reação de modificação por 4-HNE em cada período de análise (curso temporal). No mesmo experimento, uma amostra controle (C^{no DTT}) e uma amostra tratada com 4-HNE (60^{no DTT}) não receberam DTT (Figura 33.B). Notavelmente, apenas a amostra tratada com 4-HNE mas não DTT (60^{no DTT}) ficou parcialmente retida no topo do gel, demonstrando que 4-HNE estava causando agregação de Dicer e que DTT era capaz de dissociar o agregado. Possivelmente, as interações entre as proteínas no agregado eram baseadas, principalmente, entre resíduos de cisteínas e pontes dissulfeto, de modo que a adição de DTT foi capaz de romper essas interações. Na mesma direção, a análise de *western blot* demonstrou que tanto as proteínas solúveis no interior do gel como aquelas agregadas no topo do gel foram modificadas por 4-HNE (Figura 33.D).

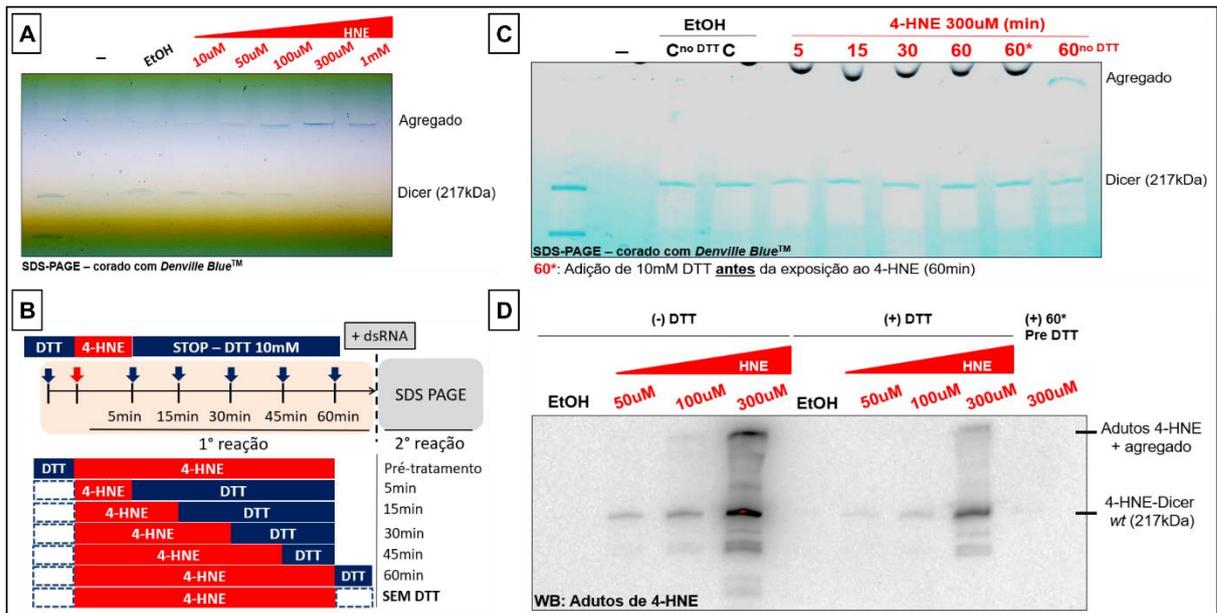


Figura 33. 4-HNE induz agregação de Dicer. (A) Gel representativo (SDS PAGE gradiente 4-20%) corado com *Denville Blue*TM, Dicer *wt* recombinante (1μg) foi incubada com concentrações crescentes de 4-HNE (10μM-1mM) por 60 minutos; (B) Esquema ilustrativo do protocolo experimental para a análise da agregação de Dicer (referente à Figura 33.C); (C) Gel representativo (SDS PAGE gradiente 4-20%) corado com *Denville Blue*TM, experimento de curso temporal onde Dicer *wt* recombinante foi incubada com 300μM 4-HNE por 5-60 minutos; 60*, amostra pré-tratada com DTT (10mM) antes de exposição ao 4-HNE; C^{no DTT} e 60^{no DTT}, amostra controle e tratada com 4-HNE (60min), respectivamente, SEM adição de DTT; (D) *Blot* representativo de adutos de 4-HNE-Dicer após incubação da proteína com concentrações crescentes de 4-HNE (50, 100 e 300μM) com e sem a adição de DTT (10mM) por 60 minutos; (+) 60*, amostra pré-tratada com DTT (10mM) antes da incubação com 4-HNE 300 μM (60 minutos).

5.3.3. Mutação dos resíduos pré-identificados como alvos de 4-HNE não protege Dicer contra o efeito inibitório do aldeído

Finalmente, após caracterizar o efeito de 4-HNE sobre Dicer *wt* recombinante, nós avaliamos o efeito do aldeído sobre as proteínas mutantes (Figura 13 – Item 4.12). Como mencionado anteriormente, um dos objetivos desse estudo era de avaliar o papel dos aminoácidos pré-identificados como alvos de 4-HNE na atividade de Dicer frente ao estresse de aldeídos *in vitro*. Nossa hipótese era de que a mutação dos resíduos alvos iriam prevenir a interação proteína-aldeído e proteger Dicer contra os efeitos inibitórios de 4-HNE observados na proteína *wild-type*. Para testar essa hipótese, nós produzimos três mutantes de Dicer distintas: mutante (1) K1324A e H1325A (substituição de 2/3 resíduos alvos); mutante (2) K1324A, H1325A e H1339A

(substituição de 3/3 resíduos alvos); e mutante (3) L1323F e V1351F (baseado no modelo *in-silico*), como previamente descrito (Item 4.12).

Primeiramente, nós testamos se as proteínas mutantes eram ativas em condições basais e comparamos sua atividade de clivagem à enzima *wild-type*. Como pode ser observado na Figura 34, todas as proteínas apresentaram atividade, contudo, elas exibiram algumas diferenças quando comparadas ao controle *wt*. Apesar das mutantes (1) e (2) não apresentarem alterações significativas na atividade catalítica quando comparadas à proteína *wild-type*, ambas as variantes produziram um produto de clivagem adicional em torno de 11nt, resultante da clivagem pelo domínio mutado RNaseIII A (Figura 34.A). Em contraste, a mutante (3) apresentou ~68% de redução na atividade do domínio RNaseIII A quando comparada à proteína *wt*, sem alterações significativas da atividade do domínio RNaseIII B e no tamanho dos produtos de clivagem (Figura 34.B).

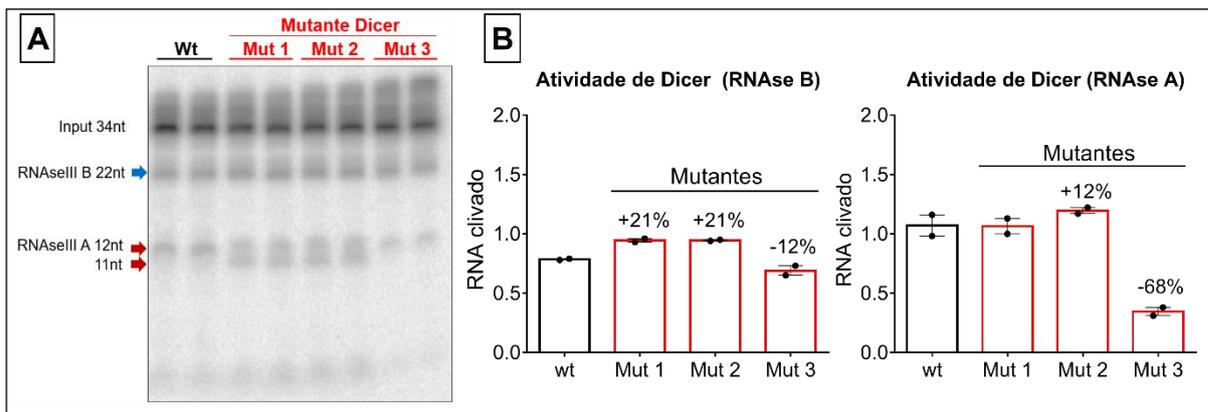


Figura 34. Atividade das proteínas Dicer mutantes. (A) Gel representativo do ensaio de atividade de Dicer *wt*, mutantes (1), (2) e (3) (230nM, 100nM substrato RNA, 1 hora); em destaque, os produtos de clivagem dos domínios RNaseIII A (vermelho, 11-12nt) e RNaseIII B (azul, 22nt); (B) Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt* e mutantes; a atividade dos domínios RNaseIII A e RNaseIII B estão expostos em gráficos separados; os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; os valores de porcentagem sobre as barras representam a diferença do grupo em relação ao grupo controle (100%).

A seguir, as proteínas *wild-type* e mutantes foram expostas a 50 μ M e 100 μ M 4-HNE (menores concentrações onde foi observado um efeito do aldeído na atividade de Dicer após 1h de incubação) por 1 hora à 37°C (Figura 35). O experimento teve como objetivo verificar se alguma das mutações iriam proteger Dicer contra os efeitos inibitórios de 4-HNE. Contudo, como pode ser observado na Figura 35.A-D, todas as proteínas mutantes apresentaram redução na atividade de clivagem, similar àquela

observada na proteína *wt*. Em outras palavras, em discordância com nossa hipótese inicial, nenhuma mutação foi capaz de proteger Dicer contra os efeitos inibitórios de 4-HNE nas condições testadas. Como previamente descrito para a proteína *wt*, as proteínas mutantes foram inibidas por 4-HNE de forma concentração-dependente.

5.3.4. Efeito de 4-HNE sobre a atividade de Argonauta 2 (AGO2)

Visto que 4-HNE é um aldeído altamente reativo, nós questionamos se 4-HNE poderia causar um efeito inibitório similar em outras proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs, as quais também são potencialmente expostas ao aldeído em quadro de estresse oxidativo. Considerando a experiência do Prof. MacRae com a biologia da proteína Argonauta 2 (AGO2) (laboratório onde foram realizados todos os experimentos *in vitro*), componente efetor do complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA) (Figura 37.A), nós decidimos avaliar o efeito de 4-HNE sobre a atividade de clivagem de AGO2.

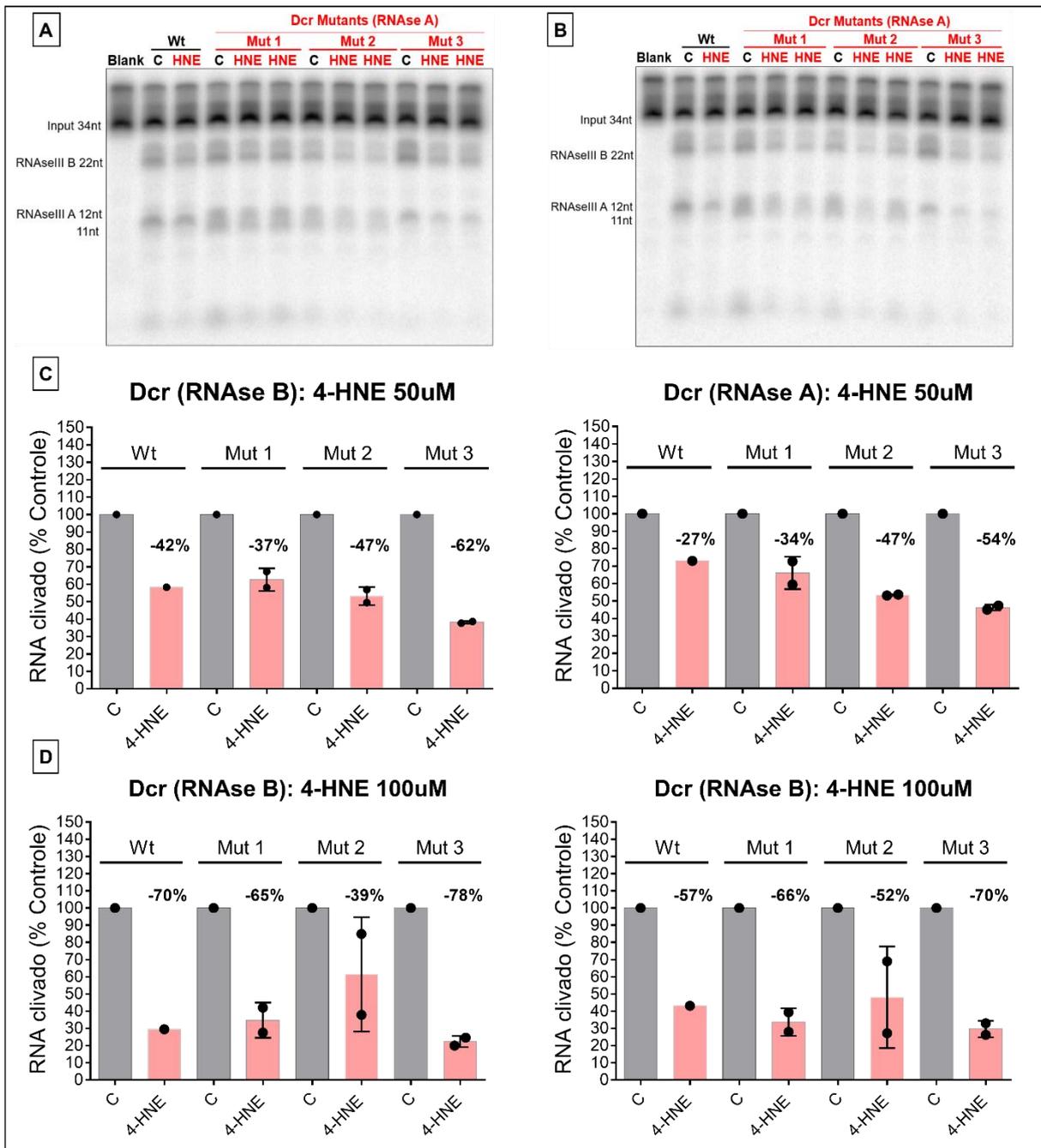


Figura 35. Efeito de 4-HNE sobre a atividade de Dicer – *wild-type* vs mutantes. (A) Gel representativo do ensaio de atividade de Dicer *wt* e mutantes (1), (2) e (3) (100nM substrato RNA, 1 hora) expostas a 50 μ M 4-HNE e (B) 100 μ M 4-HNE por 1 hora a 37°C; (C) Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt* e mutantes (referente à Figura 35.A); (D) Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt* e mutantes (referente à Figura 35.B); a atividade dos domínios RNaseIIIA e RNaseIIIB estão expostos em gráficos separados; os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; os valores de porcentagem sobre as barras cor de rosa representam a diferença do grupo em relação ao grupo controle (100%) de cada proteína (*wt* e mutante) em cinza.

Para avaliar o efeito de 4-HNE sobre a atividade de AGO2, a proteína recombinante *wt* pré-carregada com a fita guia do miR-122 (26nM) foi incubada com

concentrações crescentes de 4-HNE (50 μ M- 1mM) por 1 hora a 37°C. Após esse período, DTT (10mM) foi adicionado à reação para remover o remanescente de aldeído, seguido pelo substrato de RNA (100nM). Como pode ser observado na Figura 36.A-B, nossos resultados preliminares foram muito heterogêneos com 4-HNE nas concentrações entre 50 μ M-300 μ M. Enquanto que no primeiro experimento não foi possível identificar um efeito claro de 4-HNE sobre a atividade de AGO2 nessas concentrações, o segundo teste apontou uma redução de ~50% na atividade (Figura 36.A-B). Por outro lado, 1mM 4-HNE causou ~67% de redução na atividade de AGO2 em ambos os experimentos (Figura 36.A-B). Notavelmente, mesmo não conclusivos, os resultados obtidos sugerem que AGO2 é menos sensível ao estresse por 4-HNE que Dicer, visto que as mesmas concentrações de 4-HNE (300 μ M e 1mM) que causaram ~90% de inibição na atividade de Dicer, não afetaram AGO2 na mesma proporção (ver Figuras 30 e 32).

Interessantemente, nós observamos que a adição de DTT na reação modulou fortemente a atividade de clivagem de AGO2 nos ensaios. Como pode ser observado na Figura 36.C, AGO2 *wt* (26nM) tratada com DTT (10mM) exibiu um aumento de 20 vezes na atividade de clivagem quando comparado ao grupo controle (tratado com H₂O, solvente de DTT). Em face desse resultado, nós consideramos que DTT não era um agente adequado para parar a reação nesse caso, visto que afetou a atividade basal de AGO2.

