

JOÃO GABRIEL RODERJAN MENDONÇA

**Avaliação comparativa da expressão de STI1 em cérebros de camundongos jovens e senis e sua relação com stress oxidativo.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA  
2007

**“...I do bymyself, but not alone...”**  
**“...fiz eu mesmo, mas não sozinho...”**  
Metallica – J.Hetfield and L. Ulrich – *Wherever I may roam*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia** da Universidade Federal do Paraná, pela excelência de trabalho organizacional e operacional. Especialmente à **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol**, pela coordenação, e fomento constante ao Curso de Pós-Graduação.

À **CAPES-PROF** por proporcionar 12 meses de bolsa de estudo, dando oportunidade para minha formação intelectual e profissional.

Ao **Departamento de Patologia Básica**, por sediar o Programa da Pós-Graduação e ao **Departamento de Biologia Celular**, por ceder: espaço físico no cultivo celular e vários importantes amigos.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia**, pelo tempo, vontade e estímulo que deram para este importante passo.

Às instituições **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP**, além do **CNPq** e **CAPES-PROF**, pelo suporte financeiro.

Ao **Prof. Dr. Silvio Marques Zanata**, pelo apoio e oportunidade de me orientar neste trabalho, especialmente pela sua amizade, companheirismo e alguns poucos conselhos.

À **minha Mãe Maria Consuelo Roderjan e minha irmã Isis Roderjan** pelo apoio e paciência nos momentos de mal-humor, dos quais foram muitos.

Aos **amigos Eduardo, Paula e Carlão** pelo apoio incondicional e suporte técnico cedidos durante todo o mestrado.

À sua esposa, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lia Sumie Nakao**, pela ajuda direta e indireta na execução deste trabalho.

Aos **amigos do Laboratório de Neurobiologia** do Departamento de Patologia Básica e do **Laboratório de Biotecnologia de Venenos e Matriz Extracelular** do Departamento de Biologia Celular, pela ajuda na execução do projeto, em especial a **Olga Meiri Chaim** pelo suporte total e paciência.

À todos os **amigos de turma do Curso de Pós-Graduação**, pela atenção, união e companheirismo durante todo o tempo em que estivemos juntos.

Ao **Prof. Dr. Ederaldo Telles**, pelo tempo, idéias, material e apoio constante para conclusão do trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	iv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. DOBRAMENTO PROTÉICO, CHAPERONAS E CO-CHAPERONAS .....	15
1.2. STI1 – PROTEÍNA DE STRESS E CO-CHAPERONA .....	27
1.3. ENVELHECIMENTO .....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. ANIMAIS.....	37
3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	37
3.2.1 <i>Avaliação em extrato total de cérebro murino</i> .....	37
3.2.2 <i>Análise de STI1 em estruturas do cérebro</i> .....	39
3.3. ANÁLISE DE STI1 EM LINHAGENS CELULARES IMORTALIZADAS EM CULTURA SOB CONDIÇÕES DE STRESS OXIDATIVO.....	40
3.4. AFERIÇÃO DA MASSA APLICADA NAS LINHAS DO GEL DE SDS-PAGE.....	41
3.5. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE STI1 NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS JOVENS E SENIS POR EMPREGO DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DE STI1 EM CAMUNDONGOS JOVENS E SENIS.....	43
4.2. ANÁLISE DE STI1 EM DIFERENTES ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	46
4.2.1 <i>Hipotálamo</i> .....	47
4.2.2 <i>Hipocampo</i> .....	50
4.2.3 <i>Córtex</i> .....	53
4.3 ANÁLISE DE STI1 EM DIFERENTES ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS HUMANAS .....	56
4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE STI1 NA LINHAGEM SHSY-5Y SUBMETIDAS AO STRESS OXIDATIVO INDUZIDO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	57

4.5. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE STI1 NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS JOVENS E SENIS.....	62
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## RESUMO

Para um melhor entendimento dos efeitos do processo de envelhecimento sobre o cérebro, o estudo da caracterização das moléculas, e sua variação com a idade é de grande interesse. Atualmente sabe-se que a proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) é ligante de STI1 (stress inducible protein 1), e este fato é responsável pela ação de neuroproteção. Neste estudo realizou-se a avaliação de STI1 em cérebros jovens e senis de camundongos BALB/c e humanos. Também foram analisadas as estruturas cerebrais isoladas: hipotálamo, hipocampo e córtex. Os camundongos jovens utilizados no experimento tinham 22 dias, e os senis 22 meses. As estruturas cerebrais humanas foram obtidas de um lactente de 2 meses de idade, com morte não relacionada ao encéfalo, e de um senhor de 71 anos com morte natural, cedidas gentilmente pelo IML de Curitiba-PR. Avaliadas as proteínas separadas em SDS-PAGE sendo, aplicadas com a mesma massa e validadas por immunoblotting com anticorpo anti- $\beta$  actina e anti-Hsp70, analisou-se a diferença de expressão de STI1 por immunoblotting, empregando anti-STI1. Os resultados obtidos demonstram que há diferença na expressão entre jovens e senis tanto em camundongos quanto em humanos. E a diferença existe também nas estruturas sendo diferentes em cada uma delas. Tendo STI1 a função de neuroproteção e neuritogênese a diminuição que ocorre pelo envelhecimento compromete o funcionamento cerebral.

## ABSTRACT

A better understanding of the molecular events of aging in the brain clearly implies the characterization of molecules down or up regulated during this complex process. Recently a cellular prion protein (PrPc) ligand – STI1 (stress inducible protein 1) was implicated with neuroprotection and neurite outgrowth, both induced by distinct signaling pathway. Here we intended to evaluate STI1 protein expression level in both young and aged brains from mouse and human donors. Protein extracts from cortex, hypothalamus and hippocampus from young (one month) and aged (20 months) BALB/c mice were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting employing an anti-STI1 antibody. Human brain structures were obtained from necropsies of an infant boy (2 months old) and a senile man (71 years old). Equal protein load was demonstrated by immunoblotting with anti-beta actin and anti-HSP-70 antibodies. The immunoblotting analyses showed that STI1 protein levels are down regulated in hypothalamus and cortex of old mice. Furthermore we observed a decreased STI1 protein expression in all analyzed regions in aged human brain, including parietal cortex, frontal cortex, hypothalamus and hippocampus. In contrast, HSP70 expression levels were modified neither in new nor in old mouse and human brains. Aging decreases STI1 protein expression. Since STI1 is involved with neuroprotection and neurite outgrowth, and both processes are pivotal during development and maintenance of central nervous system, STI1 down expression may be responsible for neuronal decline observed during aging.

## LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Co-chaperonas e suas funções.....	11
Figura1. Comparação da expressão de STI1 no extrato total de encéfalo de animais jovem e senil.....	25
Figura 2. Expressão de STI1 no hipotálamo de camundongos jovens e senis.....	29
Figura 3. Avaliação quantitativa e análise estatística hipotálamo.....	30
Figura 4. Expressão de STI1 no córtex de camundongos jovens e senis.....	36
Figura 5. Avaliação quantitativa e análise estatística córtex.....	37
Figura 6. Expressão de STI1 no hipocampo de camundongos jovens e senis.....	33
Figura 7. Avaliação quantitativa e análise estatística hipocampo.....	34
Figura 8. Análise de estruturas cerebrais humanas.....	43
Figura 9. Análise do efeito do stress oxidativo sobre neuroblastoma humano.....	44

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  -Microgramas

$\mu\text{L}$  -Microlitros

BSA - Albumina sérica bovina

EMEM – Eagle’s Minimum Essential Médium

EDTA - Etilenodiamino tetraacetato

$\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio

IgG - Imunoglobulina do tipo G

KDa - Quilodáton

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Fosfato de potássio monobásico

MEC/ ECM - Matriz extracelular

MEM - Minimum Essential Médium

mL - Mililitros

mM -Milimolar

NaCl - Cloreto de sódio

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

$\text{PrP}^{\text{C}}$  - Proteína prion celular

$\text{PrP}^{\text{Sc}}$  - Proteína prion scrapie

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SOD – Superoxido mutase

TBST - Solução salina de Tris com Tween 20

TEMED - Tetrametil etilenodiamina

TNF - Fator de necrose tumoral

Tris - Tris (hidroximetil) amino metano

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Dobramento protéico, chaperonas e co-chaperonas

A maquinaria de síntese protéica é dividida em várias etapas de igual importância, começando na transcrição dos genes codificadores, formando o RNA mensageiro, o qual tem por função transmitir a informação contida no DNA para formação das proteínas. O RNA mensageiro é traduzido pelos ribossomos presentes no citoplasma ou no retículo endoplasmático rugoso, que anela-se ao RNA transportador. Este, por sua vez, está ligado a um aminoácido específico proporcionando assim a aproximação dos aminoácidos, que através de uma variedade de proteínas sintases, formam uma cadeia de resíduos de aminoácidos (GOLDING & COX et al. 2006).

Após a tradução do RNA mensageiro, uma proteína necessita de dobramentos das cadeias polipeptídicas para a formação das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, as quais são intimamente ligadas à localização e a função da proteína sintetizada (YON, 1997).

A estrutura de uma proteína recém sintetizada pode adquirir várias conformações. Este fato é devido a estereo química da cadeia polipeptídica que pelo número de resíduos aminoácídicos, cada um pode formar até oito ângulos distintos. Isto é, a cada resíduo presente na cadeia polipeptídica, esta pode tomar até oito direções possíveis, determinados pelos tipos de ligação. Em geral toda molécula, de qualquer proteína, adota uma única conformação chamada de estado nativo, sendo que para maioria das proteínas o estado nativo é a conformação mais estável (BRANDEN & TOOZE, 1999).

Estando com a estrutura estável a molécula protéica pode ou não estar funcional. Por exemplo, proteínas que dependem de co-fatores, como ATP ou NADH, para executar suas funções, tem a conformação da estrutura modificada em presença dos co-fatores. Cessando a atuação do co-fator a proteína volta a assumir uma conformação mais estável, mas não funcional. Por

outro lado existem proteínas, como algumas do citoesqueleto, que são constitutivamente funcionais, não necessitando de co-fatores (LESK et al., 2001).

Para a estrutura protéica recém sintetizada chegar ao seu estado nativo é necessário à ação de co-fatores e outras proteínas que possibilitem o dobramento da estrutura na forma correta. Testes *in vitro* de renaturação de proteínas demonstraram que somente as informações presentes na estrutura primária – seqüência aminoacídica - não é suficiente para um dobramento correto da estrutura (ZHANG et al., 2002).

Estes dobramentos são feitos com auxílio de chaperoninas, as quais atuam na formação da conformação protéica. As chaperoninas são complexos protéicos formados pela junção de chaperonas durante o dobramento protéico, acelerando e mantendo a eficiência do processo de dobramento (HARTL & HAYER, 2002). As proteínas auxiliares chamadas de chaperonas possuem este nome devido ao termo inglês *chaperons*, que designa uma jovem senhorita que acompanha damas idosas, sendo estas assistidas quase todo tempo pelas *chaperons*.

Define-se chaperona a molécula protéica que estabiliza proteínas sem conformação ou parcialmente dobradas, e chaperonina é definida como uma proteína que auxilia no dobramento da molécula. Também é dado o nome de chaperonina o complexo protéico responsável pelo dobramento. (HARTL & HAYER, 2002). As chaperonas possuem em sua estrutura molecular regiões que permitem a ligação a proteínas, havendo uma preferência pelas proteínas sem conformação definida. Estas regiões na molécula são expostas quando as chaperonas estão ligadas a ATP, formando um bolsão hidrofóbico, onde será acoplada a proteína que deve ser dobrada. Após a hidrólise do ATP, ligado a chaperona, em ADP, o bolsão hidrofóbico fecha-se dobrando a proteína ali acoplada, que é imediatamente liberada (LESK et al., 2001).

Este processo ocorre logo após a síntese da cadeia polipeptídica pelos ribossomos no citoplasma e no retículo endoplasmático rugoso. Este fato diminui a probabilidade da conformação protéica ser dobrada erroneamente, ou haver agregação da cadeia polipeptídica (ZHANG et al. 2002).

As chaperonas são fatores de grande importância na síntese protéica acumulando várias funções, como auxílio na nova síntese protéica, rearranjo dos oligômeros protéicos e proteção contra os efeitos do stress celular. Também participam da degradação protéica via lisossomal em procaríotos e via ubiquitinação em eucariotos, como ilustra a figura 1 (PARSSEL, et al., 1994; KORNITZER & CIECHANOVER, 2000).

Originalmente identificadas como proteínas super expressas (“up-regulated”) sob condições de stress por calor, as chaperonas são descritas como proteínas de choque térmico (Hsps) e são classificadas e nomeadas pela massa molecular (MORAN 1996; MAISNIER-PATIN *et al.* 2005).

Entretanto, nem toda chaperona foi descrita por stress térmico e nem toda proteína denominada Hsp identifica uma chaperona. Dentre as chaperonas destacam-se as Hsp70 e Hsp90, as quais participam funcionalmente de vários processos intracelulares e são foco de vários estudos, sendo as mais descritas atualmente (KIM et al., 2006).

A perda da eficiência ou comprometimento do processo de dobramento de proteínas recém sintetizadas, e também proteínas que perderam sua conformação, compromete a homeostase intracelular. A quebra da homeostase intracelular deve-se ao fato das proteínas não estarem funcionais, o que compromete o evento biológico que a proteína iria atuar (HENDERSON et al. 1996).