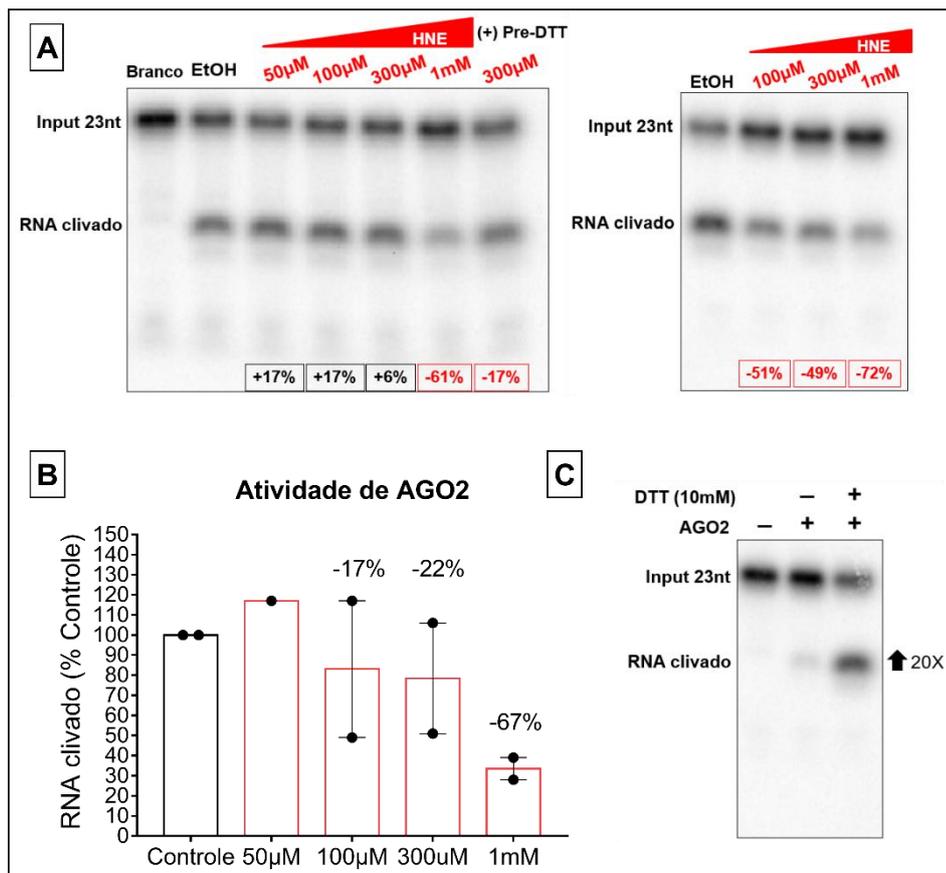


Figura 36. Efeito de 4-HNE na atividade de AGO2. (A) Géis representativos dos ensaios (1) e (2) de atividade de AGO2 (26nM proteína, 100nM substrato RNA, 30min) exposta a concentrações crescentes de 4-HNE (50µM-1mM e 100µM-1mM) por 1 hora a 37°C; (B) Quantificação da atividade de clivagem de AGO2 após 1 hora de tratamento com 4-HNE (50µM-1mM); o gráfico contém os dados conjuntos dos dois experimentos mostrados na Figura 36.A; os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; os valores de porcentagem sobre as barras representam a diferença do grupo em relação ao grupo controle (100%); (C) Gel representativo do ensaio de atividade de AGO2 (26nM proteína, 100nM substrato RNA, 30min) após tratamento com DTT (10mM) e H₂O (controle, solvente de DTT).

Com o objetivo de melhor compreender o que poderia determinar os diferentes graus de interação 4-HNE-proteína, com foco na via da biogênese de micro-RNAs, nós analisamos o conteúdo de cisteínas, lisinas e histidinas (aminoácidos alvos do 4-HNE) das quatro principais proteínas envolvidas na via: Dicer, Drosha, Argonauta 2 e TRBP (Figura 37.A). Como esperado, a abundância de cada aminoácido foi diretamente proporcional ao tamanho da proteína (Figura 37.B). Contudo, a quantidade relativa dos três resíduos (calculada pela seguinte equação: $n^{\circ}\text{Cys} + \text{His} + \text{Lys} / n^{\circ}\text{ total de aminoácidos} \times 100$) foi similar entre todas as proteínas analisadas, variando entre 10,1% - 12,4% do total de aminoácidos (Figura 37.C). Notavelmente, a lisina (em azul) foi o aminoácido mais abundante entre as proteínas analisadas.

Contudo, a partir da análise da sequência primária não foi possível encontrar pistas na composição das proteínas que responderiam por diferenças na interação 4-HNE-proteína. Outros fatores, como a acessibilidade dos aminoácidos alvos (localização e distribuição) na conformação nativa (estrutura terciária ou quaternária da proteína) isolada ou em complexo (ex.: Dicer-TRBP) poderiam melhor responder pelos distintos graus de “susceptibilidade” de cada proteína ao ataque por 4-HNE.

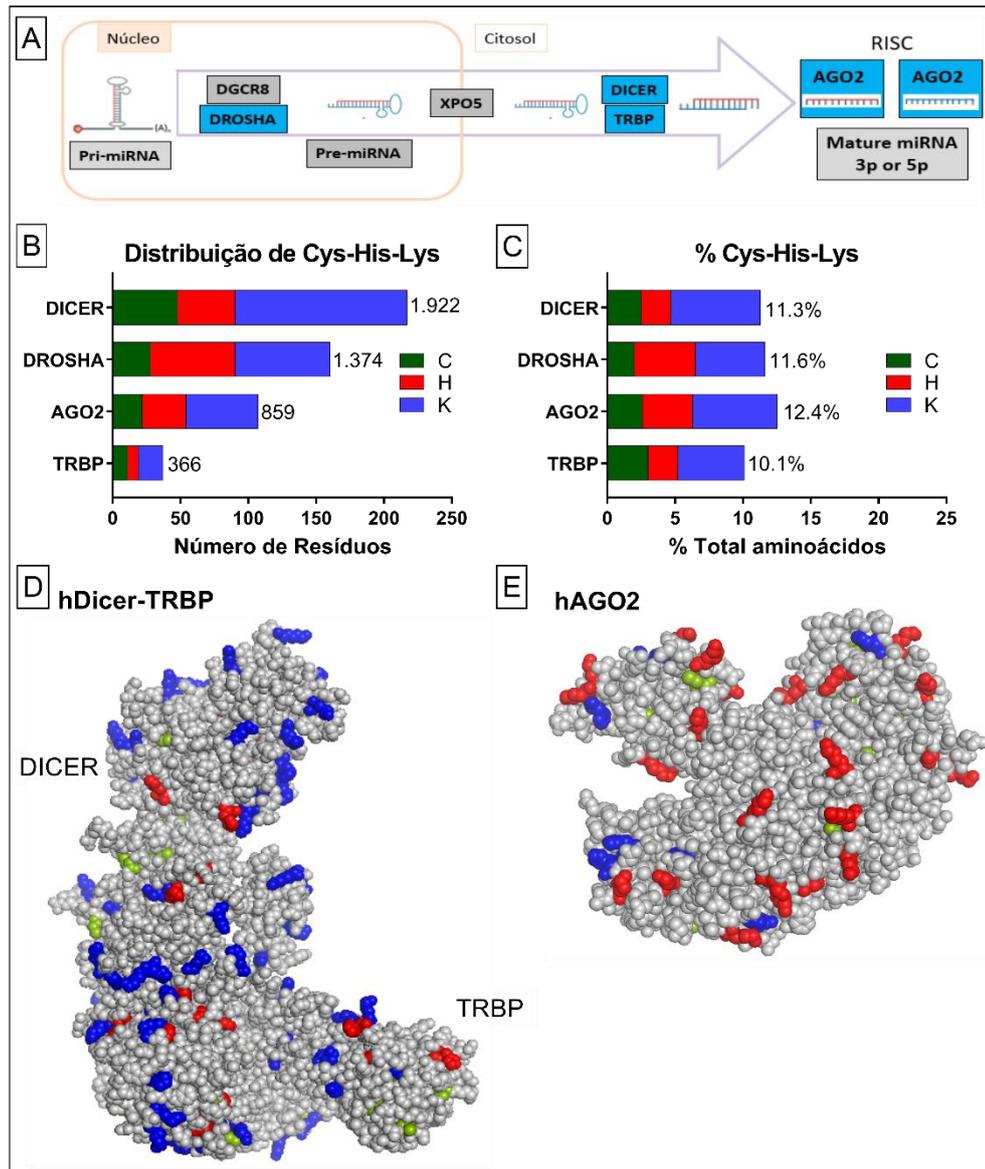


Figura 37. Distribuição dos aminoácidos cisteína, histidina e lisina nas principais proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs. (A) Esquema ilustrativo da via de biogênese de microRNAs, em destaque (azul), as proteínas analisadas; **(B)** Número total de resíduos de cisteína (C, verde), histidina (H, vermelho) e lisina (K, azul) das proteínas Dicer (1.922 aa), Drosha (1.374 aa), AGO2 (859 aa) e TRBP (366 aa); **(C)** Distribuição relativa dos resíduos de cisteína, histidina e lisina; porcentagem de cada aminoácido foi calculada pelo n° aminoácidos específicos/ n° total de aminoácidos $\times 100$; em detalhe, a porcentagem dos resíduos somados de Cys/His/Lys (alvos de 4-HNE) de cada proteína; **(D)** Estrutura

tridimensional de hDicer-TRBP (PDB – 5ZAK) (26), destacando a localização das cisteínas (verde), histidinas (vermelho) e lisinas (azul); **(E)** Estrutura tridimensional de hAGO2 (PDB – 4OLA) (66), destacando a localização das cisteínas (verde), histidinas (vermelho) e lisinas (azul).

Finalmente, analisamos a estrutura tridimensional das proteínas hDicer (PDB 5ZAK) (26) e hAGO2 (PDB 4OLA) (66) com o auxílio do *software* PyMol (Figura 37.D-E). Essa análise teve como objetivo a localização dos resíduos alvos (Cys, His, Lys) na estrutura terciária da proteína. Em ambas as proteínas, os resíduos de cisteína (verde) mostraram-se mais internalizados, enquanto que um número substancial de lisinas (azul) e histidinas (vermelho) podem ser facilmente identificados na superfície das proteínas. Proporcionalmente, AGO2 aparenta apresentar um maior número de resíduos de histidina (vermelho) em sua superfície, enquanto que Dicer expõe um maior número de lisinas (azul). Essa informação pode ser particularmente relevante ao estudar-se o efeito de 4-HNE, visto que o aldeído é capaz de promover *crosslinks* intermoleculares, os quais são primariamente baseados em lisina (Lys-HNE-Lys, Lys-HNE-Cys, Lys-HNE-His) (13,67).

6. DISCUSSÃO

A partir da identificação de Dicer como alvo do aldeído 4-HNE no coração de animais com disfunção cardíaca em estudo anterior do laboratório (dados não publicados), este projeto teve como objetivo avaliar o efeito de tal interação na atividade da endonuclease. Para tanto, foram utilizados diferentes modelos experimentais. Com a finalidade de analisar de forma direta o efeito da interação 4-HNE-Dicer na atividade e estabilidade da proteína, assim como avaliar o papel dos resíduos pré-identificados como alvos do aldeído, foram realizados ensaios com a proteína recombinante *wild-type* e mutante *in vitro*. Paralelamente, utilizamos modelos celulares distintos (H9C2, MEF, HEK) para melhor compreender o efeito agudo do estresse de aldeídos sobre Dicer e a biogênese de miRNAs em sistemas mais complexos. E por último, a fim de melhor caracterizar o primeiro achado, utilizamos o modelo de disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio *in vivo*, condição onde o coração dos animais encontra-se sob estresse crônico de aldeídos. Esse modelo nos permitiu avaliar a atividade e expressão de Dicer, assim como a expressão de microRNAs cardíacos, frente ao estresse de aldeídos no coração disfuncional. Adicionalmente, analisamos o efeito do tratamento com Alda-1, molécula ativadora da enzima mitocondrial ALDH2, sobre o quadro de estresse e da via de biogênese de miRNAs frente ao mesmo.

6.1 Experimentos *in vivo*: Disfunção Cardíaca e Estresse Crônico de Aldeídos

Diversas doenças são caracterizadas pela exposição crônica dos tecidos afetados a condições de estresse oxidativo e de aldeídos (17,20,68,69). Entre elas, as doenças cardiovasculares são as que apresentam maior letalidade (1), como previamente exposto. Apesar de multifatoriais, as doenças cardiovasculares tem sido fortemente associadas ao quadro de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (70,71). Além da geração descompensada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente), o quadro também é caracterizado pelo aumento na produção e circulação de aldeídos reativos (17,20), os quais são produtos, principalmente, de peroxidação lipídica. Entre os principais subprodutos desse processo está o aldeído

4-HNE, cujo acúmulo tem sido descrito no tecido e sangue de pacientes e em modelos animais de IC de etiologia isquêmica (17,20). Visto que o aldeído tem sido relacionado ao desenvolvimento e progressão da doença, tanto a identificação e o estudo de seus alvos celulares, assim como a busca por terapias que visam minimizar ou prevenir suas ações deletérias, são muito importantes.

Nesse sentido, a escolha da disfunção cardíaca pós-IM como um modelo crônico de estresse de aldeídos mostrou-se interessante para compreensão dos processos envolvidos no estabelecimento e progressão da IC, com foco na interação entre 4-HNE e Dicer, proteína chave na biogênese de microRNAs e pré-identificada como alvo do aldeído nessas condições (dados não publicados).

6.1.1. Quatro semanas de tratamento com Alda-1 não protege o coração de animais com disfunção cardíaca pós IM

O primeiro passo do estudo consistiu na caracterização do fenótipo dos animais. Como visto, a cirurgia de infarto do miocárdio foi capaz de induzir a disfunção cardíaca nos animais, os quais apresentaram prejuízo na função cardíaca (redução da FE) e dilatação da câmara ventricular (Figura 15, Tabela S3 – Anexo 6). Adicionalmente, descrevemos um aumento nos níveis de adutos de 4-HNE-proteínas no coração dos animais com DC (Figura 17). Contudo, não observamos nenhuma melhora nos parâmetros ecocardiográficos daqueles tratados com Alda-1 (Figura 15, Pós-Tratamento), contrário ao que havia sido reportado em trabalho prévio de nosso grupo (8).

Vale mencionar que o projeto diferiu do trabalho de Gomes (2014) em alguns aspectos relevantes: (I) tempo de tratamento, visto que os animais foram tratados por 2 semanas a menos, o que também significa dizer que os animais foram acompanhados por 2 semanas a menos no período pós IM; e (II) severidade dos danos desencadeados pelo IM, uma vez que os valores pré-tratamento da Fração de Encurtamento (FE) (Tabela S3, Anexo 6) foram um pouco inferiores àqueles encontrados nos animais do primeiro estudo (FE de grupos DC + V= 24.6% ±1.5; DC + A = 20.3%±1.1) (8). Tal divergência entre protocolos se deu por motivos técnicos, no caso, a indisponibilidade de bombas osmóticas para o tratamento das 2 semanas adicionais.

Por sua vez, ao analisarmos a efetividade de Alda-1 na remoção de 4-HNE, observamos que o tratamento foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de adutos aldeído-proteína, encontrado no coração dos animais com disfunção cardíaca tratados apenas com o veículo da droga (Figura 17). Visto que os níveis proteicos de ALDH2 não variaram entre os grupos, atribuímos a resposta encontrada à atividade da enzima, a qual foi aumentada após adição de Alda-1, seu agonista alostérico (Figura 16). Esses resultados corroboraram àqueles encontrados nos trabalhos prévios de Gomes e colaboradores (8,20). Em estudos separados, os pesquisadores caracterizaram o acúmulo de 4-HNE no coração de ratos por um período de até 10 semanas pós-IM, o qual foi acompanhado pela redução do controle respiratório mitocondrial e aumento na geração de EROs. Em ambos os estudos, o tratamento com Alda-1 foi capaz de restaurar os níveis de adutos de 4-HNE-proteínas próximos aos valores controle e, minimizar os efeitos deletérios do aldeído sobre a função mitocondrial e cardíaca dos animais tratados (8,20).

No entanto, no presente trabalho, não observamos uma melhora na função cardíaca dos animais tratados com Alda-1, apesar do controle dos níveis de adutos 4-HNE-proteínas. Possivelmente, a severidade do dano isquêmico (marcada por acentuada redução na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo) e o momento de início do tratamento representem fatores determinantes para o (in)sucesso do mesmo. Um maior comprometimento do coração deve ser acompanhado de prejuízos proporcionais à função cardíaca, os quais somados ao remodelamento patológico, não são capazes de serem revertidos apenas pela remoção dos aldeídos em um estágio mais avançado do estabelecimento da doença. Contudo, tal remoção pode ainda ser importante na manutenção e proteção do coração contra danos adicionais a longo prazo (8).

Nessa direção, nosso grupo reportou uma aparente estabilização da função cardíaca dos animais com disfunção após 6 semanas de tratamento com Alda-1 (8). Enquanto que os animais não tratados apresentaram uma piora progressiva na função cardíaca (redução de FE) no decorrer do tempo de análise (entre 4 e 10 semanas pós-cirurgia), os animais tratados com Alda-1 mantiveram-se estáveis no mesmo período, apresentando uma pequena melhora no quadro quando comparados àqueles sem tratamento. Contudo, o tratamento com Alda-1, também iniciado 4 semanas após a

cirurgia, não restabeleceu a função cardíaca dos animais próxima aos valores controle (8).

Adicionalmente, o momento de início do tratamento com Alda-1 deve apresentar um papel relevante na efetividade do mesmo, principalmente, no que diz respeito à proteção contra a morte celular direta (área isquêmica) e indireta (área de borda) e, estabelecimento da área de infarto. No trabalho em que descreveu a molécula Alda-1 como agonista de ALDH2, Chen e colaboradores (2008) reportaram o efeito cardioprotetor de Alda-1 quando o tratamento era fornecido imediatamente antes ao dano isquêmico em modelos de isquemia e reperfusão *ex vivo* (método de *Langendorff*) e *in vivo* (19). Em ambos os modelos, os autores observaram redução significativa na área de infarto, resposta que associaram à remoção do aldeído 4-HNE pela enzima ALDH2.