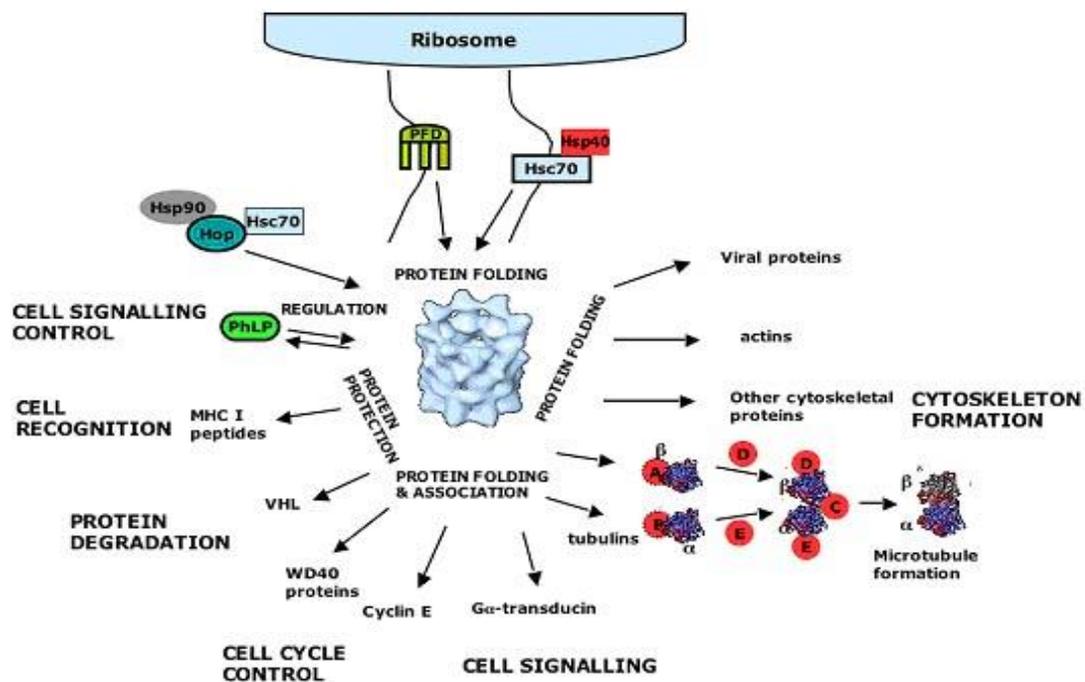
Falhas na formação da estrutura protéica causam problemas como perda de função de proteínas e/ou acúmulo, como ocorre nas patologias de Creutzfeldt Jacob, Gerstmann-Straussler-Scheinker, Kuru e doença degenerativa espongiiforme (PRUSINER, 1998). Isto se deve as características conformacionais da molécula protéica, que se alteradas inutilizam a molécula, além da possibilidade de gerar uma resistência à proteólise com conseqüente acúmulo. Este acúmulo protéico anormal refere-se como inclusões amilóides, que desencadeiam uma série danos, os quais podem levar o indivíduo à morte.

A primeira descrição de encefalopatia espongiiforme em humanos foi feita sobre uma doença degenerativa do SNC, na década de 60, que estava causando a morte de indivíduos de uma etnia *papua* na Nova Guiné. A

sintomatologia da doença era muito próxima à doença Creutzfeld-Jacob, porém a ocorrência era em mulheres jovens e crianças, pesquisando a semiologia da doença concluiu-se que a prática do ritual canibalismo de ingerir o encéfalo dos indivíduos mais velhos estava sendo a principal causa dessa desordem. (GAJDUSEK & ZIGAS, 1969).

Outra das patologias que apresentam estas características semelhantes ao kuru, a nova variante de CJD (nvCJD) e a doença priônica, a qual contaminou recentemente indivíduos humanos saudáveis, pela ingestão contínua de carne bovina de animais portadores de BSE (encefalopatia espongiforme bovina). Estes animais possuíam a proteína príon na forma alterada (Príon Scrapie – PrP<sup>Sc</sup>), a qual não possui a conformação original da proteína príon celular. Esta característica conferiu ao PrP<sup>Sc</sup> a ausência de função e resistência à proteólise via lisossomo e proteossoma (MANSON et al., 2006; FASANO et al., 2006). Devido a uma mudança de uma região de alfa- hélice para folha beta folha pregueada durante a conversão da molécula PrP<sup>C</sup> para PrP<sup>Sc</sup>, que por consequência leva a inativação de função, gerando acúmulo protéico em inclusões amilóides distribuídas no SNC. Supõe-se que a deposição do material insolúvel seja um dos fatores responsáveis pelos danos no funcionamento das áreas adjacentes no SNC, levando o paciente a ter convulsões, perda da capacidade cognitiva e finalmente perda da capacidade sensitiva, conduzindo o indivíduo a óbito após um longo tempo de sofrimento (RONGA et al., 2006). Alguns autores na literatura argumentam que a neuro degeneração observada em doenças priônicas seja consequência da perda de função da PrP<sup>C</sup> após sua conversão em PrP<sup>Sc</sup>. Neste contexto as principais funções descritas do PrP<sup>C</sup> como neuroproteção, neuritogênese e modulação do efeito da SOD (superóxido dismutase) ficariam comprometidas quando há conversão do príon celular para forma scrapie. (CASTILLA et al., 2006; LOPES et al., 2006). A enzima superóxido dismutase atua sobre radicais superóxidos produzidos durante algumas reações oxidativas. Os ânions superóxidos são altamente reativos e necessitam ser desdobrados em peróxido e água para não causarem danos as moléculas próximas formando adutos de oxigênio.

A conformação protéica é uma importante característica estrutural da molécula, conferindo função e localização. Para avaliar se há ou não problemas no dobramento protéico, é necessário um controle de qualidade das proteínas recém sintetizadas, para não haver produção e acúmulo de proteínas não funcionais. Este controle de qualidade é executado pelas chaperoninas, as quais auxiliam o dobramento, e se este estiver errado a própria chaperonina, que executa o dobramento, marca a molécula protéica com uma etiqueta de ubiquitina. Esta inserção de ubiquitina marca a molécula para ser destruída via proteossoma, não havendo assim acúmulo. Porém algumas proteínas que não estão em seu estado nativo devido a defeito no dobramento não são ubiquitinadas, isto ocorre pelo comprometimento das chaperoninas, as quais executam esta função (KORNITZER & CIECHANOVER, 2000).



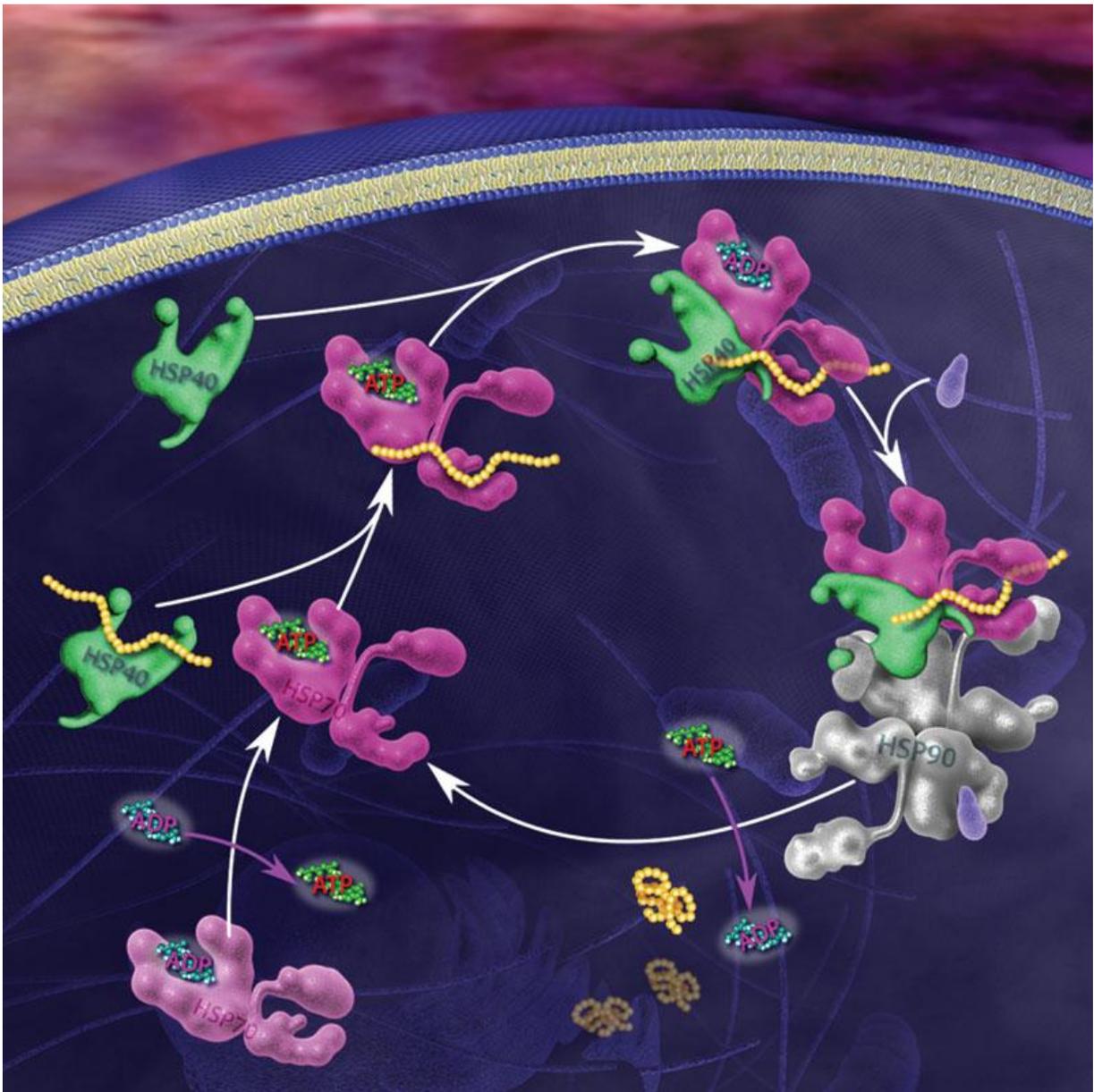
**Figura 1. Ilustração demonstrando os processos onde atuam as chaperonas, citando Hsc70 (Hsc70 sinônimo para Hsp70) e Hsp90, seus ligantes e algumas co-chaperonas como a Hop – Hsp90 organizing protein, um sinônimo para STI1. São citadas as principais funções das chaperonas e alguns processos onde elas agem. As principais funções são: dobramento de proteínas, dobramento e associação de proteínas e proteção de proteínas. Estas funções estão intimamente ligadas a eventos biológicos, como: controle da sinalização celular, reconhecimento celular (célula-célula e célula-matriz extracelular), degradação de proteínas (processamento de proteínas), controle do ciclo celular e sinalização celular. (Adaptado de [www.cnb.uam.es/.../index\\_html.jpg-fig/image](http://www.cnb.uam.es/.../index_html.jpg-fig/image))**

Para a perfeita funcionalidade do complexo chaperonina e sua estabilização são necessárias moléculas acessórias às Hsp's chamadas co-chaperonas, as quais têm por finalidade estabilizar e modular a função do complexo chaperona durante o dobramento de moléculas protéicas recém sintetizadas. Além disso elas atuam no redobramento de moléculas que perderam a conformação por mutação ou fatores do micro ambiente, como stress. (CAPLAN, 2003).

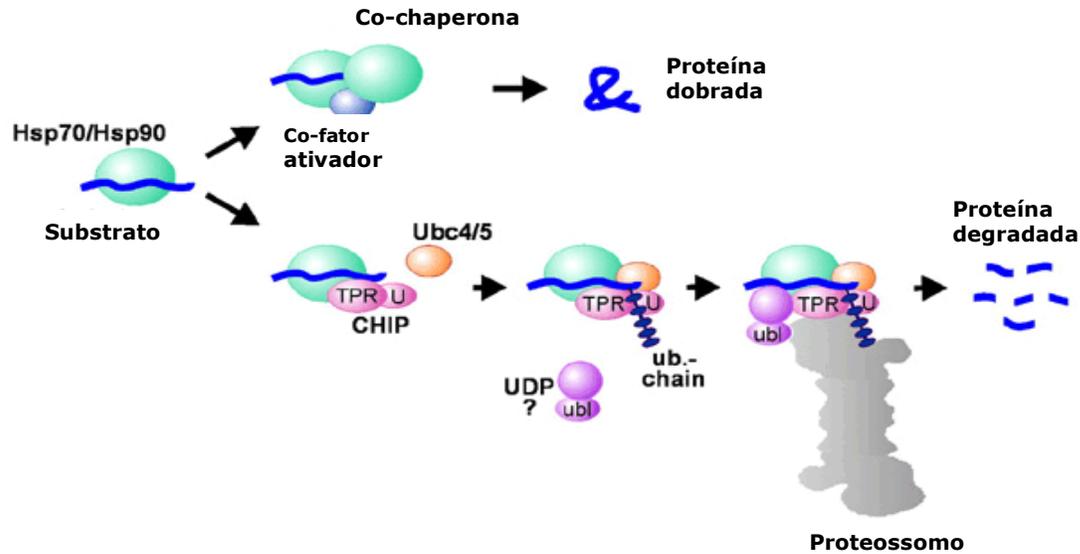
A descrição de co-chaperonas esta baseada nas moléculas que interagem com as Hsp70 e Hsp90, porém as co-chaperonas não interagem apenas com Hsp70/90 para desempenhar sua função. As co-chaperonas podem interagir com um grande número de famílias de proteínas de diferentes funções ou mesmo outras Hsp's. Além da participação das co-chaperonas no processo de dobramento de novas proteínas, pouco se sabe sobre outras possíveis funções, entretanto parecem estar relacionadas com sinalização celular e fosforilação de proteínas (PRODROMOU, et al.1999).

A função mais conhecida das co-chaperonas é impedir a agregação de cadeias polipeptídicas recém traduzidas. Tal função implica na estabilização do complexo Hsp70/Hsp90 coordenando a seqüência de dobramento correto da molécula alvo. Muitas co-chaperonas não ligam-se diretamente a sua "proteína cliente", mas apenas exercem uma ação reguladora sobre as chaperonas. Esta ação pode ser através de catalise da ligação de nucleotídeos, hidrólise ou alterações conformacionais nas Hsps (FRYDMAN, 2001).

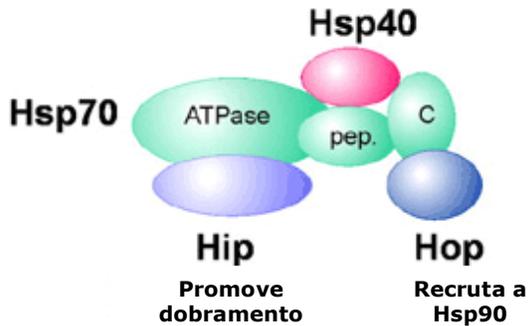
A interação das Hsp70/90 com as co-chaperonas é específica e bem coordenada com a seqüência de eventos do dobramento protéico, sendo que o complexo chaperonina tem a capacidade de reconhecer regiões específicas das cadeias polipeptícas, as quais serão moldadas, tendo assim um papel de facilitadoras do dobramento (FRYDMAN, 2001).