Em 2015, Gomes e colaboradores, utilizando o mesmo protocolo cirúrgico e tempo de tratamento (4 semanas) que o presente estudo, reportaram uma melhora na função cardíaca dos ratos tratados com Alda-1. Porém, diferentemente do presente estudo, os pesquisadores iniciaram o tratamento dos animais 24 horas após a cirurgia de infarto do miocárdio (20), antes do estabelecimento do quadro de disfunção cardíaca, descrito no mesmo trabalho a partir da primeira semana pós-cirurgia. Ambos os trabalhos fornecem evidências de que o tratamento com Alda-1 seja mais eficiente na cardioproteção quando iniciado imediatamente antes ou após o insulto isquêmico (19,20), o que poderia justificar parcialmente a ausência da melhora no quadro dos animais no presente trabalho.

Apesar disso, todos os desenhos experimentais nos quais o tratamento com Alda-1 tem sido testado possuem grande relevância clínica, pois se baseiam no fato de que os pacientes que são hospitalizados e medicados apresentam condições médicas diversas. Os mesmos podem ser atendidos imediatamente após um infarto agudo do miocárdio, serem submetidos ou não à angioplastia (procedimento de reperfusão), ou iniciarem o tratamento meses após a ocorrência do insulto isquêmico, onde já apresentam sintomas de disfunção ou mesmo insuficiência cardíaca. Adicionalmente, a severidade/extensão do dano isquêmico e a gravidade do quadro variam amplamente entre os pacientes, os quais podem ainda apresentar outras doenças

(ex.: diabetes, hipertensão, câncer, etc) e fatores de risco (ex.: consumo de álcool, tabagismo, obesidade, fatores genéticos, etc).

6.1.2. Redução na Atividade de Dicer e expressão de miomiRs

Após a confirmação do estabelecimento do quadro de disfunção cardíaca e dos níveis aumentados de 4-HNE, avaliamos a expressão e a atividade de Dicer no coração desses animais, assim como a expressão de miRNAs cardíacos e seus respectivos transcritos primários (pri-miRs). Nossa hipótese era de que a interação 4-HNE-Dicer reduziria a atividade da proteína, com conseqüente diminuição nos níveis dos miRNAs.

Ao avaliarmos a expressão de Dicer, não encontramos alterações significativas nos níveis transcricional (mRNA) e proteico entre os grupos analisados (Figura 18.A-C). Por sua vez, como esperado, observamos uma redução de aproximadamente 50% na atividade de Dicer no coração dos animais com disfunção cardíaca (em lisado total de tecido), quando comparados ao grupo controle (Figura 18.D). Notavelmente, o tratamento com Alda-1 protegeu parcialmente os animais tratados, os quais também apresentaram redução na atividade da enzima, porém não significativa. Contudo, deve-se considerar que houve uma maior dispersão de dados no último grupo, o que poderia justificar parcialmente a ausência de significância estatística.

Nesse estudo, optamos pela análise de miRNAs específicos de músculo (miomiRs), com o objetivo de restringir a análise àqueles miRNAs expressos no coração, onde os níveis e atividade de Dicer foram avaliados, minimizando a contribuição de miRNAs produzidos em outros tipos celulares na análise. Desse modo, esperávamos relacionar a atividade de Dicer às possíveis alterações na expressão dos miomiRs. De forma condizente com a literatura, encontramos respostas distintas nos miRNAs analisados: redução na expressão dos miR-1 e miR-208a e aumento nos níveis do miR-208b no ventrículo esquerdo de animais com disfunção cardíaca (Figuras 20 e 21) (72,73). Os demais miRNAs avaliados não apresentaram alterações significativas entres os grupos (miR-133a, miR-133b, miR-499) (Figuras 20 e 21). Vale mencionar que o miR-1, um dos miRNAs reduzidos no

coração dos animais com DC, é o miRNA mais abundante no coração, representando ~20-40% do total expresso nesse tecido.

Similarmente ao encontrado para a atividade de Dicer, a redução observada nos níveis dos miRNAs foi parcialmente prevenida nos animais tratados com Alda-1, os quais apresentaram valores de expressão intermediários entre àqueles do grupo controle e DC veículo (Figura 21). Como pode ser observado, contudo, apesar da tendência de redução, os miRNAs analisados não apresentaram resposta homogênea e proporcional ao observado para a atividade de Dicer (redução de ~50%). De modo que fatores adicionais devem estar por trás da resposta observada. Na mesma direção, estudos que sequenciaram os miRNAs no ventrículo esquerdo de pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica descompensada e em modelo animal da doença não reportaram reduções globais nos níveis de miRNAs (72,73).

De fato, a maioria dos estudos fornecem listas de miRNAs que são mais e menos expressos nessa condição (72,73). Interessantemente, alguns trabalhos identificaram maiores níveis de miomiRs (miR-1 e miR-133) no sangue de pacientes com IC quando comparados ao grupo controle (73). Contudo, a análise dos miRNAs expressos no ventrículo esquerdo desses pacientes não descreveu alterações em sua expressão que justificariam tal aumento na circulação. Uma avaliação da expressão de miomiRs em outras áreas do coração (ventrículo direito ou átrios) poderia dar pistas sobre a origem e possível papel (compensatório?) desses miRNAs. Nessa direção, Kakimoto e colaboradores (2016) sequenciaram os miRNAs das câmaras cardíacas de ratos em condição basal e reportaram a expressão diferencial de miRNAs em regiões distintas do coração. Como exemplo, os miomiRs miR-208a e miR-208b foram mais abundantes no átrio esquerdo e ventrículo esquerdo, respectivamente (74).

Com relação aos miRNAs analisados, sabe-se ainda que os miR-208a, miR-208b e miR-499 são codificados na região intrônica dos genes da miosina 6 (Myh6, isoforma α MHC), miosina 7 (Myh7, isoforma β MHC) e miosina 7b (Myh7b, homóloga à isoforma β MHC) (75), respectivamente, e sofrem regulação em quadro de disfunção e hipertrofia cardíaca (76). A contratilidade cardíaca está diretamente relacionada à composição de proteínas contráteis do coração. Entre elas, o balanço entre as miosinas de cadeia pesada MHC α e β (*Myosin Heavy Chain*) desempenha um importante papel na função cardíaca durante o desenvolvimento e no coração adulto. Sabe-se que em

roedores, a isoforma α MHC (contração rápida) é a mais abundante no coração adulto, já em humanos, a isoforma β MHC (contração lenta) é a predominante (75,77). A razão entre essas duas isoformas é finamente regulada, sendo que alterações na mesma foram relacionadas ao estabelecimento de cardiomiopatias (75,77). Visto que a expressão dos miRNAs supracitados está associada aos genes das miosinas, os mesmos devem apresentar um importante papel na regulação dessa razão e função contrátil cardíaca (75,77). O aumento na expressão de miR-208b, por exemplo, já foi reportado em quadros de hipertrofia cardíaca induzida cirurgicamente em animais (76).

6.1.3. Níveis de miRNAs no coração: síntese x decaimento

De modo geral, os níveis de miRNAs presentes em uma determinada célula dependem de sua taxa de transcrição, processamento e decaimento (78). Com relação ao último processo, fatores como estabilidade e taxa de *turnover*, específicos de cada miRNA, devem ser considerados (79). Sabe-se que a disponibilidade da proteína AGO2 (proteína efetora do complexo RISC) e dos alvos de RNA são determinantes na estabilidade dos miRNAs, visto que sua ligação aos mesmos estabilizam e protegem o miRNA contra a sua degradação (80). Para testar essa hipótese, Pitchiaya e colaboradores (2017) avaliaram a estabilidade do miRNA let-7 marcado com fluoróforo após sua microinjeção em células U2OS. O miRNA sonda ficou estável por ~16 horas, enquanto que seu correspondente com mutação inserida na região *seed* (região complementar ao RNA alvo), incapacitado de interagir com alvos de RNA e ser incorporado por AGO2, foi rapidamente removido (80). Notavelmente, os pesquisadores identificaram a retenção de uma parte dos miRNAs injetados no núcleo das células, onde se mantiveram estáveis na presença de seu alvo (80). Desse modo, a relação entre miRNA e mRNA pode ser considerada paradoxal, visto que o miRNA regula negativamente os níveis de seu alvo, contudo, a estabilidade do miRNA depende da disponibilidade dos seus alvos.

Os processos que modulam a estabilidade do miRNA são complexos e ainda elusivos na literatura. Estudos *in vitro* demonstraram que o complexo miRNA e AGO2 é estável por dias quando isolado, contudo, a adição de RNA complementar no meio

reacional altera a estabilidade do complexo de acordo com o seu grau de complementariedade com o miRNA (81). Esse mecanismo deve ser importante para o *turnover* de AGO2, componente efetor do complexo RISC. No ambiente celular, onde o miRNA está exposto à nucleases e a alvos com complementariedade e disponibilidade distintas e variáveis, essa dinâmica se torna muito mais complexa.

Além dos mRNAs (alguns miRNAs apresentam >300 alvos (80)), pseudogenes, regiões intrônicas (*agotrons*, (82)) e lncRNAs (*long non-coding RNA*) já foram descritos como alvos de miRNAs (83), os quais acabam por regular sua disponibilidade, visto que “sequestram” os miRNAs, impedindo que os mesmos atuem sobre o seus alvos codificantes ou sejam degradados (84). Dessa forma, os miRNAs podem ser encontrados ligados a mRNAs associados a polissomos e *P-Bodies*, lncRNAs e mesmo no núcleo (Figura 38) (80). Adicionalmente, o transporte de miRNAs entre diferentes células e tecidos via exossomos aumenta o nível de complexidade dessa análise.

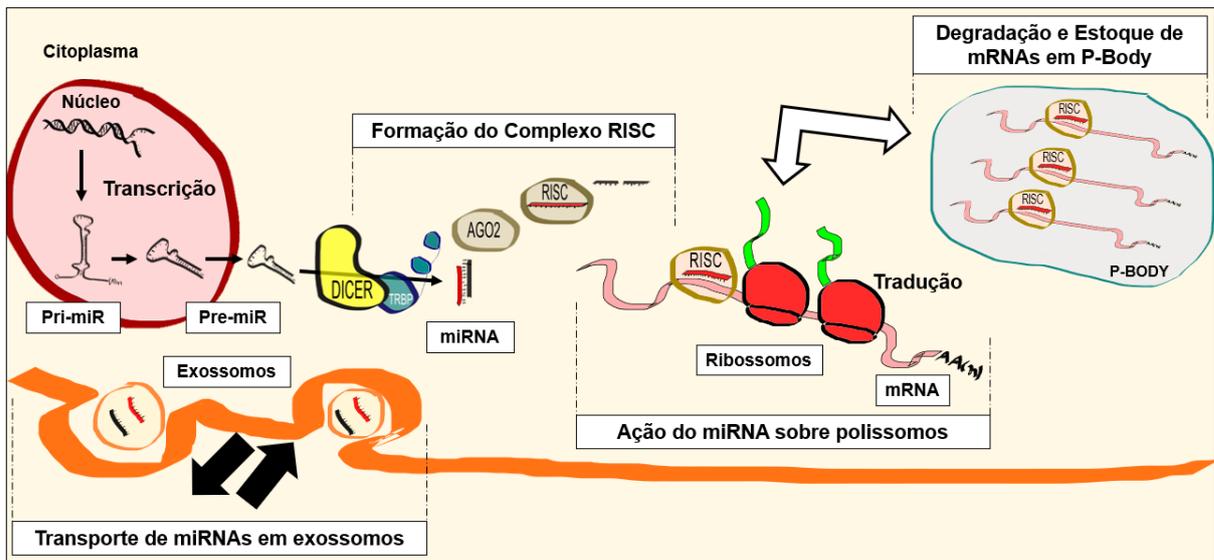


Figura 38. Turnover e transporte de miRNAs. Após transcrição, o miRNA primário (pri-miR) passa por duas clivagens, a primeira no interior do núcleo pelo complexo micro-processador (Drosha e DGCR8) e a segunda no citoplasma pela endonuclease Dicer (em destaque em amarelo), dando origem a um duplex de RNA de ~21nt (miRNA); o miRNA pode ser transportado em exossomos para outras células/tecidos ou incorporado pelo complexo RISC, o qual seleciona uma das fitas (fita guia); o complexo RISC então irá atuar sobre o mRNA alvo por complementariedade de bases entre miRNA-mRNA, bloqueando a tradução (polissomos) e/ou recrutando proteínas relacionadas à deadenilação e degradação do mRNA, a qual ocorre principalmente em regiões denominadas de *p-bodies*. Sabe-se que os mRNAs podem ser armazenados no interior dos *p-bodies* e voltar a ser traduzidos (seta branca indica a possível movimentação dos mRNAs entre os diferentes estágios). Fonte própria.

Por este motivo, alguns autores defendem a análise da expressão de miRNAs e/ou mRNAs em frações celulares específicas, como em polissomos, visando a avaliação dos miRNAs associados aos mRNAs ativamente traduzidos (85,86). Contudo, uma limitação dessa abordagem é a questão temporal, visto que os miRNAs atuam de duas formas distintas e, aparentemente, sequenciais sobre os seus alvos, via inibição da tradução, seguida da indução da deadenilação e degradação do mRNA alvo, a qual pode ocorrer em outros compartimentos celulares, como *p-bodies* (87). Desse modo, a análise de frações celulares distintas ou em períodos diferentes podem gerar resultados contraditórios (85). A existência de “reservatórios endógenos” de miRNAs e mRNAs podem ser justificativas plausíveis para a fraca correlação reportada em diversos estudos entre os níveis de mRNAs e proteínas correspondentes, ou mesmo entre miRNAs e seus alvos.

Recentemente, a técnica denominada de HITS-CLIP (*crosslinking immunoprecipitation coupled with highthroughput sequencing*) foi proposta como alternativa ao sequenciamento de RNA/miRNA (padrão-ouro), e utilizada para identificar os miRNAs e seus alvos associados a AGO2 em amostras de coração humano (83). O método se baseia na imunoprecipitação de AGO2, seguida do sequenciamento do RNA ligado à proteína. Interessantemente, alguns dos alvos de miRNAs identificados nesse estudo corresponderam a regiões intrônicas (agotrons, (82)) e lncRNA (83).

No contexto desse estudo, é importante considerar que os miRNAs expressos no coração estão sujeitos aos três processos e, portanto, não podemos relacionar a expressão dos mesmos somente à sua via de síntese. Do mesmo modo, alterações na atividade de Dicer não devem causar sozinhas um efeito drástico e homogêneo na expressão de todos os miRNAs presentes no tecido. Como visto, é preciso considerar que os miRNAs estão sujeitos à própria regulação transcricional, além da expressão e disponibilidade dos seus alvos, entre outros fatores que determinam sua estabilidade e taxa de *turnover* (78). No caso dos miRNAs analisados nesse trabalho, não observamos alterações no nível transcricional (expressão dos microRNAs primários) (Figura 19). De modo que os níveis finais de miRNAs corresponderam, possivelmente, ao balanço entre o processamento pós-transcricional (reduzido na etapa executada por Dicer) e o decaimento desses miRNAs (via degradação e/ou transporte). Diferentemente dos ensaios *in vitro*, onde é possível avaliarmos de forma

direta as alterações na atividade de Dicer e seu efeito no processamento do miRNA, visto que o *input* e os produtos são conhecidos, assim como os componentes do meio reacional, nas células e tecidos, os mecanismos são mais complexos e menos lineares.

Essa noção é corroborada por Rao P.K. e colaboradores (2009), em estudo que avaliou os níveis de miRNAs expressos em coração de camundongos em condição basal por meio de seu sequenciamento (88). Os pesquisadores questionaram a discrepância nos níveis do miR-1 (~40% do total de miRNAs) e miR-133 expressos no tecido, visto que ambos os miRNAs estão presentes no mesmo *cluster* (íntron do gene C20orf166) (89), e apontaram para o possível papel de processos pós-transcricionais, como o processamento ou estabilidade, na abundância dos miRNAs.

Notavelmente, no presente trabalho, observamos uma redução significativa nos níveis do miR-1 no coração dos animais com disfunção cardíaca (Figura 20.B), sem alteração no transcrito primário (Figura 19.B). Essa resposta foi de encontro com a redução na atividade de Dicer no mesmo grupo. De modo que um prejuízo na via de processamento poderia responder parcialmente pelo resultado obtido, considerando que fatores adicionais, como aqueles relacionados à estabilidade do miRNA, também apresentaram um papel. Ainda, como ambos os parâmetros foram melhorados nos animais tratados com Alda-1, especulamos sobre a existência de associação entre os níveis de 4-HNE, atividade de Dicer e alteração na expressão do miRNA. Contudo, o modelo de estudo adotado (animal) não permitiu a avaliação de uma relação causal entre as variáveis, visto que não é possível isolar o papel de cada fator (ex.: interação Dicer-4-HNE, atividade de Dicer, etc.) na resposta. Apesar disso, como observamos uma melhora nos parâmetros analisados nos animais tratados com Alda-1, molécula ativadora de ALDH2 (responsável pela remoção do 4-HNE), existe um indício importante de que o 4-HNE (ou sua remoção) pode estar envolvido na resposta.

6.1.4. Análise das demais proteínas da biogênese de miRNAs

Por último, analisamos a expressão gênica relativa de outras proteínas da via de biogênese do miRNA (Drosha, DGCR8, XPO5, TRBP e AGO2). Como visto, a via de biossíntese do miRNA envolve várias etapas desde a transcrição até a sua incorporação no complexo RISC (23) (Figura 22.A), cujo comprometimento também poderia levar a alterações nos níveis de miRNAs.

Com relação às proteínas Drosha e DGCR8, componentes do complexo microprocessador, não foram encontradas alterações em seu nível transcricional (Figura 22. B-C). No mesmo sentido, a análise do transcrito primário do miRNA (pri-miR), substrato do complexo, também não apontou alterações significativas entre os grupos. Um acúmulo nuclear de pri-miR seria esperado caso o complexo estivesse disfuncional ou ineficiente (90), o que não ocorreu. Desse modo, podemos inferir que não houve alterações biologicamente significativas na primeira etapa de processamento do miRNA no núcleo: transcrição e clivagem de pri-miRNA em pré-miRNA.

Como pode ser observado na Figura 22, com exceção de TRBP, a expressão das demais proteínas não apresentou diferença significativa entre os grupos. Contudo, a mesma diferença não se refletiu no nível proteico (Figura 23. A-B). A TRBP é uma proteína muito importante na via, visto que atua em complexo com a Dicer (cofator) no reconhecimento do substrato de RNA (pre-miR) e carregamento do mesmo na Dicer (91–93). Notavelmente, a deleção tecido-específica de TRBP no coração de camundongos, assim como descrito para Dicer (47), demonstrou ser capaz de induzir cardiomiopatia e insuficiência cardíaca nos animais (94). No estudo, os pesquisadores relacionaram tal ação à redução nos níveis do miR-208a, ativação de Sox6 (alvo direto do miR-208a) e alteração na razão das proteínas contráteis de miosina. A interação Dicer-TRBP tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos (93,95), os quais apresentam certa controvérsia quanto ao papel da proteína na seleção da fita guia e acurácia na clivagem de Dicer. De modo geral, alterações nos níveis de TRBP poderiam afetar a função de Dicer. No contexto desse estudo, contudo, não encontramos alterações nos níveis proteicos de TRBP, apesar da redução encontrada no nível transcricional nos animais com disfunção cardíaca.

Outra proteína analisada em detalhe foi a Argonauta 2 (AGO2), componente efetor do complexo RISC. Como discutido anteriormente, a proteína apresenta um

importante papel na estabilidade do miRNA e ação do mesmo sobre o RNA alvo, via inibição da tradução e recrutamento de efetores dos processos de deadenilação e degradação do mRNA (27,80). Como pode ser observado nas Figuras 22.F e 23.C-D, não encontramos alterações no nível transcricional e proteico de AGO2 entre os grupos analisados.

A partir dos dados coletados nesse estudo, não temos evidências experimentais de alterações nas demais proteínas envolvidas na via de biogênese de miRNA, as quais poderiam responder pelas modificações encontradas na expressão dos miRNAs. Contudo, é importante ressaltar que nossas análises se restringiram à expressão gênica e proteica (apenas de Dicer, TRBP e AGO2). Não foram avaliados parâmetros funcionais, como atividade enzimática (Drosha) ou estabilidade de complexo (TRBP, DGCR8) e afinidade (AGO2), assim como possíveis modificações pós-traducionais (ex.: fosforilação, SUMOilação, interação com 4-HNE). Sabe-se que as proteínas TRBP e DGCR8 são alvo de fosforilação pela MAPK/ERK (96,97), a qual confere maior estabilidade às proteínas. Em 2017, alguns estudos descreveram também a fosforilação de AGO2 e seu papel na modulação da interação da proteína com o mRNA (*binding*) e, conseqüentemente, sobre o processo de silenciamento (98,99).

Como previamente discutido, os sistemas biológicos apresentam alta complexidade, o que significa dizer que muitos processos ocorrem simultaneamente e contribuem na coordenação da resposta observada. Visto que o foco do presente trabalho era a avaliação da interação Dicer-4-HNE, nossos esforços foram concentrados na caracterização de Dicer. Porém, é importante considerarmos que muitos outros fenômenos são desencadeados como resposta ao estresse de aldeídos e à condição patológica de disfunção cardíaca e, apresentam um papel no fenótipo observado. Nesse contexto, como estratégia, adotamos o uso de modelos mais simples (cultura de células e ensaios *in vitro*), na tentativa de isolar o processo de interesse e melhor compreender o papel da interação 4-HNE-Dicer na atividade da enzima e biogênese dos miRNAs frente ao estresse de aldeídos.

6.2. Modelos celulares - exposição aguda ao 4-HNE reduz a atividade de Dicer e afeta biogênese de microRNAs

Nesse modelo, a primeira etapa teve como objetivo encontrar uma condição de estresse de aldeídos moderado, onde fosse possível observar a modificação de proteínas por 4-HNE e estudar o efeito da mesma sobre a atividade de Dicer, assim como avaliar o potencial efeito protetor de Alda. Para tanto, inicialmente, avaliamos a morte celular por necrose a apoptose, visto que o 4-HNE é capaz de induzir morte através de ambos os mecanismos (100,101) (Figura 24).

No final de 2016, Yun Ji e colaboradores estudaram a ativação da via de apoptose induzida por 4-HNE em células epiteliais de intestino, e verificaram que a mesma envolvia a ativação da quinase ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases*) (102). Interessantemente, em outro estudo, Drake e colaboradores (2014) identificaram um sítio de fosforilação por ERK em Dicer (domínio RNaseIIIb), o qual está relacionado à sua translocação para o núcleo em *C. elegans*, camundongos e humanos (42). Entretanto, a fosforilação e translocação para o núcleo da Dicer em quadro de apoptose induzido por 4-HNE ainda não foi descrito na literatura.

Adicionalmente, dois trabalhos reportaram a clivagem de Dicer no quadro de apoptose em diversas linhagens de células humanas (103) e no nematóide *C. Elegans* (104). Os autores verificaram que a proteína era clivada pela caspase 3 ativa (clivada), e identificaram os seus sítios de clivagem, os quais encontram-se localizados no domínio RNaseIIIa, resultando em dois fragmentos de ~180kDa e ~42kDa (103). Notavelmente, a proteína Dicer clivada apresentou atividade DNase, de modo que o estudo sugeriu que a proteína poderia estar envolvida na quebra de DNA nuclear durante a apoptose (104).

Por esse motivo, avaliamos os níveis de Caspase 3 clivada (Cas3) e de fosforilação de ERK1/2 nas células após o tratamento (4-HNE 50µM, 2h). Condizente com a literatura, observamos intensa clivagem de Casp3 e fosforilação de ERK1/2 nas células tratadas com 4-HNE (Figura 24.C), um indicativo de que a via de apoptose encontrava-se ativada 2 horas após a intervenção. No entanto, não observamos morte por necrose no mesmo período (Figura 24.B). Por sua vez, 24 horas de exposição à dose única de 4-HNE causaram morte acentuada, avaliada pela liberação da enzima

LDH no meio de cultura. Desse modo, a dose de 50 μ M 4-HNE se mostrou interessante, visto que não causou morte nas primeiras horas de análise, possibilitando a avaliação de Dicer, mas com efeito tóxico a médio prazo, permitindo o teste de Alda.

Como visto, nessa condição de estresse (4-HNE 50 μ M, 24h), não observamos proteção das células tratadas com Alda (Figura 24.B). Porém, o local de ação da droga deve ser considerado, a qual atua sobre uma enzima mitocondrial (ALDH2) ativa apenas nesse compartimento, de modo que a ação do 4-HNE no citoplasma e núcleo não é prevenida pelo tratamento. Essa observação é importante, visto que o 4-HNE foi adicionado diretamente no meio de cultura e deve atravessar a membrana plasmática e o citoplasma até atingir as mitocôndrias, onde a enzima ALDH2 está localizada.

Nesse contexto, seria interessante o uso de um modelo de estresse onde o 4-HNE fosse gerado de forma endógena. Dessa forma, como a mitocôndria é uma das principais fontes de EROs e alvo de peroxidação lipídica (105), o tratamento com Alda teria, potencialmente, uma maior eficiência. Contudo, poucos trabalhos na literatura utilizam o modelo de estresse endógeno de 4-HNE (55). No início desse estudo, utilizamos o herbicida Paraquat (gerador de ânion superóxido) (9), na tentativa de padronizar um modelo de estresse endógeno de 4-HNE. Apesar dos esforços empregados, não obtivemos sucesso em encontrar uma janela de análise onde pudéssemos observar um aumento nos níveis do aldeído (dados não apresentados). De modo que optamos pela adição direta do 4-HNE no meio de cultura em todas as etapas.

Nesse modelo, observamos um aumento nos níveis dos adutos de 4-HNE-proteínas após duas horas de exposição ao aldeído (Figura 25), o qual foi acompanhado pela redução na atividade catalítica de Dicer no grupo tratado com 4-HNE (Figura 26.C-D). Curiosamente, as células expostas ao aldeído apresentaram uma banda adicional mais pesada também identificada pelo anticorpo anti-Dicer na análise de *western blotting* (Figura 26.A). Uma possível explicação para a resposta observada seria o acúmulo da proteína modificada (ou agregada), o qual poderia ser um estágio intermediário prévio à sua degradação. Ao considerarmos ambas as bandas na análise, encontramos um aparente acúmulo de Dicer nas células tratadas

com 4-HNE (Figura 26.B), contudo, o mesmo não se refletiu sobre a atividade de Dicer mensurada no lisado celular, a qual foi inferior quando comparada ao grupo controle. Interessantemente, resposta similar foi descrita em estudo que avaliou a proteína Dicer em macrófagos expostos ao extrato de fumaça de cigarro (106). Os pesquisadores detectaram a presença de bandas com maior peso molecular, atribuídas à SUMOilação de Dicer induzida por acroleína, aldeído presente na fumaça do cigarro. A modificação de Dicer foi acompanhada de prejuízo em sua função e na biossíntese de miRNAs.

Resultado semelhante foi observado nos experimentos com as células da linhagem MEF. As células tratadas com 4-HNE também apresentaram menor atividade de Dicer quando comparadas ao grupo controle (Figura 27.C-D). Porém, diferentemente do resultado obtido para as células H9C2, os níveis proteicos de Dicer foram reduzidos no grupo tratado com o aldeído, o que poderia justificar a queda na atividade (Figura 27.E-F). É importante mencionar que nesse modelo utilizamos a superexpressão da proteína Dicer na linhagem *knockout Dcr -/-* como estratégia para aumentar a especificidade do ensaio de atividade da enzima. Nesse contexto, considerando que a expressão de Dicer foi dependente da transfecção celular e superestimulada em ambos os grupos, a queda nos níveis proteicos observada no grupo exposto ao 4-HNE deve ter sido induzida por degradação da proteína, não por modulação da síntese. Contudo, não foram realizados testes específicos adicionais para verificar essa hipótese (ex.: bloqueio da degradação).

A redução na expressão de Dicer em células expostas ao estresse oxidativo (H₂O₂, UV e Paraquat) já foi descrita por Mori e colaboradores (2012) (49). No mesmo trabalho, os autores verificaram que o tratamento prévio dos pré-adipócitos com insulina os protegia contra apoptose induzida por H₂O₂, e prevenia a redução na expressão gênica de Dicer. Recentemente, Lai HH e colaboradores (2018) reportaram que o fator de transcrição HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor*), importante oncogene envolvido na resposta celular à hipóxia, interage diretamente com Dicer em diversas linhagens celulares de câncer, facilitando sua ubiquitinação por Parkin E3 ligase e degradação autofágica (107). O último estudo vem de encontro a trabalhos anteriores da literatura científica que reportaram a redução nos níveis de Dicer em condições de hipóxia, principalmente, em câncer (50,51,108). Reforçando a ideia de que a proteína seja modulada pós-traducionalmente em quadro de estresse e morte celular (109).

Por último, utilizamos a linhagem HEK (RNAi-293-EGFP/RFP), a qual funciona como um sistema repórter da via de biogênese do miRNA, para avaliar o efeito do 4-HNE sobre a mesma. Em dois experimentos isolados, observamos alteração na razão GFP/RFP nas células tratadas com 4-HNE (Figura 28.D-E). Baseando-se no constructo celular, uma possível justificativa para tal resposta seria o prejuízo na via de biogênese do siRNA. Notavelmente, apesar de não ser possível isolar e identificar o papel de Dicer na resposta observada, o tratamento com 4-HNE demonstrou ser capaz de atuar sobre a via de biogênese de miRNAs, sendo um indício de que o quadro de estresse de aldeídos é capaz de modular sua síntese.

Em 2009, Pizzimenti S. e colaboradores avaliaram o efeito do 4-HNE (1 μ M, doses múltiplas, 8 horas) sobre os níveis de miRNAs em células HL-60 (110). Nessas condições, os autores reportaram alteração significativa em apenas 10 do total de 470 miRNAs analisados, sendo 6 reduzidos e 4 aumentados. Contudo, é importante considerarmos a concentração e o tempo de exposição ao 4-HNE utilizados no estudo, visto que a resposta ao aldeído parece ser dose-dependente (111). Adicionalmente, como discutido anteriormente, os níveis de miRNAs são dependentes do balanço entre sua síntese e decaimento, específicos de cada miRNA (78). De modo que a detecção de alterações nos níveis de miRNAs mais estáveis não deve ser possível em um curto período de análise. Nesse contexto, a duração do estímulo (exposição ao 4-HNE), o período de análise e a fração celular avaliada (ex.: lisado total, polissomos, complexo Ago2) devem ser considerados durante a análise.

Dessa forma, o estresse agudo com 4-HNE (50 μ M) demonstrou ser capaz de reduzir a atividade de Dicer e afetar a biossíntese de miRNAs, contudo, o mecanismo (modificação e/ou degradação da proteína) não ficou claro. A partir dos resultados obtidos nessa etapa do estudo, não podemos inferir qual o papel da interação 4-HNE–Dicer na resposta encontrada. Para tanto, seria necessária a expressão da proteína com a substituição dos resíduos de aminoácidos identificados como sítio de interação com o aldeído (Figura 13), impedindo a ligação Dicer-4-HNE. Porém, como os testes *in vitro* com a proteína Dicer recombinante mutante não detectaram proteção da mesma contra o efeito inibitório do 4-HNE (Figura 35), optamos por não seguir com os experimentos no modelo celular (transfecção e expressão da proteína Dicer mutante). Possivelmente, sítios adicionais de Dicer (não identificados) devem ser

alvos de 4-HNE, de modo que as substituições realizadas não foram capazes de prevenir totalmente a interação aldeído-proteína.

Em contraste com o modelo animal, onde a resposta observada no tecido cardíaco é resultante de um intrincado balanço de processos fisiológicos (e patológicos) e fenômenos celulares, o modelo celular nos permitiu isolar o sistema e avaliar direta e especificamente a resposta das células frente à exposição ao 4-HNE. Entretanto, é preciso considerar que esse modelo também apresenta alta complexidade, e inúmeros fatores devem estar atuando frente ao estímulo estressor, como: ativação de vias regulatórias e de sinalização celular (ex.: pró-apoptótica, pró-sobrevivência, ativação da defesa antioxidante), modificações pós-traducionais de proteínas (fosforilação, clivagem, etc) e do estado redox celular (presença de moléculas redutoras podem sequestrar o 4-HNE, como observado com DTT), o *turnover* de proteínas (balanço entre síntese e degradação), entre outros. Nesse contexto, a avaliação isolada dos efeitos da interação entre 4-HNE-Dicer na resposta observada não é algo trivial.

Sabe-se ainda que a concentração do 4-HNE é um fator determinante na resposta celular ao estresse (111). Enquanto que baixas concentrações do aldeído podem desencadear respostas protetoras (hormese) (112) ou mesmo pré-condicionar as células contra um insulto mais severo (113), altas concentrações de 4-HNE foram relacionadas com a indução de morte celular via necrose e apoptose (101). Por exemplo, Yan Zhang et al (2010) verificaram a ocorrência de pré-condicionamento dos cardiomiócitos tratados por baixas concentrações de 4-HNE contra seu efeito citotóxico em maiores concentrações. Os pesquisadores observaram que o efeito cardioprotetor estava associado à ativação da via de Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) e aumento da biossíntese de glutathiona (GSH) (113).

Dessa forma, o efeito final desencadeado pela exposição ao aldeído parece ser dependente da concentração do mesmo, da duração do estresse e da capacidade celular de produzir e remover o aldeído (ex.: expressão de enzimas antioxidantes, estado redox celular) (101). Os mesmos processos devem ser importantes na interação Dicer-aldeído, como discutido no próximo tópico.