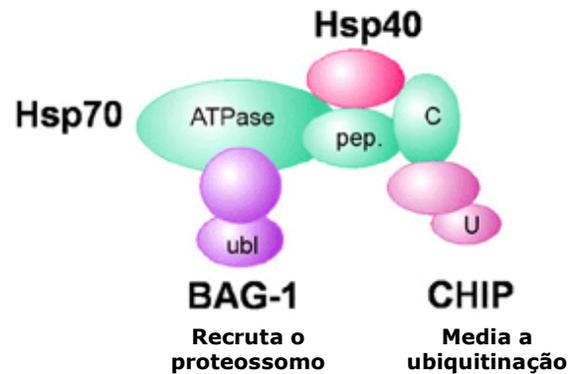
**Figura 2.** Representação da estrutura da Hsp70 sendo ativada por ADP ligando-se a seqüência aminoácídica a ser dobrada e Hsp40. Este complexo Hsp70/Hsp40/seqüência a ser dobrada liga-se com a Hsp90 que consome uma molécula de ATP para finalizar o dobramento da seqüência.



### Maquinário de dobramento



### Maquinário de degradação



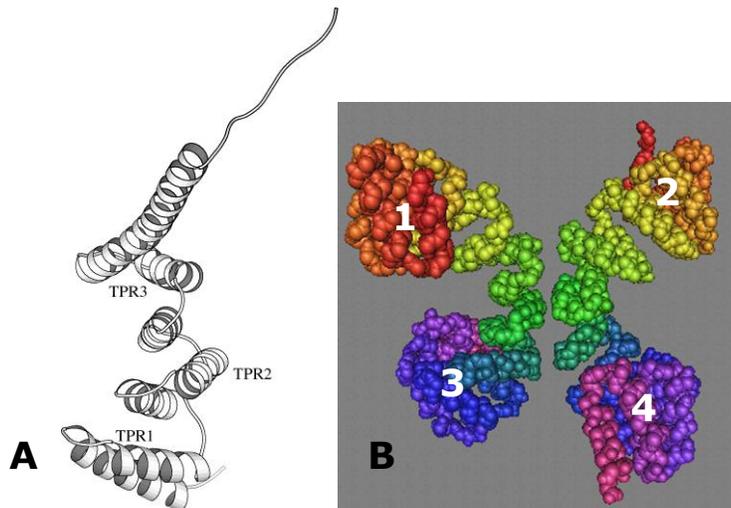
**Figura 3.** Representação do complexo Hsp70/Hsp90 e suas interações com outras chaperonas e co-chaperonas para desempenho das principais funções: **dobramento (folding) e degradação**. Nota-se que para a formação dos maquinários de dobramento e degradação há participação da Hsp40, sugerindo que as funções e atividade da Hsp70 sejam moduladas por Hsp40. No maquinário de dobramento um dos ligantes é HOP (outra sigla para STI-1), a qual recruta Hsp90.

Já foi descrito na literatura mais de 100 co-chaperonas presentes em mamíferos, as quais interagem com diversos parceiros e possuem múltiplas funções. É possível caracterizar dois grupos distintos de co-chaperonas a partir da presença dos domínios J e tetratricopeptídeo, sendo estes as regiões da molécula responsáveis pela interação com as outras proteínas (CAPLAN, 2003).

A presença de domínios J e tetratricopeptídeo em uma molécula caracteriza que, quando funcional (ligada a ATP) esta molécula possui a capacidade de ligar-se a outras proteínas. Estes domínios formam a região da molécula a qual forma a parte interna do bolsão hidrofóbico, onde ligam-se

proteínas, como demonstra a figura 2 na representação da Hsp70. Mas a principal característica destes domínios é a capacidade de preferir ligar-se a proteína sem conformação (BLATCH & LASSLE, 1999). A estrutura molecular destes domínios é a característica que promove tais interações, a figura 3 mostra um esquema de uma região TPR indicando os locais de possível ligação de proteínas.

Avaliando-se o genoma de diversos mamíferos pode se observar uma freqüência relativamente alta do domínio J em 70 famílias de proteínas, e do domínio tetratricoptídeo em mais de 100 ocorrências, sugerindo que estes domínios são essências para interação entre proteínas. Uma vez que Hsp70/90 interagem com tais domínios pode se inferir que estas chaperonas possam participar de muitos processos biológicos.(BLATCH & LASSLE, 1999).

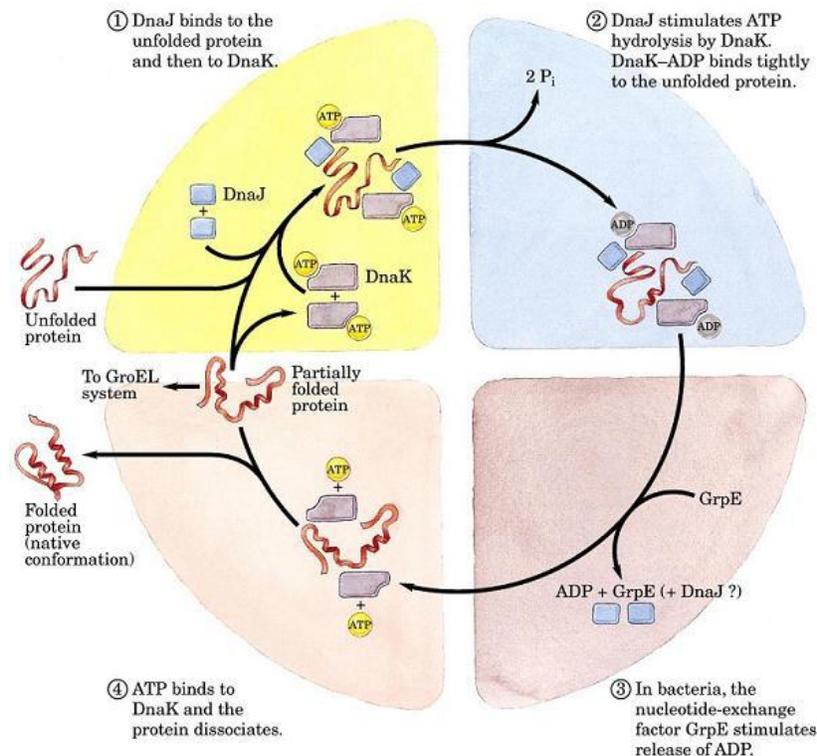


**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura do domínio tetratricopeptídeo. TPR 1, TPR 2 e TPR 3 representam os três co-peptídios em seqüência formando o tricopeptídeo (A) que será acoplado a mais três iguais formando o domínio tetratricopeptídeo (B).

A primeira caracterização de função de Hsp70 foi relatada em modelo procaríoto, em um estudo que analisava a interação entre a proteína DnaJ – proteína membro da família das Hsp40 – e ATPase chamada GrpE que catalisa a troca de aminoácidos em proteínas de *E.Coli*. (LIBERETEK, et al 1991).