6.3. Ensaio *in vitro*: 4-HNE causa redução da atividade e estabilidade de Dicer de forma tempo- e concentração-dependentes

Como mencionado, o 4-Hidroxi-2-Nonenal (4-HNE) é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, processo que encontra-se exacerbado em condições de estresse oxidativo (13). Devido a sua alta reatividade com biomoléculas, muitos estudos tem reportado efeitos deletérios do 4-HNE na função e estabilidade das proteínas alvos (67,114–116). Contudo, tanto a interação 4-HNE-Dicer, como seu efeito na atividade e estabilidade de Dicer não foram descritos na literatura até o momento. Baseados em um estudo prévio do nosso grupo, nós hipotetizamos que a interação 4-HNE-Dicer pode, potencialmente, modular negativamente a atividade da enzima, e afetar a biogênese de microRNAs em células/tecidos sob condições de estresse oxidativo, nas quais altos níveis do aldeído tem sido reportados (ex.: doenças cardiovasculares) (17,20).

Nessa etapa do estudo, nós demonstramos que o 4-HNE interage diretamente com Dicer *in vitro*, e a formação de conjugados Dicer-4-HNE é responsável pela perda de atividade de Dicer de modo tempo- e concentração- dependentes (Figuras 29 e 30). Notavelmente, mesmo em altas concentrações de 4-HNE (50-300 μ M), sua adição no meio reacional *in vitro* não causou modificação e perda de atividade imediatas. Alternativamente, a interação Dicer-4-HNE se mostrou dependente de ambos, da concentração do aldeído e do tempo, com impacto sobre a atividade e a estabilidade de Dicer. Vale mencionar, que a pré-incubação de Dicer com DTT (agente redutor) anterior à exposição ao 4-HNE foi capaz de prevenir a interação Dicer-aldeído e a inibição da proteína (Figura 30.A-B), corroborando com a hipótese de que a interação direta entre Dicer-4-HNE é responsável pela inibição da proteína.

Resposta similar foi previamente descrita por nosso grupo na unidade 20S do proteassomo (117). Nesse estudo, o tratamento com 4-HNE induziu a redução da atividade do proteassomo isolado *in vitro*, a qual foi prevenida pela adição de DTT (117). Em experimentos em lisado celular, Feng et al (2004) também demonstraram que o DTT protege as proteínas envolvidas no reparo do DNA contra os efeitos inibitórios do 4-HNE (118). Sabe-se que DTT reage com compostos carbonilos α,β -insaturados, como o 4-HNE, de modo que sua adição no meio reacional deve ser capaz de sequestrar o aldeído livre, protegendo as proteínas alvos da modificação pelo aldeído assim como de seus efeitos inibitórios (118).

Adicionalmente, observamos que o 4-HNE induziu a agregação de Dicer (Figura 33), a qual pode ter sido resultado de processos como *cross-link* intermolecular e/ou desnaturação proteica induzida pelo aldeído. Independentemente do mecanismo, a agregação observada também demonstrou ser dependente da concentração de 4-HNE, visto que foi observada predominante em altas concentrações de 4-HNE (300 μ M-1mM) (Figura 33.A). Interessantemente, a adição de DTT na reação foi capaz de dissociar o agregado (Figura 33.C), um forte indicativo de que a aglomeração proteica deve ser baseada, principalmente, em pontes dissulfeto entre resíduos de cisteínas. Esses dados corroboram a ideia de que o principal processo responsável pela agregação de Dicer é a desnaturação, visto que o *cross-link* induzido por 4-HNE é primariamente baseado em resíduos de lisina (13,67).

Sabe-se que os resíduos de lisina, histidina e cisteína sofrem adição de *Michael* por 4-HNE (13). Por sua vez, somente a lisina (amina primária) pode formar base de *Schiff* com o aldeído e dar origem aos *cross-links* (13,67). Porém, visto que o 4-HNE é capaz de formar *cross-links* entre proteínas (13,67,68,119,120), não podemos excluir a possibilidade de que ambos os processos estejam ocorrendo, *cross-link* e desnaturação. Esse fenômeno é importante, uma vez que a agregação proteica tem sido associada a diversas doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento (68,121). Interessantemente, em adição à modificação covalente de proteínas, a agregação proteica induzida por 4-HNE é capaz de inibir o proteassoma de forma não-competitiva, impactando dessa forma o *turnover* das proteínas modificadas (122).

Baseados nos dados obtidos nos testes *in vitro*, nós hipotetizamos que o acúmulo de modificações por 4-HNE é responsável pela inibição e a perda de estabilidade de Dicer de forma tempo- e concentração-dependentes. Em outras palavras, o somatório de modificações por 4-HNE com o passar do tempo causa, potencialmente, mudanças conformacionais na proteína, as quais inicialmente reduzem a atividade catalítica de Dicer, culminando na perda de sua estabilidade e desnaturação. Ambos os processos (inibição e agregação) devem acontecer de modo simultâneo, mas em taxas distintas (Figura 39).

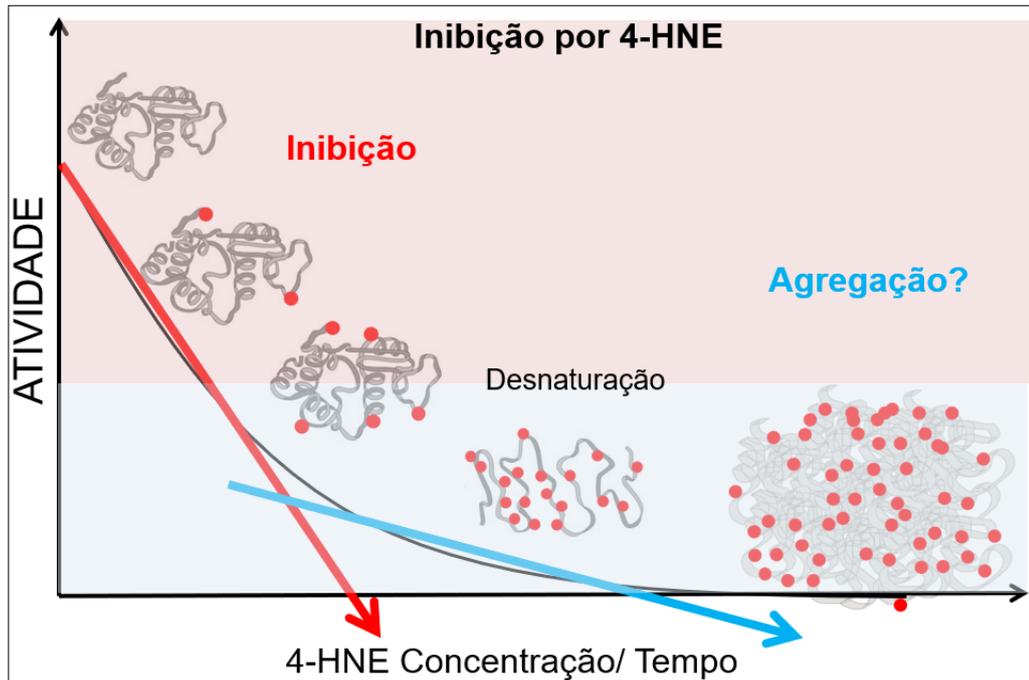


Figura 39. Hipótese. Acúmulo de modificações por 4-HNE (adutos; representados como círculos vermelhos) causa inibição de Dicer e perda de estabilidade de modo tempo- e concentração- dependentes. Ambos os processos, inibição (linha vermelha) e agregação (linha azul) devem ocorrer simultaneamente, mas em taxas distintas. Fonte própria.

De acordo com essa hipótese, a resposta de Dicer ao 4-HNE não seria resultado de apenas uma variável, mas um produto da combinação de tempo e da concentração do aldeído. Nesse contexto, esse modelo prevê que mesmo baixas concentrações de 4-HNE seriam capazes de causar inibição de Dicer e perda de estabilidade, mas em uma taxa menor. Corroborando essa ideia, em experimento preliminar (Figura 31), observamos que uma menor concentração de 4-HNE (10 μ M) modulou negativamente a atividade de Dicer após exposição da proteína ao aldeído por um maior período de tempo (4 horas). Contudo, mais testes são necessários para confirmar a reprodutibilidade desses resultados.

Tal modelo é particularmente importante quando consideramos o contexto celular, onde as células são constantemente expostas à condições diversas e variáveis, alternando entre baixas concentrações de 4-HNE (fisiológica) e eventos agudos ou sustentados de estresse. A habilidade de responder diferentemente a diversos graus e intervalos de estresse é essencial para a resposta adaptativa celular ao insulto. Diferentemente da modulação enzimática reversível da atividade proteica (ex.: via fosforilação, acetilação), ligações covalentes irreversíveis por aldeídos reativos devem

regular a resposta celular através de mecanismos distintos (123), onde o tempo e a concentração dos aldeídos devem possuir papéis centrais.

Estudos prévios já reportaram efeitos inibitórios similares do 4-HNE (114,124,125) em proteínas alvos. Em 2002, Musatov et al (2002) caracterizaram a inativação tempo- e concentração- dependente de CoC (Citocromo C Oxidase) por 4-HNE (124). Utilizando técnicas combinadas de espectrometria de massas, ESI-MS e MALDI-TOF, os autores demonstraram que a porcentagem de modificação de CoC por 4-HNE (300-500 μ M) era diretamente proporcional à concentração do aldeído. Interessantemente, o resíduo alvo primário (His-36) do aldeído estava localizado na subunidade VIII, a qual não possui papel direto no transporte de elétrons e translocação de prótons. Desse modo, o estudo propôs que a ação inibitória de 4-HNE ocorreu indiretamente, via alterações conformacionais no complexo proteico. No ano seguinte, Takeshi et al (2003) descreveram a inativação tempo-dependente de GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*) por 4-HNE (1mM) *in vitro* (125). Conjuntamente com a análise funcional, os autores identificaram as modificações dos aminoácidos alvos de 4-HNE nos primeiros 15 e 30 minutos de exposição. Similarmente, nenhum dos resíduos alvos estavam localizados no centro catalítico da enzima, mas em sua superfície. Recentemente, Smathers et al (2012) caracterizaram a modificação dose-dependente de L-FABP (*Liver fatty acid-binding protein*) por 4-HNE (5.85 μ M-117 μ M) associada com a perda de função da proteína (114).

Na mesma direção, mas em discordância com nossa primeira hipótese de que a interação entre 4-HNE e os aminoácidos pré-identificados como seus alvos (domínio RNAsellIA) poderiam modular sozinhos a atividade de Dicer, a mutação dos resíduos alvos não protegeu Dicer contra o efeito inibitório de 4-HNE (Figura 35). Em contraste, esse resultado corroborou com a ideia de que modificações cumulativas por 4-HNE modulam a resposta de Dicer ao estresse por aldeído. Nesse modelo, não existe um único “centro regulatório” responsável pelo efeito inibitório de Dicer. Ao invés disso, o somatório de modificações pelo aldeído deve promover sucessivas alterações conformacionais na proteína, as quais levam à redução da atividade catalítica de Dicer, culminando em sua perda de estabilidade e desnaturação (Figura 39). Nossos resultados *in vitro* assemelham-se àqueles observados nos estudos de Musatov et al (2002) e Takeshi et al (2003), onde o 4-HNE reduziu a atividade de seus alvos de forma tempo- e concentração-dependentes (124,125).

Juntamente com a concentração de 4-HNE e o tempo de exposição, outros fatores devem influenciar na resposta da proteína ao aldeído. Por exemplo, a susceptibilidade da proteína ao ataque pelo 4-HNE deve variar de acordo com sua composição de aminoácidos e a distribuição dos mesmos. Nessa direção, a disponibilidade de resíduos expostos de cisteína, histidina e lisina devem afetar o quão “susceptível” a proteína deve ser pelo ataque do 4-HNE, assim como o tipo de modificação (adição de *Michael* ou formação de base de *Schiff*). Tais características podem, potencialmente, afetar a taxa e a extensão da interação proteína-aldeído. Com relação às proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs, a composição de aminoácidos não demonstrou ser determinante (Figura 37.B-C), contudo, a distribuição dos mesmos na superfície das proteínas parece diferir entre àquelas analisadas (Figura 37.D-E). Como descrito por Takeshi et al (2003), modificações cumulativas em aminoácidos localizados na superfície da proteína, não necessariamente em seu sítio catalítico, podem levar à perda de função (125). Além disso, sua localização espacial pode ter papel crucial. Proteínas que são espacialmente localizadas próximas à membrana alvo de peroxidação lipídica apresentam maior probabilidade de exposição a maiores concentrações de 4-HNE do que aquelas distantes dos sítios de geração do aldeído.

Com relação às concentrações de 4-HNE adotadas nos ensaios *in vitro*, é importante mencionar que uma das dificuldades encontradas para simular o estresse por 4-HNE *in vitro* foi a fonte limitada de dados da literatura sobre as faixas de concentração do mesmo *in vivo* em condições fisiológicas e patológicas. A maioria dos estudos utilizam os níveis relativos de adutos de 4-HNE como um marcador de estresse, ao invés da concentração do aldeído livre (55), provavelmente devido às limitações metodológicas. Assume-se que a concentração de 4-HNE seja maior próximo às membranas onde é gerado, e menor em locais distantes dos sítios de produção. Contudo, muitos fatores precisam ser considerados ao estimar-se a sua concentração, como a capacidade específica de cada tecido/tipo celular de metabolizar o aldeído e a taxa de produção e difusão do mesmo. Adicionalmente, a subestimação pode ocorrer devido a fração de 4-HNE que reage prontamente com biomoléculas, reduzindo a quantidade disponível e mensurável de aldeído. Desse modo, a quantificação de 4-HNE não é tão simples, visto que mesmo uma única célula deve exibir um gradiente interno de aldeído.

Em condições de estresse oxidativo, valores entre 10 μ M- >100 μ M tem sido propostos (101,126), alcançando até 5mM próximo às membranas peroxidadas (101). Enquanto que níveis basais de 4-HNE foram estimados em sangue e soro humano em torno de 0.05-0.15 μ M (101,127). Nesse contexto, nós decidimos utilizar concentrações entre 10-300 μ M, visto que o objetivo do estudo era caracterizar o efeito da interação 4-HNE-Dicer em condições de estresse oxidativo.

A partir de nossos dados, nós só podemos especular os processos que estão por trás das respostas observadas *in vitro*. Para elucidar os eventos que estão envolvidos na resposta de Dicer ao 4-HNE, e melhor compreender a dinâmica desse processo, seria necessária a realização de análises complementares de espectrometria de massas para identificar os sítios de Dicer modificados por 4-HNE em diferentes períodos de exposição e em concentrações crescentes do aldeído. Dessa forma, seria possível a caracterização cronológica das modificações de Dicer por 4-HNE, assim como correlacioná-las com os dados de atividade.

Independentemente do mecanismo, contudo, demonstramos que o 4-HNE inibe a atividade e afeta a estabilidade de Dicer *in vitro*. No contexto celular, a perda de atividade de Dicer altera a biogênese de microRNAs e impacta processos *downstream* por eles regulados. Ainda, de acordo com os nossos dados, o tempo de exposição e a concentração de 4-HNE são fatores determinantes na ação do aldeído sobre Dicer. Enquanto que uma curta, mas intensa exposição ao 4-HNE, pode reduzir significativamente ou abolir a atividade de Dicer, longos períodos de exposição à baixas concentrações de 4-HNE podem ter pequeno ou nenhum efeito significativo na atividade da proteína. Notavelmente, diferentes modificações pós-traducionais de Dicer já foram descritas na literatura em modelos biológicos distintos, como sumoilação (106), fosforilação (42), agregação (128) e clivagem (103,129). A regulação pós-traducional de proteínas e processos biológicos representa uma importante estratégia de percepção e coordenação de respostas aos estímulos ambientais.

No contexto do estudo, sugerimos que a modificação de Dicer pelo 4-HNE pode, potencialmente, modular a atividade e estabilidade de Dicer em quadro de estresse de aldeídos. Porém, fatores adicionais devem ser levados em consideração quando estudamos modelos biológicos complexos, como as demais proteínas que atuam em

complexo com Dicer (TRBP, PACT) (95) e as enzimas que poderiam modular seu status redox (ex.: redutases) (130), a dinâmica de proteínas (*turnover*) e a concentração e distribuição de aldeídos (influenciada por ALDH2, GST-4, por exemplo). Apesar do imenso valor dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, é difícil de prever a relevância biológica dos adutos de 4-HNE-Dicer *in vivo*. Por essa razão, os experimentos realizados em modelos celulares e *in vivo* foram muito importantes, pois nos permitiram contextualizar os processos onde o fenômeno encontra-se inserido.

6.4. Limitações do estudo

Finalmente, é importante identificar e discutir as limitações presentes no estudo. Entre elas, a principal correspondeu a ausência da validação da interação entre 4-HNE-Dicer nos modelos celular e animal utilizados. Infelizmente, até o momento do depósito da dissertação, não conseguimos padronizar um protocolo de imunoprecipitação (IP) para Dicer proveniente de tecido cardíaco de rato. O protocolo se mostrou funcional apenas em lisado de células (H9C2, HEK). Possivelmente, dois fatores devem ter interferido no sucesso do método, como a afinidade do anticorpo e a quantidade de Dicer no material. Vale mencionar, contudo, que em testes realizados em células da linhagem H9C2 tratadas com Paraquat (dados não incluídos no trabalho), molécula indutora de estresse oxidativo (9), a IP de Dicer mostrou interação entre a proteína e o aldeído 4-HNE (Figura S8, Anexo 9). Porém, ainda encontram-se pendentes os experimentos de validação dessa interação nos modelos utilizados no estudo.