Este dado foi complementado com os estudos do grupo de Hartl que mostravam a função de chaperona para DnaJ. Os dados relatados corroboravam ao modelo já aceito, o qual polipeptídeos recém sintetizados ligavam-se a DnaJ e recrutavam DnaK. A DnaK é uma proteína que estabiliza a capacidade da DnaJ

em catalisar ATP em ADP formando assim DnaK-ADP, sendo que esta última possui uma grande afinidade por peptídeos sem conformação. A demonstração desta seqüência (Figura 4) de interações foi possível pela ligação da GrpE que enfraquecia a afinidade entre a DnaK e o polipeptídeo cliente resultando na dissociação do complexo e o não dobramento do polipeptídeo (LANGER, et al 1992; FRYDMAN, et al 2001).



**Figura 5. Esquema demonstrativo da abordagem utilizada por LANGER et al. 1992 para estabelecer a seqüência de eventos do dobramento de uma proteína recém sintetizada sem conformação.(Adaptado de LANGER et al. 1992).**

Estudos sobre Hsp90 relacionados à co-chaperonas demonstraram que cada co-chaperona apresenta uma função distinta, a qual pode ser alterada por interação com tipos diferentes de chaperona (PEARL & PRODRUMOU, 2001). A presença de domínio tetratricopeptídeo (TPR), na molécula de co-chaperona, indica que esta pode ligar-se a mais de uma chaperona ao mesmo tempo.

A identificação de domínios J e TPR em diversas proteínas a partir da utilização dos bancos de dados, sugerem que proteína em questão pode atuar como uma co-chaperona. Entretanto é difícil afirmar que moléculas que possuam estes domínios sejam capazes de interagir *in vitro* e *in vivo* a chaperonas.

Além disso, as co-chaperonas podem possuir funções biológicas independentes daquelas relacionadas às chaperonas. Por exemplo, a interação entre chaperonas, principalmente Hsp70 e Hsp90 que participam de vários processos intracelulares, como transdução de sinal e ação sinérgica sob a SOD – superóxido dismutase. (FREEMAN & YAMAMOTO, 2002 ; SAKUDO et al. 2005).

A Tabela 1 (CAPLAN, 2003) descreve a função de várias co-chaperonas e sua capacidade de interação com Hsp70/90.

Co-chaperona	Interação com		Possível função relacionada
	Hsp70	Hsp90	
Hsp40	●		Catalisa hidrólise de ATP ligada a Hsp70
GrpE	●		Troca de nucleotídeos de mitocôndrias e procaríotos
Bag1	●		Fator de troca de nucleotídeos
Fes1/SIs1	●		Fator de troca de nucleotídeos
Hip	●	●	TPR estabiliza Hsp70-ADP
Hop	●	●	TPR conecta e modula Hsp70 e Hsp90
Chip	●	●	TPR, Ubox, ubiquitina ligase
Tom70	●	●	TPR, importação em de pré-proteínas mitocôndrias
FKBP52/51		●	TPR, peptidil prolil isomerasas
Cyp40		●	TPR, proteína fosfatase
PP5		●	TPR, Miosina conformação
Cns1	○	○	Envolvida com folding de proteína quinase
Cdc37	○	○	Envolvida na maturação de clientes Hsp90 em estágio avançado
p23	○	○	Estimulação da Hsp90 ATPase
Aha1/Hch1			

**Tabela 1.** Esta tabela apresenta uma série de co-chaperonas descritas na literatura relacionando suas interações com as chaperonas Hsp70/90, fato este que caracteriza uma co-chaperona. As siglas utilizadas para as co-chaperonas são as empregadas pelos autores que primeiro descreveram as proteínas. As funções citadas são as realizadas quando as co-chaperonas interagem com Hsp70 e/ou Hsp90. ● - testadas e comprovadas por ensaios *in vitro* e *in vivo*; ○ - funções hipotéticas e possíveis interações com Hsp70/90 descritas por análise de banco de dados dos motivos encontrados na análise da seqüência de DNA. *ATP*- adenosina trifosfato; *ADP* adenosina difosfato; *TPR* – repetição de domínio tetratricopeptídeo e *ATPase* – Adenosina trifosfatase.

Dentre as várias funções citadas das co-chaperonas a função reparadora de proteínas que perderam sua conformação é um indicativo da importância das chaperonas e, principalmente co-chaperonas, em processo de stress. Este processo é de causa multifatorial e cumulativo sobre proteínas.

Neste contexto, as proteínas que sofreram algum tipo de modificação estrutural tornam-se novamente clientes das chaperonas as quais redobram a molécula danificada com a finalidade de recuperar sua funcionalidade (SANGSTER *et al.* 2004).

O processo de redobrimento (re-folding) da molécula protéica pode ocorrer também quando a proteína sintetizada contém um erro inato de conformação. Estes erros podem ser uma região alterada da cadeia polipeptídica por interação de um ou mais aminoácidos de forma errada ou por falta de direcionamento correto das chaperoninas. As mudanças estruturais das proteínas mal formadas alteram suas funções, sendo este o principal fato que ativa o redobrimento (SHACTER, 2000; STADTMAN & LEVINE, 2003). Com o auxílio das chaperonas e co-chaperonas estes erros podem ser minimizados estabilizando a função protéica (ESTRUCH 2000; GASCH *et al.* 2000).

Esta capacidade de recuperação de moléculas protéicas foi mostrada por emprego de leveduras mutantes que geravam proteínas termo-sensíveis, as quais alteravam a conformação em sítios específicos da proteína, os quais modulavam sua função. Quando as leveduras eram expostas à temperatura mais elevada, algumas proteínas específicas perdiam a conformação, e as chaperoninas entravam em ação recuperando as proteínas, dando uma conformação estável a estas, minimizando assim os efeitos do stress (BOBULA *et al.* 2006).

Apesar da grande quantidade de informação existente sobre as chaperonas, pouco se sabe sobre as funções das co-chaperonas. A participação co-chaperonas em processos que envolvam ou não as chaperonas precisa ser melhor investigada.

## **1.2. STI1 – Proteína de stress e co-chaperona**

Em 1989 NICOLET e CRAIG descreveram uma proteína acessória às chaperoninas deixando evidente a necessidade da participação de uma co-chaperona que interage entre Hsp70 e Hsp 90 a fim de estabilizar o complexo. A esta co-chaperona foi dado o nome de STI1 – Stress Inducible Protein 1, visto que a mesma foi identificada como tendo expressão aumentada em condições de stress por temperatura em modelo experimental de leveduras (NICOLET e CRAIG,1989).