Outra importante limitação diz respeito ao ensaio de atividade de Dicer em lisado celular e tecidual. Apesar de utilizar como substrato um miRNA precursor (pre-miR), substrato preferencial de Dicer, o ensaio pode, potencialmente, detectar resposta inespecífica advinda de outras RNases presentes no material. De modo que o método fornece uma estimativa da atividade de Dicer. Contudo, devemos assumir que a mesma possui interferência de outras enzimas que podem clivar o substrato. Com relação a esse último ponto, durante o período de estágio no exterior, foi desenvolvido um novo substrato de RNA (Item 4.8.2; Figura 11.B), o qual se mostrou

mais específico para a clivagem de Dicer em testes preliminares com as células MEF. O método foi utilizado nos ensaios com essa linhagem, descritos no Item 5.2.2 (Figura 27.C-D). Contudo, seu emprego no modelo animal não foi testado. Planejamos utilizar esse método em experimentos futuros com novo lote de animais.

Com relação aos modelos celulares, especificamente, aos experimentos realizados nas células HEK, ficou pendente a medição inicial da fluorescência das células (EGFP/RFP), anterior ao tratamento, com o objetivo de verificar se todas partem de um mesmo valor basal. Nessa direção, seria interessante ainda a avaliação dos níveis proteicos de EGFP e RFP via *western blotting*, a fim de confirmar as alterações observadas na análise de fluorescência.

Outro questionamento relevante diz respeito ao período de análise, no caso, 2 horas após exposição ao 4-HNE. Apesar de curto, esse intervalo de tempo é suficiente para detectar modulação traducional pelos miRNAs (85). Utilizando o zebrafish, Bazzini A.A. e colaboradores (2012) observaram que o miR-430 é capaz de reduzir a tradução do mRNA alvo em apenas 2 horas, alterando sua ocupação na fração ribossomal, sem alterar os níveis globais do mRNA (85). Contudo, a análise dos níveis proteicos de EGFP (fluorescência) também deve considerar a taxa de *turnover* da proteína, a qual inclui sua síntese e degradação.

Dessa forma, propomos alternativas e experimentos adicionais, os quais serão empregados nas próximas etapas desse trabalho durante sua finalização para publicação. Infelizmente, os mesmos não foram inclusos na presente dissertação até o momento de seu depósito.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o 4-HNE interage diretamente com a RNase Dicer *in vitro*, e a formação de conjugados Dicer-4-HNE é responsável pela inibição e perda de estabilidade de Dicer de forma tempo- e concentração-dependentes. Visto que a substituição dos resíduos pré-identificados como alvos de 4-HNE não protege Dicer contra os efeitos inibitórios do aldeído, propomos que o acúmulo de modificações por 4-HNE, não a ligação do mesmo a um sítio específico, seja responsável pela sua ação. Contudo, o papel biológico da interação Dicer-4-HNE em modelos mais complexos, como o celular e o animal, ainda não está claro, em função da dificuldade de validar e isolar esse fator (alteração pós-traducional) na análise da resposta observada.

No modelo animal, demonstramos um prejuízo na função de Dicer no coração de animais com disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio, acompanhado de diminuição dos níveis da maioria dos miomiRs analisados. Como ambos os parâmetros foram melhorados no grupo tratado com Alda-1, agonista alostérico da enzima ALDH2, sugerimos a existência de associação entre os níveis de 4-HNE, atividade de Dicer e alteração na expressão de miRNAs no quadro de disfunção cardíaca. Consistente com os dados observados *in vivo*, em modelos celulares, a exposição aguda ao 4-HNE demonstrou reduzir a atividade de Dicer e afetar a via de biossíntese de miRNAs. Porém, como mencionado, não é possível relacionar a resposta observada diretamente com a interação Dicer-4-HNE em ambos os modelos.

Conjuntamente, os nossos dados sugerem que o 4-HNE modula a atividade de Dicer em quadros de estresse agudo e crônico de aldeídos. Onde a concentração de 4-HNE, a duração da exposição e o estado redox celular devem ser determinantes na resposta desencadeada pelo aldeído. Contudo, mais estudos são necessários para melhor compreender seu mecanismo de ação e papel biológico.

REFERÊNCIAS*

1. WHO, World Health Organization. GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases. 2014.
2. DATASUS, Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade [Internet]. 2018 [citado 31 de maio de 2018]. Recuperado de: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
3. Khatibzadeh S, Farzadfar F, Oliver J, Ezzati M, Moran A. Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):1186–94.
4. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 11º ed. Elsevier; 2006.
5. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, et al. Direct Evidence for Increased Hydroxyl Radicals Originating From Superoxide in the Failing Myocardium. *Circ Res.* 4 de fevereiro de 2000;86(2):152–7.
6. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* dezembro de 2011;301(6):H2181-90.
7. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* Elsevier B.V.; 2015;1852(5):826–38.
8. Gomes KMS, Campos JC, Bechara LRG, Queliconi B, Lima VM, Disatnik M-H, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovasc Res.* 1 de setembro de 2014;103(4):498–508.
9. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5):278–86.
10. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 25 de novembro de 1969;244(22):6049–55.
11. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junho de 2014;15(6):411–21.
12. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* abril de 2015;33:8–13.
13. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4–5):149–59.
14. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 20 de abril de 2001;495(1–2):12–5.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [Cited 2016 May 30]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

15. Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev.* janeiro de 2014;94(1):1–34.
16. Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonanal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta.* 7 de novembro de 1980;620(2):281–96.
17. Mak S, Lehotay DC, Yazdanpanah M, Azevedo ER, Liu PP, Newton GE. Unsaturated aldehydes including 4-OH-nonenal are elevated in patients with congestive heart failure. *J Card Fail.* junho de 2000;6(2):108–14.
18. Ebert AD, Kodo K, Liang P, Wu H, Huber BC, Riegler J, et al. Characterization of the molecular mechanisms underlying increased ischemic damage in the aldehyde dehydrogenase 2 genetic polymorphism using a human induced pluripotent stem cell model system. *Sci Transl Med.* 24 de setembro de 2014;6(255):255ra130.
19. Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 2008;321(5895):1493–5.
20. Gomes KMS, Bechara LRG, Lima VM, Ribeiro MAC, Campos JC, Dourado PM, et al. Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: benefits of Alda-1. *Int J Cardiol.* 20 de janeiro de 2015;179:129–38.
21. Belmont-Díaz JA, Yoval-Sánchez B, Calleja-Castañeda LF, Pardo Vázquez JP, Rodríguez-Zavala JS. Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS J.* 2016;283(19):3637–50.
22. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* setembro de 2010;11(9):597–610.
23. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008;2008(2):102–14.
24. Kwon SC, Nguyen TA, Choi Y-G, Jo MH, Hohng S, Kim VN, et al. Structure of Human DRISHA. *Cell.* 14 de janeiro de 2016;164(1–2):81–90.
25. Nguyen TA, Jo MH, Choi Y-G, Park J, Kwon SC, Hohng S, et al. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell.* 4 de junho de 2015;161(6):1374–87.
26. Liu Z, Wang J, Cheng H, Ke X, Sun L, Zhang QC, et al. Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell.* Elsevier Inc.; 2018;0(0):1191–1196.e12.
27. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet.* julho de 2013;14(7):447–59.
28. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ. A dicer-independent

- miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 3 de junho de 2010;465(7298):584–9.
29. Yang J-S, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*. 16 de setembro de 2011;43(6):892–903.
 30. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. agosto de 2014;15(8):509–24.
 31. Kim Y-K, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de março de 2016;113(13):E1881-9.
 32. Lau P-W, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):436–40.
 33. MacRae IJ. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* (80-). 2006;311(5758):195–8.
 34. Kandasamy SK, Fukunaga R. Phosphate-binding pocket in Dicer-2 PAZ domain for high-fidelity siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(49):14031–6.
 35. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 9 de julho de 2004;118(1):57–68.
 36. Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A, Sharp PA. In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA*. 2012;18(6):1116–22.
 37. Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer*. outubro de 2014;14(10):662–72.
 38. Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, et al. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. junho de 2013;20(6):662–70.
 39. Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*. 9 de agosto de 2012;488(7410):231–5.
 40. Swahari V, Nakamura A, Baran-Gale J, Garcia I, Crowther AJ, Sons R, et al. Essential Function of Dicer in Resolving DNA Damage in the Rapidly Dividing Cells of the Developing and Malignant Cerebellum. *Cell Rep*. 12 de janeiro de 2016;14(2):216–24.
 41. White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol*. junho de 2014;21(6):552–9.
 42. Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, et al. A Requirement for ERK-Dependent Dicer Phosphorylation in Coordinating Oocyte-to-Embryo

- Transition in *C.elegans*. *Dev Cell*. Elsevier Inc.; 2014;31(5):614–28.
43. Mukherjee K, Campos H, Kolaczkowski B. Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Mol Biol Evol*. março de 2013;30(3):627–41.
 44. Deddouche S, Matt N, Budd A, Mueller S, Kemp C, Galiana-Arnoux D, et al. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *drosophila*. *Nat Immunol*. dezembro de 2008;9(12):1425–32.
 45. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tomita K, Tachibana M, Mizuguchi H. Dicer functions as an antiviral system against human adenoviruses via cleavage of adenovirus-encoded noncoding RNA. *Sci Rep*. 2016;6:27598.
 46. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr Biol*. Elsevier Ltd; 2014;24(16):R762–76.
 47. Chen J-F, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(6):2111–6.
 48. Da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, Van Oort RJ, Pinto YM, et al. Conditional Dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008;118(15):1567–76.
 49. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, MacOtelá Y, et al. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab*. Elsevier Inc.; 2012;16(3):336–47.
 50. van den Beucken T, Koch E, Chu K, Rupaimoole R, Prickaerts P, Adriaens M, et al. Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. *Nat Commun*. 29 de outubro de 2014;5:5203.
 51. Rupaimoole R, Wu SY, Pradeep S, Ivan C, Pecot C V, Gharpure KM, et al. Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour progression. *Nat Commun*. 29 de outubro de 2014;5:5202.
 52. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. dezembro de 1978;58(6):1072–83.
 53. Shan G, Li Y, Zhang J, Li W, Szulwach KE, Duan R, et al. A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol*. agosto de 2008;26(8):933–40.
 54. Li Y, Lin L, Li Z, Ye X, Xiong K, Aryal B, et al. Iron homeostasis regulates the activity of the microRNA pathway through poly(C)-binding protein 2. *Cell Metab*. Elsevier Inc.; 2012;15(6):895–904.
 55. Zhang H, Forman HJ. Signaling by 4-hydroxy-2-nonenal: Exposure protocols, target selectivity and degradation. *Arch Biochem Biophys*. Elsevier Inc; 2017;617:145–54.

56. Barrera G, Biasi F, Fazio VM, Paradisi L, Dianzani MU. Repeated Treatments With a Low HNE Concentration Affect K562 Cell Proliferation. In: *Chemical Carcinogenesis 2*. Boston, MA: Springer; 1991. p. 337–42.
57. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
58. Davies BP, Arenz C. A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation. *Bioorganic Med Chem*. 2008;16(1):49–55.
59. Emde A, Eitan C, Liou L-L, Libby RT, Rivkin N, Magen I, et al. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J*. 2015;34(21):2633–51.
60. Rose SD, Kim DH, Amarzguioui M, Heide J, Collingwood MA, Davis ME, et al. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):4140–56.
61. MacRae IJ, Zhou K, Doudna JA. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(10):934–40.
62. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 1 de maio de 2009;25(9):1189–91.
63. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson C V., Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(2):512–7.
64. Takeshita D, Zenno S, Lee WC, Nagata K, Saigo K, Tanokura M. Homodimeric Structure and Double-stranded RNA Cleavage Activity of the C-terminal RNase III Domain of Human Dicer. *J Mol Biol*. 2007;374(1):106–20.
65. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet*. 2006;38(3):356–62.
66. Schirle NT, MacRae IJ. The crystal structure of human Argonaute2. *Science*. 2012;336(6084):1037–40.
67. Cohn JA, Tsai L, Friguet B, Szweda LI. Chemical characterization of a protein-4-hydroxy-2-nonenal cross-link: Immunochemical detection in mitochondria exposed to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(1):158–64.
68. Siegel SJ, Bieschke J, Powers ET, Kelly JW. The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry*. 2007;46(6):1503–10.
69. Guo J-M, Liu A-J, Zang P, Dong W-Z, Ying L, Wang W, et al. ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE. *Cell Res*. julho de 2013;23(7):915–30.
70. Palaniyandi SS, Qi X, Yogalingam G, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. Regulation of mitochondrial processes: A target for heart failure. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2010;7(2):1–14.

71. Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(4):238–50.
72. Liu X, Meng H, Jiang C, Yang S, Cui F, Yang P. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160920.
73. Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Correa Da Rosa J, et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 de julho de 2014;111(30):11151–6.
74. Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Hayashi H, Ochiai E, Osawa M. MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart. *Int J Cardiol.* 15 de maio de 2016;211:43–8.
75. van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell.* novembro de 2009;17(5):662–73.
76. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang R-H, Tatsuguchi M, Huang Z-P, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* setembro de 2009;119(9):2772–86.
77. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 27 de abril de 2007;316(5824):575–9.
78. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* julho de 2011;39(13):5692–703.
79. Kai ZS, Pasquinelli AE. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* janeiro de 2010;17(1):5–10.
80. Pitchiaya S, Heinicke LA, Park JI, Cameron EL, Walter NG. Resolving Subcellular miRNA Trafficking and Turnover at Single-Molecule Resolution. *Cell Rep.* 2017;19(3):630–42.
81. De N, Young L, Lau P-W, Meisner N-C, Morrissey D V, MacRae IJ. Highly complementary target RNAs promote release of guide RNAs from human Argonaute2. *Mol Cell.* 9 de maio de 2013;50(3):344–55.
82. Hansen TB, Venø MT, Jensen TI, Schaefer A, Damgaard CK, Kjems J. Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun.* 13 de maio de 2016;7:11538.
83. Spengler RM, Zhang X, Cheng C, McLendon JM, Skeie JM, Johnson FL, et al. Elucidation of transcriptome-wide microRNA binding sites in human cardiac tissues by Ago2 HITS-CLIP. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(15):7120–31.
84. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 13 de março de

- 2012;13(4):271–82.
85. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 13 de abril de 2012;336(6078):233–7.
 86. Panda AC, Martindale JL, Gorospe M. Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles. *Bio-protocol*. 5 de fevereiro de 2017;7(3).
 87. Hu W, Collier J. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell Res*. setembro de 2012;22(9):1322–4.
 88. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 11 de setembro de 2009;105(6):585–94.
 89. Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*. janeiro de 2012;3(1):9–21.
 90. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Billewicz R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. março de 2007;39(3):380–5.
 91. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 4 de agosto de 2005;436(7051):740–4.
 92. Fareh M, Yeom K-H, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun*. 9 de dezembro de 2016;7:13694.
 93. Masliah G, Maris C, König SL, Yulikov M, Aeschmann F, Malinowska AL, et al. Structural basis of siRNA recognition by TRBP double-stranded RNA binding domains. *EMBO J*. 15 de março de 2018;37(6).
 94. Ding J, Chen J, Wang Y, Kataoka M, Ma L, Zhou P, et al. Trbp regulates heart function through microRNA-mediated Sox6 repression. *Nat Genet*. julho de 2015;47(7):776–83.
 95. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian MicroRNA biogenesis. *Mol Cell*. Elsevier Inc.; 2015;57(3):397–408.
 96. Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell*. 2 de outubro de 2009;139(1):112–22.
 97. Herbert KM, Pimienta G, DeGregorio SJ, Alexandrov A, Steitz JA. Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a progrowth miRNA profile. *Cell Rep*. 27 de novembro de 2013;5(4):1070–81.
 98. Golden RJ, Chen B, Li T, Braun J, Manjunath H, Chen X, et al. An Argonaute

- phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature*. 2017;542(7640):197–202.
99. Quévillon Huberdeau M, Zeitler DM, Hauptmann J, Bruckmann A, Fressigné L, Danner J, et al. Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing in vivo. *EMBO J*. 2017;36(14):2088–106.
 100. Chaudhary P, Sharma R, Sharma A, Vatsyayan R, Yadav S, Singhal SS, et al. Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling. *Biochemistry*. 27 de julho de 2010;49(29):6263–75.
 101. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ*. 2013;20(12):1615–30.
 102. Ji Y, Dai Z, Wu G, Wu Z. 4-Hydroxy-2-nonenal induces apoptosis by activating ERK1/2 signaling and depleting intracellular glutathione in intestinal epithelial cells. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6(August):1–13.
 103. Ghodgaonkar MM, Shah RG, Kandan-Kulangara F, Affar EB, Qi HH, Wiemer E, et al. Abrogation of DNA vector-based RNAi during apoptosis in mammalian cells due to caspase-mediated cleavage and inactivation of Dicer-1. *Cell Death Differ*. 2009;16(6):858–68.
 104. Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D. Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science*. 16 de abril de 2010;328(5976):327–34.
 105. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JCB, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(16):2029–74.
 106. Gross TJ, Powers LS, Boudreau RL, Brink B, Reisetter A, Goel K, et al. A MicroRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to sumoylation of the endonuclease DICER. *J Biol Chem*. 2014;289(18):12823–34.
 107. Lai H-H, Li J-N, Wang M-Y, Huang H-Y, Croce CM, Sun H-L, et al. HIF-1 α promotes autophagic proteolysis of Dicer and enhances tumor metastasis. *J Clin Invest*. 1 de fevereiro de 2018;128(2):625–43.
 108. Ibrahim AA, Schmithals C, Kowarz E, Köberle V, Kakoschky B, Pleli T, et al. Hypoxia Causes Downregulation of Dicer in Hepatocellular Carcinoma, Which Is Required for Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res*. 15 de julho de 2017;23(14):3896–905.
 109. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol*. março de 2009;46(6):1222–8.
 110. Pizzimenti S, Ferracin M, Sabbioni S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, et al. MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Free*

- Radic Biol Med. 15 de janeiro de 2009;46(2):282–8.
111. Umberto Dianzani M. 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4–5):263–72.
 112. López-Bernardo E, Anedda A, Sánchez-Pérez P, Acosta-Iborra B, Cadenas S. 4-Hydroxynonenal induces Nrf2-mediated UCP3 upregulation in mouse cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med. Elsevier;* 2015;88(Part B):427–38.
 113. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsushashi T, et al. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* outubro de 2010;49(4):576–86.
 114. Smathers RL, Fritz KS, Galligan JJ, Shearn CT, Reigan P, Marks MJ, et al. Characterization of 4-HNE modified L-FABP reveals alterations in structural and functional dynamics. *PLoS One.* 2012;7(6):1–16.
 115. Farout L, Mary J, Vinh J, Szweda LI, Friguet B. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Arch Biochem Biophys.* 2006;453(1):133–40.
 116. Doorn JA, Hurley TD, Petersen DR. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4-hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(1):102–10.
 117. Campos JC, Queliconi BB, Dourado PMM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LRG, et al. Exercise Training Restores Cardiac Protein Quality Control in Heart Failure. *PLoS One.* 2012;7(12):1–12.
 118. Feng Z, Hu W, Tang M-S. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8598–602.
 119. Friguet B, Stadtman ER, Szweda LI. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal: Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem.* 1994;269(34):21639–43.
 120. Yuan Q, Zhu X, Sayre LM. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: Metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol.* 2007;20(1):129–39.
 121. Kaufman DM, Wu X, Scott BA, Itani OA, Van Gilst MR, Bruce JE, et al. Ageing and hypoxia cause protein aggregation in mitochondria. *Cell Death Differ. Nature Publishing Group;* 2017;24(10):1730–8.
 122. Grune T, Davies KJA. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med.* 24(4–5):195–204.
 123. Rudolph TK, Freeman BA. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal.* 29 de setembro de 2009;2(90):re7.
 124. Musatov A, Carroll CA, Liu Y-C, Henderson GI, Weintraub ST, Robinson NC. Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 25 de junho de

- 2002;41(25):8212–20.
125. Ishii T, Tatsuda E, Kumazawa S, Nakayama T, Uchida K. Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: Identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 2003;42(12):3474–80.
 126. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*. dezembro de 2004;18(15):1791–800.
 127. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81–128.
 128. Oberti D, Biasini A, Kirschmann MA, Genoud C, Stunnenberg R, Shimada Y, et al. Dicer and Hsp104 Function in a Negative Feedback Loop to Confer Robustness to Environmental Stress. *Cell Rep*. 2015;10(1):47–61.
 129. Ge X, Zhao X, Nakagawa A, Gong X, Skeen-Gaar RR, Shi Y, et al. A novel mechanism underlies caspase-dependent conversion of the dicer ribonuclease into a deoxyribonuclease during apoptosis. *Cell Res*. fevereiro de 2014;24(2):218–32.
 130. Seta A, Tabara M, Nishibori Y, Hiraguri A, Ohkama-Ohtsu N, Yokoyama T, et al. Post-translational regulation of the dicing activities of arabidopsis DICER-LIKE 3 and 4 by inorganic phosphate and the redox state. *Plant Cell Physiol*. 2017;58(3):485–95.

ANEXO 1. Análise da qualidade, pureza e integridade das amostras de RNA

Tabela S1. Concentração, razão 260/280, razão 260/230 e RIN das amostras analisadas no presente trabalho.

Amostra	Grupo	Concentração (ng/μl)	260/280	260/230	RIN*
1	DC A	945.7	2.04	2.06	8.40
3	DC V	926.2	2.05	1.97	9.00
4	DC A	1018.1	2.04	2.09	8.60
71	DC A	831.2	2.06	2.03	8.40
9	DC A	939.6	2.05	2.17	8.70
10	DC V	765.8	2.05	2.11	7.90
11	DC A	821.5	2.05	1.76	7.80
12	DC V	1088.3	2.05	2.14	7.90
13	DC V	674.9	2.03	2.15	9.30
14	DC V	857.3	2.05	2.15	8.20
15	DC V	1102.7	2.07	1.57	8.20
18	DC A	1124.1	2.08	2.03	8.60
20	Sham A	268.6	2.04	2.13	8.40
21	Sham V	1156.5	2.07	2.17	8.10
22	Sham A	1401.3	2.08	2.21	8.60
23	Sham V	1204.8	2.05	2.14	8.70
24	Sham A	1187.5	2.07	2.13	8.90
26	Sham V	1118.8	2.06	2.18	8.10
27	Sham V	1209.6	2.07	1.88	8.30
28	Sham A	1018.8	2.05	1.69	8.60
Média		983.1	2.03	1.69	7.80
Mínimo		268.6	2.08	2.18	9.30
Máximo		1401.3	2.03	1.69	7.80

RIN (*RNA Integrity Number*)

ANEXO 2. Representação gráfica dos géis de eletroforese capilar das amostras utilizadas no estudo

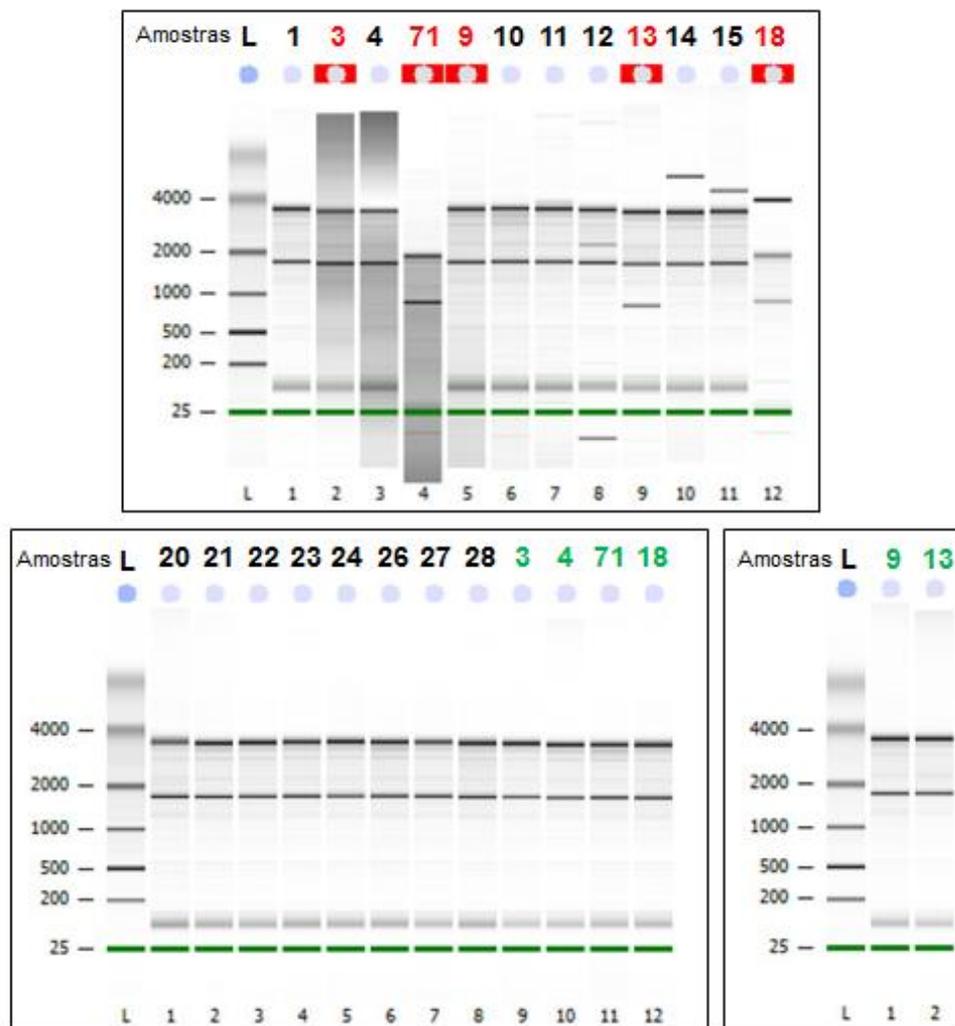


Figura S1. Representações gráficas das corridas eletroforéticas capilares realizadas pelo aparelho 2100 Bioanalyzer. As amostras marcadas em vermelho tiveram o RIN (*RNA Integrity Number*) não determinado. Dessa forma, estas tiveram suas leituras repetidas (em verde).
Fonte: Própria.

ANEXO 3. Valores de Ct do gene endógeno ACTB e miRNAs miR-150 e miR-331

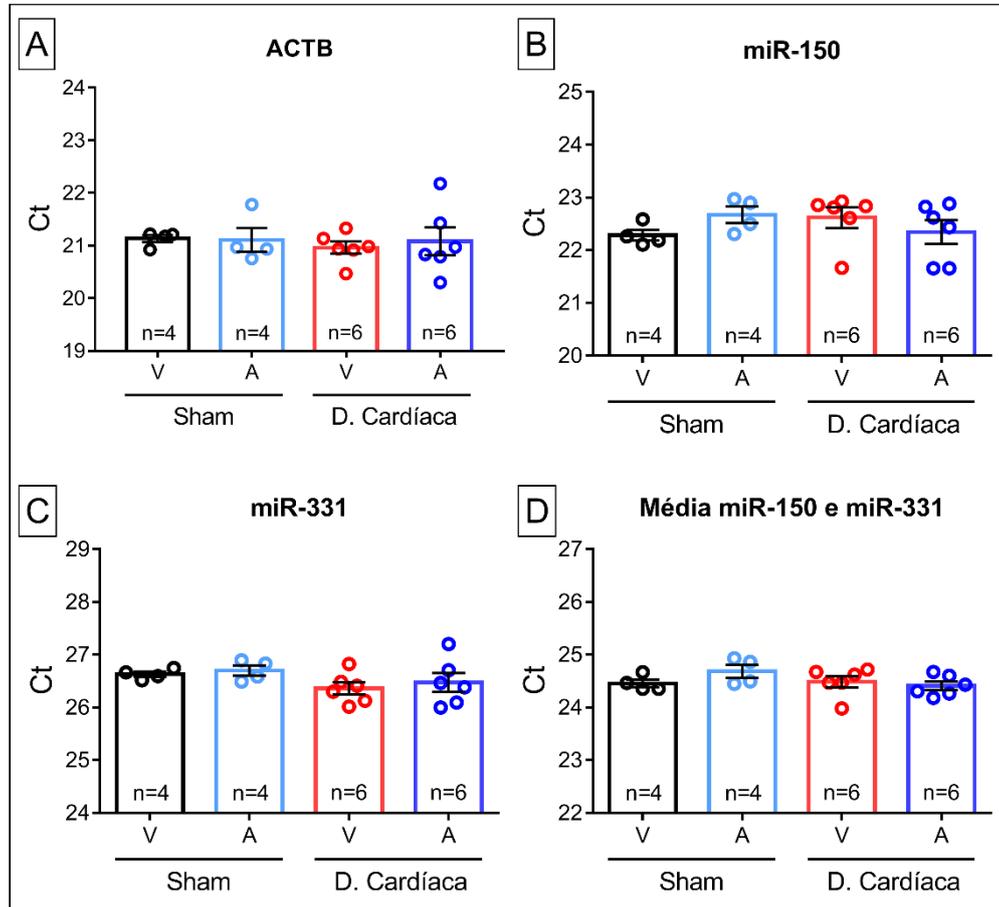


Figura S2. Valores de Ct (*Threshold Cycle*) do gene endógeno ACTB (β Actina) e miR-150 e miR-331, utilizados na análise de expressão relativa dos mRNAs (e pri-miRs) e miRNAs do estudo, respectivamente. (A) ACTB; (B) miR-150; (C) miR-331; (D) Média de miR-150 e miR-331. Onde: V, Veículo (DMSO/PEG); A, Alda-1. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média.

ANEXO 4. Validação da sonda molecular (*molecular beacon*) – duplex RNA/DNA

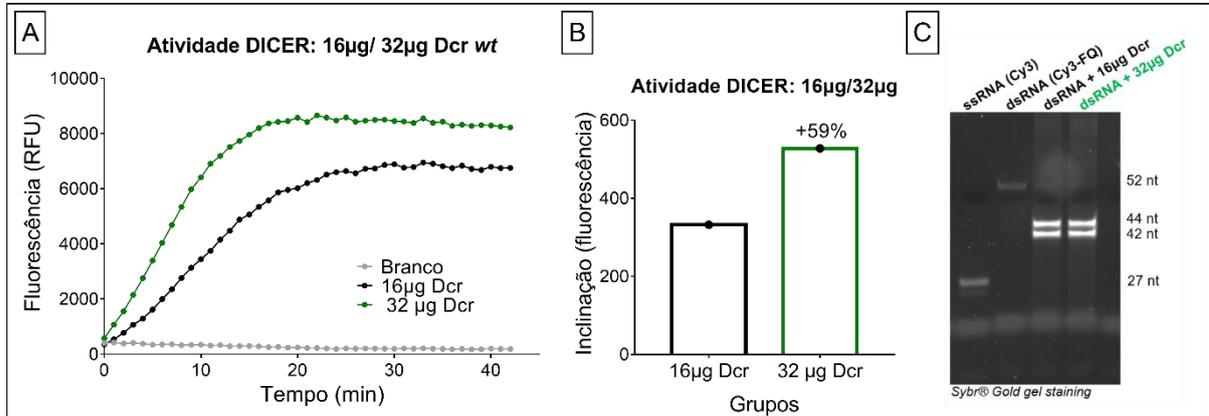


Figura S3. Ensaio de atividade de Dicer baseado em fluorescência – proteína recombinante. (A) Representação gráfica da curva de fluorescência do ensaio de atividade de Dicer, grupos: 16µg (preto) e 32µg (verde) de proteína Dicer *wt* recombinante; **(B)** Quantificação da atividade de Dicer, avaliada através do cálculo da inclinação das curvas em Figura S3A; os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; **(C)** Após o ensaio de atividade, as amostras foram analisadas em gel não desnaturante (nativo) 15% corado com *Sybr® Gold* (ácidos nucleicos); na imagem, as bandas representam os produtos de RNA, da esquerda para a direita: ssRNA (+Cy3) não clivado (27nt), dsRNA (Cy3 + FQ) não clivado (52nt), dsRNA clivado por Dicer 16µg (42/44nt), dsRNA clivado por Dicer 32µg (42/44nt).

ANEXO 5. *Primers* utilizados na introdução de mutações sítio-específicas em Dicer e imagem ilustrativa da estratégia de sua inserção no vetor pFastBac

Tabela S2. Sequências dos *primers* utilizados para introdução de mutações sítio-específicas no gene de DICER no vetor pFastBac

Primer Assembly ID	Dicer Mutant ID	Sequence (5' → 3')
pFB+hDcr N-Terminal (Fwd)	1,2,3	GACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGAAAAGCCCTGCTTTG
hDcr Mut1 N-Terminal (Rev)	1	GGTGATGGC AGCCGC TAAAAAGGAGTCGCCAAG
hDcr Mut1 C-Terminal (Fwd)	1	CGACTCCTTTTT AGCGGCT GCCATCACCACATATCTATTTTG
pFB+hDcr C-Terminal (Rev)	1,2,3	CTCGACAAGCTTGGTACCGCATGCCTCGAGTCAGCTATTGGGAACCTG
hDcr Mut2 N-Terminal (Rev)	2	AGGCGGCCCT AGCCGC ATCAGGGTAAGTGCAAATAG
hDcr Mut2 C-Terminal (Fwd)	2	TTACCCTGATGCG GCT GAGGGCCGCCTTTCATATATG
hDcr Mut3 N-Terminal (Rev)	3	TGATGGCATGCTT AAAAA AGGAGTCGCCAAGCATTTTC
hDcr Mut3 Frag.2 (Fwd)	3	CTTGCGACTCCTTTTT TTA AGCATGCCATCACCACATATC
hDcr Mut3 Frag.2 (Rev)	3	CAGATTACAGTTGCT GAACT TTTTGCTTCTCATATATGAAAGGC
hDcr Mut3 C-Terminal(Fwd)	3	GAGAAGCAAAAAG TTC AGCAACTGTAATCTGTATCG

Em negrito, sequência com inserção da mutação.