Tem sido descrito na literatura que as co-chaperonas atuam mediando à função de algumas chaperonas, especialmente Hsp70 e Hsp90. MORISHIMA et al. (2000) demonstraram a importância das co-chaperonas em estado de stress térmico e pela primeira vez descreveram a STI1 como co-chaperona ligando à Hsp70 e Hsp90 em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. VAN DER SPUY et al. em 2001 isolaram e expressaram a proteína STI1 em sistema heterólogo, gerando STI1 recombinante, a qual possibilitou ao grupo a caracterização da proteína. Também demonstraram a existência de STI1 na forma monomérica e dimérica, o que poderia facilitar na função de organização do complexo Hsp70/90 (VAN DER SPUY et al., 2001)

A proteína STI1 contém 3 domínios tetratricopeptídios em seqüência, sendo que cada um destes domínios são formados por 34 resíduos de aminoácidos formando duas alfa-hélice. Os domínios TPR dispostos na molécula de STI1 permitem sua ligação à cauda carboxi terminal na seqüência EEVD das Hsp70/90, as quais ligam-se ao centro dos três domínios TPR (ODUNUGA et al. 2004; SMITH, 2004).

Um estudo de bioinformática realizado por ALKEN (2005) demonstra que o gene codificador de STI1 é bem conservado entre leveduras, camundongo, rato e humano e com pequenas alterações em plantas. A conservação do gene codificador para STI1 em diversas espécies sugere que a participação de STI1 em diversos processos biológicos seja relevante. Processo de dobramento de proteínas, um dos quais participa ativamente a STI1, que acontece em todos os tipos celulares dos diversos tecidos, demonstra a ampla expressão de STI1 nas

células. Também por outro lado a atuação de STI1 nos diferentes tipos celulares e de organismos diferentes pode-se comparar os mecanismos de dobramento protéico, devido a esta semelhança. Acredita-se que a STI1 esteja presente em várias espécies pela sua participação no processo de dobramento de proteínas recém sintetizadas, processo o qual ocorre de forma similar em diversos organismos.

Estruturalmente, a STI1 e outras co-chaperonas homólogas são definidas pela presença de motivos tetratricopeptídicos repetidos um após o outro, formando um domínio de ligação a outras proteínas. (BLATCH et al., 1999). Vários trabalhos inferem uma função de simples ligante entre Hsp70 e Hsp90 durante o modelamento protéico. (ZHANG et al., 1997; SMITH et al., 1999; MORISHIMA et al., 2000; CHANG et al., 1997; CHANG et al., 2002). No entanto, existem trabalhos que demonstram a atuação de STI1 independente da Hsp90, como aqueles que descrevem STI1 como um ligante de proteína príon celular (PrPc) (ZANATA et al., 2002 ; CHIARINI et al., 2002). Nestes trabalhos a interação se STI1-PrPc estaria envolvida com neuroproteção de neurônios da retina de camundongos neonatos através da ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA).

Outra função da proteína STI1 é na navegação neural, sendo responsável por emissão de neuritos em cultura primárias de neurônios hipocámpais. Quando STI1 recombinante era adicionada ao meio de cultura, os neurônios em cultura que expressavam PrPc na membrana celular emitiam neuritos em direção a STI1, por ativação da via da proteína quinase mitogênica ERK1 (LOPES et al., 2006).

SAKUDO et al. (2005) descrevem uma possível função de STI1 associada ao PrPc na proteção celular sob condições de stress oxidativo, induzido por agentes oxidantes, particularmente geradores de radicais superóxidos. Aparentemente a STI1 atuaria como ativadora sinérgica da SOD – Superóxido dismutase - quando ligada a PrPc. O aumento da atividade da SOD diminui a concentração do ânion superóxido, pela dissociação em peróxido e água. O ânion superóxido é muito reativo e causa danos oxidativos as biomoléculas da célula.

Além disso a possibilidade de ambas as proteínas STI1 e PrPc (ZANATA et al., 2002 ; CHIARINI et al., 2002) serem fosforiladas e transmitirem

sinais anti-apoptóticos pode estar relacionada à proteção celular observada. Por outro lado o PrPc é um ligante de STI1 e reservatório intracelular de íons cobre e zinco, necessários para o funcionamento da SOD (superóxido dismutase) , e estes íons são liberados quando há interação entre STI1 e PrPc. Íons estes que atuam como co-fatores na ativação da SOD (superóxido dismutase) (SAKUDO et al., 2005).

A distribuição intracelular de STI1 é bastante discutida, visto que a proteína esta expressa aproximadamente 90% no citoplasma, 6% ligada a uma proteína de membrana e aproximadamente 4% no núcleo (KIM et al.,2005). Recentemente, STI1 foi descrita por LONGSHAW et al. (2004) movendo-se dinamicamente do citoplasma para o núcleo e atuando no complexo de transcrição (ZENG et al., 2003).

Em uma revisão apresentada por SÖTI e CSERMELY em 2002 é citada a importância das co-chaperonas, em especial a STI1, como proteínas protetoras do stress por possibilitar uma síntese *de novo* de proteínas danificadas ou consumidas durante o estado de stress. Alguns dados da literatura (SANGSTER *et al.* 2004) sugerem que diversas neuropatologias – e.g.: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, Huntington e doenças relacionadas à príon – possam origem na diminuição ou perda de função das chaperonas e co-chaperonas.

Söti e Csermely (2006) descrevem as chaperonas como chaves da rede intracelular, sendo suas funções intimamente ligadas com os principais eventos biológicos que ocorrem dentro da célula: divisão celular, transdução de sinal e síntese protéica.

Os eventos bioquímicos que ocorrem na célula são alterados quando envelhecemos devido a uma perda da capacidade da célula de responder aos estímulos do ambiente. Tal fato ocorre devido a danos exteriores à célula e/ou uma desregulação dos sinalizadores intracelulares que passam a ter uma baixa afinidade por seus alvos causando uma diminuição das atividades intracelulares e provocando uma perturbação na transmissão de outros sinais (SÖTI & CSERMEKY, 2006).

Durante o envelhecimento o corpo sofre danos causados pelo stress, apresentando efeitos cumulativos. Um dos sistemas que mais sofre os danos do stress é o sistema nervoso central, o qual perde gradativamente suas funções conforme o envelhecimento, que afetando-o de forma multifatorial, e com mecanismos ainda não completamente elucidados. Por ser formado por células que possuem uma baixa taxa de reposição, como os neurônios, os efeitos do stress sobre o SNC é de se supor serem mais agressivos, quando comparados a outros tecidos (TERMAN & BRUNK, 2004.)

### **1.3. Envelhecimento**

Uma das obsessões mais antigas do homem é vencer o envelhecimento, porém para combater-se o inimigo é necessário conhecê-lo, o que no caso do envelhecimento não é uma tarefa simples e precisa, visto que a primeira etapa de discernir o novo, o processo de envelhecimento e o do é velho pode não ter um resultado concreto quando isto é aplicado a nível molecular.

Consegue-se definir um indivíduo velho pela sua aparência e por seu tempo de permanência no ambiente, mas isto não se aplica as moléculas por que muitas vezes sua duração no ambiente é tão curta quanto sua síntese, ou tão longa e sem alterações características quando comparada às outras que impossibilita uma distinção fidedigna.

Contudo sabemos que envelhecemos e as moléculas com nós também envelhecem ao longo do tempo, perdendo suas funções, com conseqüente diminuição da manutenção da homeostase corpórea.

O processo de envelhecimento é descrito na literatura com um dano contínuo e com velocidade variável, que compromete todo um sistema em seus diversos processos, a partir de múltiplos fatores. Os danos cumulativos resultantes do stress, o qual, após um determinado tempo, gera um colapso que inviabiliza todo sistema.(CHEVION et al., 2000).