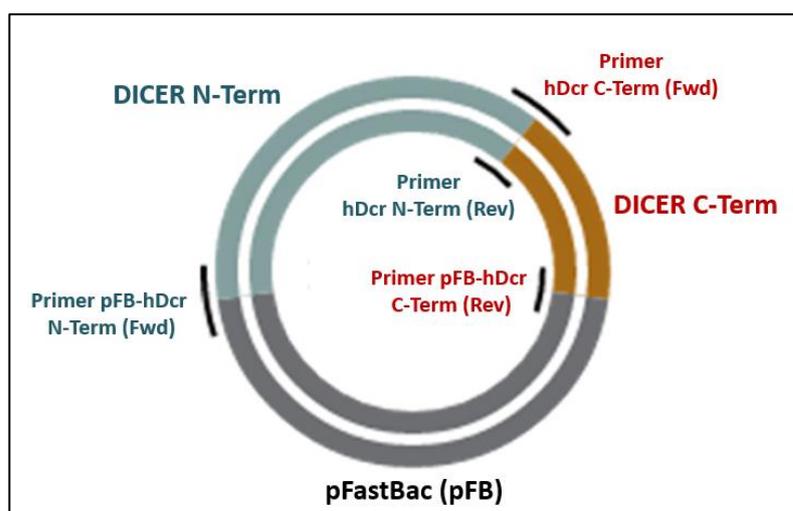


Figura S4. Imagem ilustrativa da localização dos primers no vetor pFastBac + DICER. No exemplo, o conjunto de primers dá origem a três fragmentos de DNA (incluindo o vetor), os quais são unidos pelo kit *NEBuilder® HiFi DNA Assembly*.

ANEXO 6. Dados Ecocardiográficos

Tabela S3. Dados ecocardiográficos referentes aos períodos pré e pós-tratamento dos grupos Sham Veículo, Sham Alda-1, Disfunção Cardíaca (DC) veículo e Disfunção Cardíaca (DC) Alda-1

Grupos	Sham veículo	Sham Alda-1	DC veículo	DC Alda-1	Sham veículo	Sham Alda-1	DC veículo	DC Alda-1
	(n=4)	(n=4)	(n=6)	(n=6)	(n=4)	(n=4)	(n=6)	(n=6)
Período	Pré tratamento	Pré tratamento	Pré tratamento	Pré tratamento	Pós tratamento	Pós tratamento	Pós tratamento	Pós tratamento
FE, %	40 ± 2	42 ± 3	17 ± 2*	18 ± 3*	38 ± 4	35 ± 5	17 ± 1*	19 ± 2*
DdVE, cm	0.7043±0.028	0.709±0.057	0.990±0.055*	0.971±0.038*	0.769±0.024	0.839±0.046	1.114±0.035*#	1.049±0.031*
DsVE, cm	0.424±0.023	0.413±0.052	0.829±0.063*	0.801±0.042*	0.480±0.049	0.550±0.070	0.931±0.036*	0.854±0.039*
SIVd, cm	0.099±0.006	0.108±0.006	0.089±0.006	0.123±0.006*&	0.092±0.006	0.089±0.005	0.100±0.006	0.102±0.003#
SIVs, cm	0.150±0.016	0.159±0.015	0.095±0.009*	0.127±0.011	0.153±0.009	0.134±0.018	0.110±0.010*	0.110±0.005*
PPEVd, cm	0.150±0.015	0.119±0.013	0.140±0.011	0.129±0.012	0.131±0.014	0.130±0.006	0.125±0.009	0.137±0.007
PPEVs, cm	0.235±0.013	0.251±0.011	0.229±0.019	0.241±0.016	0.232±0.018	0.217±0.013	0.195±0.014	0.237±0.014

Fração de Encurtamento (FE), Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE), Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE), Septo intraventricular na diástole (SIVd), Septo intraventricular na sístole (SIVs), Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPEVd), Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPEVs). Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA duas vias, seguida de *post hoc* de Bonferroni. Destacados em negrito, os valores com significância estatística, sendo * p≤0.05 vs Sham veículo; # p≤0.05 vs Pré-tratamento; & p≤0.05 vs DC veículo

ANEXO 7. Imagens dos géis de Western Blotting

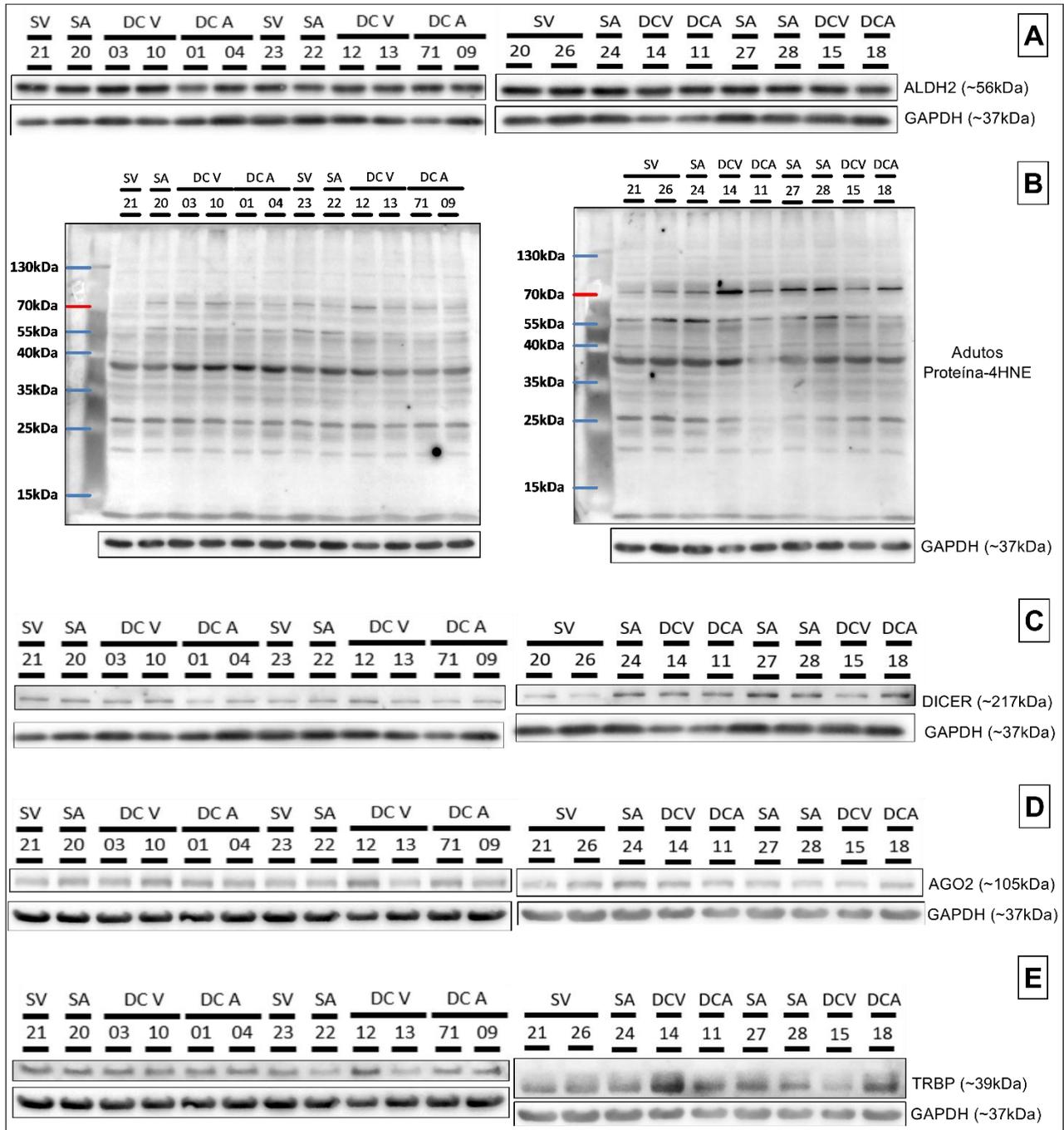


Figura S5. Blots das proteínas analisadas no tecido cardíaco dos animais Sham e Disfunção Cardíaca tratados com alda-1 ou veículo; (A) ALDH; (B) Adutos de 4-HNE-proteína; (C) DICER; (D) AGO2; (E) TRBP; Todos os blots foram normalizados por GAPDH; Grupos: SV, Sham Veículo, SA, Sham alda-1; DC V, Disfunção Cardíaca Veículo, DC A, Disfunção Cardíaca alda-1.

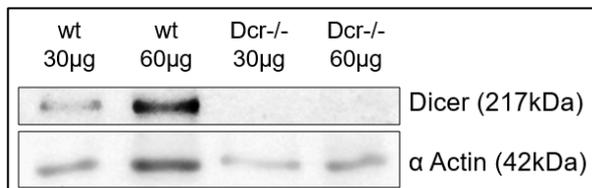
ANEXO 8. Confirmação da deleção de Dicer na linhagem MEF Dcr -/-

Figura S6. MEF Dcr-/-: Confirmação da deleção de Dicer. *Blot* representativo de Dicer nas linhagens MEF *wt* (30µg/60µg proteína) e MEF Dcr -/- (30µg/60µg proteína); os dados foram normalizados por alfa actina.

ANEXO 9. Análise da Atividade de Dicer *in vitro*

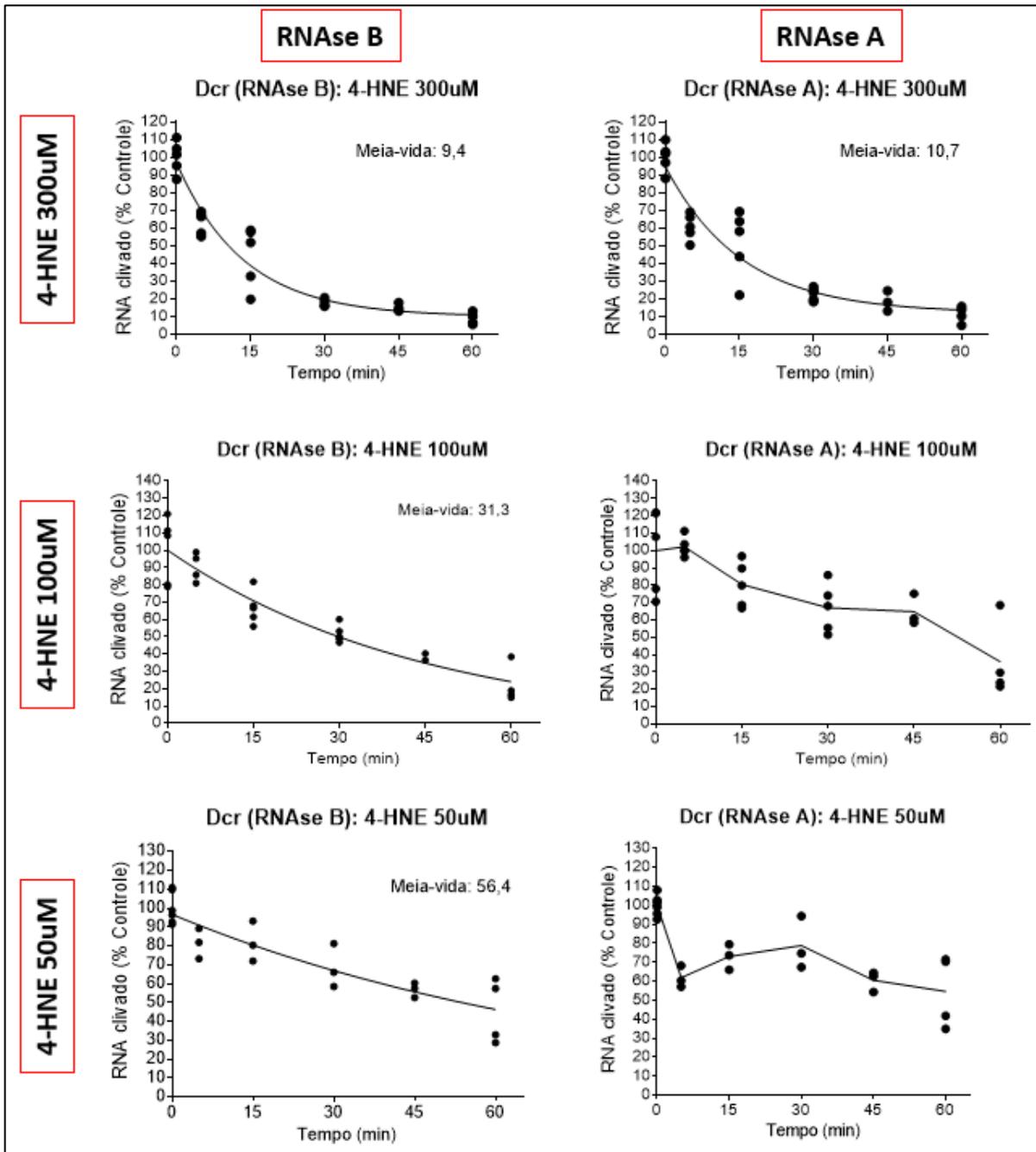


Figura S7. Efeito de 4-HNE sobre a atividade de Dicer . Quantificação da atividade de clivagem de Dicer *wt* após exposição a 50, 100 e 300 μM 4-HNE (5-60 minutos); a atividade dos domínios RNaseIIIA (direita) e RNaseIIB (esquerda) estão expostos em gráficos separados; os dados estão apresentados como porcentagem do grupo controle (100%), sendo cada amostra exibida individualmente sobre a curva de decaimento exponencial.

ANEXO 10. Imunoprecipitação de Dicer em células H9C2

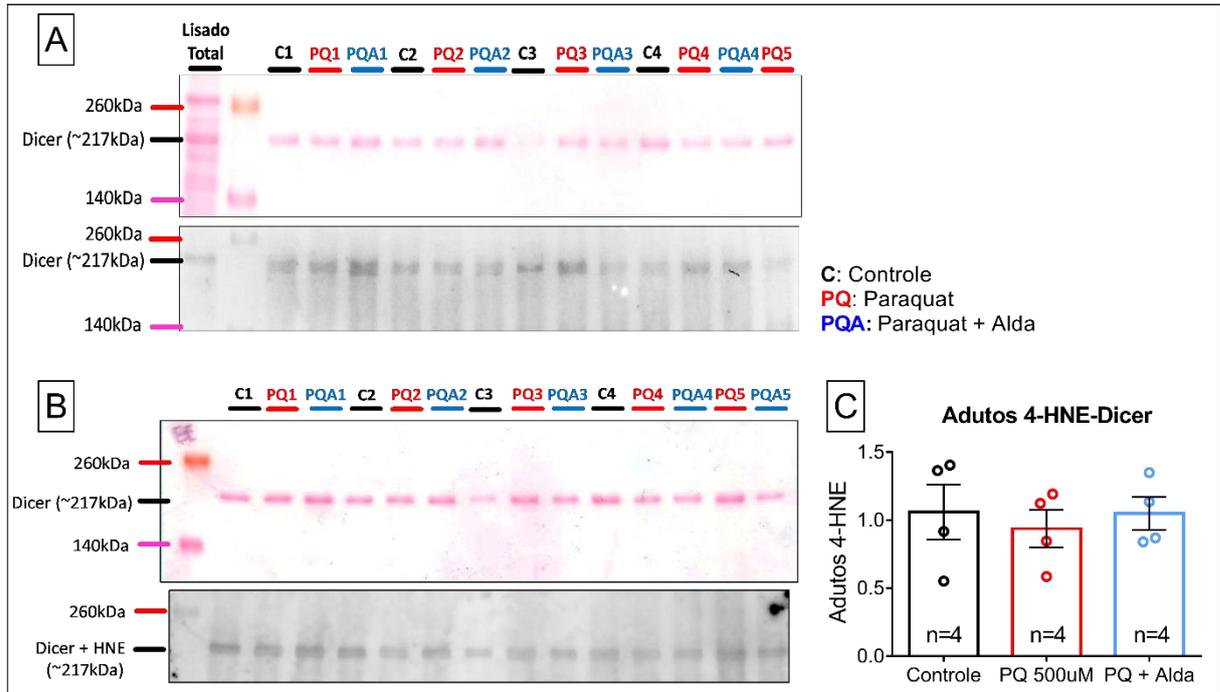


Figura S8. Imunoprecipitação de Dicer de células da linhagem H9C2. Células foram tratadas com PQ 500 μ M (PQ), PQ 500 μ M + Alda 40 μ M (PQA) e DMSO 0.25% (controle) (C) por 24h; **(A)** *Western blot* das amostras após imunoprecipitação de Dicer e lisado total (como controle), membrana corada com *ponceau* (quadro superior) e blot de Dicer (quadro inferior); **(B)** *Western blot* de amostras após imunoprecipitação de Dicer, membrana corada com *ponceau* (quadro superior) e *blot* de adutos de 4-HNE-Dicer (quadro inferior); **(C)** Representação gráfica da quantificação de adutos de 4-HNE-Dicer, normalizado pelo *ponceau* em (B); Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média; eles foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Dunnett, sendo $*p < 0.05$ vs Controle; Sendo, PQ, tratamento com Paraquat 500 μ M; PQA, tratamento com Paraquat 500 μ M + Alda 40 μ M.