O dano gerado pelo envelhecimento as moléculas protéicas altera suas características físicas, como estrutura e localização. Este processo ocorre de forma gradativa e desordenada até levar a morte celular (KOHEN & NYSKA, 2002).

Todos os eventos que causam dano são consequência de stress. Há vários tipos de stress, tais como, térmico, oxidativo e mecânico, que geram danos específicos em moléculas alvo dentro da célula. Por exemplo, o stress por temperatura atinge uma classe de moléculas, como proteínas do dobramento, da membrana celular e algumas enzimas. Mas os efeitos dos diferentes tipos de stress podem agir em conjunto, tornando o dano ainda maior (CHEVION et al., 2000).

O stress oxidativo é um dos múltiplos fatores do envelhecimento que, por ser diretamente responsável por danos as proteínas a partir das alterações produzidas pelos radicais livres, os quais atuam de forma danosa ao equilíbrio das reações intracelulares quando em concentrações desfavoráveis.

Os radicais livres são produtos de reações bioquímicas intracelular ou extracelular em estado normal do metabolismo celular. Um exemplo de uma cadeia de reações que gera muitos radicais livres é a respiração celular, que durante a cadeia de transporte de elétrons gera vários tipos de radicais livres os quais atuam sobre outras moléculas tornando possível o transporte de elétrons. A respiração celular é fundamental para a manutenção metabólica da célula. O processo de respiração, apesar de vital possui um lado que é negativo, pois a cada ciclo do processo há geração de dano à célula por oxidação de biomoléculas a qual pode ser ou não reversível (SÁNCHEZ et al., 2002).

A oxidação por radicais livres é quase sempre irreversível, podendo a molécula alterada ter perda ou diminuição de sua função. Muitas moléculas acumuladas são externalizadas pela célula formando placas e agregados em áreas anexas as células. Exemplos largamente conhecidos de danos oxidativos incluem processos de oclusão vascular, em casos de gorduras e colesterol ou reações inflamatórias locais, como no caso do fígado patológico ou fibrose peri-hepatocítica, a qual impede as células de executar suas funções e absorver nutrientes do meio (HUMPHRIES et al., 2006).

A oxidação de proteínas é produto da reação do oxigênio em formas altamente reativas, como: oxigênio singlete, óxidos, superóxidos, hidroxilas e peróxidos, que uma vez produzidos reagem rapidamente com moléculas próximas por possuírem característica de moléculas instáveis e  $\Delta G$  favorável à reação (potencial de reação com energia suficiente para ocorrer a reação). Estas moléculas, também conhecidas como espécies reativas de oxigênio, são produtos naturais do metabolismo e podem gerar um estado de desequilíbrio da capacidade oxidativa-redutora da célula descrita na literatura como estado redox (STADTMAN & BERLETT, 1998). O estado redox da célula é um equilíbrio entre reações de oxidação e seus produtos e subprodutos gerados intra e extracelular, os quais participam dos eventos biológicos celulares como fatores moduladores da função celular .

Um desequilíbrio do estado redox da célula interfere em muitos eventos intracelulares como transdução de sinal, síntese protéica e metabolismo celular. A presença de moléculas oxidantes em grande concentração leva a célula a um estado de stress, devido às alterações causadas no ambiente intracelular como ruídos (perturbações) na transdução de sinal, instabilidade da membrana celular por oxidação de lipídeos formadores da membrana, oxidação de proteínas que pode gerar a agregação e deposição de proteínas, as quais não estando funcionais causam danos cumulativos à célula (HUMPHRIES et al., 2006).

A oxidação de moléculas no ambiente intracelular pode ocorrer em ácidos graxos de cadeia longa e carboidratos, indisponibilizando estes para o metabolismo e homeostase da célula. O produto dos lipídios oxidados mais comum é 2-hidroxi-4-noneal, mais conhecido pela sigla HNE, este age diretamente sobre as enzimas mitocondriais prejudicando a formação de moléculas de ATP e NADH e conseqüentemente diminuindo a produção de energia pela célula (FLOYD & HENSLEY, 2002). Sabendo que boa parte do SNC é revestido por lipídios, como a bainha de mielina, com função de isolamento e proteção na transmissão de sinal neural, a oxidação dos lipídios gera dano não só intracélula como extracélula causando um stress maior ao SNC e provocando alterações em sua função (ZARKOVIC, 2003).

As regiões mais oxidadas das proteínas, geralmente são os grupos funcionais da molécula e domínios com modificações pós-traducionais. A oxidação destas regiões se dá por introdução de aminoácidos precursores previamente oxidados a cadeia polipeptídica ou a reação da molécula protéica com espécies reativas de oxigênio. Alguns aminoácidos tem maior facilidade de oxidação, como aqueles que possuem anéis aromáticos como fenilalanina e a tirosina, além de alguns aminoácidos alifáticos contendo enxofre tais como a metionina ou a cisteína. As alterações causadas à molécula protéica podem ser a desnaturação, quebra da cadeia polipeptídica ou alteração conformacional da estrutura, ocasionando ligações cruzadas entre proteínas e formação de agregados protéicos. Além disso, pode causar a interação inespecífica dos grupos funcionais das proteínas com ácidos graxos poli-insaturados e alguns carboidratos (TERMAN & BRUNK, 2006).

Os adutos de proteínas (proteínas com conformação alteradas por oxidação) podem causar a alteração na conformação da molécula protéica gerando moléculas antigênicas, que se reconhecidas pelo sistema imune levam a uma reação auto-imune com concomitante perda celular. Alguns tecidos podem ser necrosados por ação do sistema imune quando há concentração de proteínas imunogênicas nestes tecidos. Acredita-se que algumas patologias tenham origem na alteração de proteínas com formação de imunógenos do próprio paciente, causando uma reação imune significativa sobre as células que expressam estes antígenos e uma ação disseminada sobre os tecidos (SHACTER, 2001). Um exemplo de patologia que pode ser iniciada por este mecanismo é a esclerose múltipla. Esta neuropatologia que é diagnosticada pela presença de anticorpos contra a bainha de mielina, gera episódios de convulsão e déficits neurológicos atribuídos a desmielinização da substância branca do SNC, como resultado de auto-imunidade (GILGUN-SHERKI et al., 2004).

A oxidação de proteínas e formação de amilóides nas células ocorre como um círculo vicioso, visto que o stress oxidativo gera alteração nas proteínas e as proteínas alteradas geram stress oxidativo quando estas não são degradadas via proteossoma ou lisossomo formando precipitados ou placas amilóides intracelulares, como no caso do peptídeo  $\beta$ -amilóide presente em células do SNC.

Este peptídeo é gerado por oxidação de um metionina na posição 35 da cadeia peptídica da proteína  $\beta$ -amilóide, alterando a porção C-terminal pela perda de conformação protéica. Esta alteração gera toxicidade a molécula e deposição desta em neurônios (BUTTERFIELD, 2002).

Outra alteração prejudicial à célula é a oxidação ou nitrificação de proteínas envolvidas na homeostase do cálcio intracelular, principalmente em proteínas como a calmodulina e a Ca-ATPase, levando a célula a uma disfunção nos processos de produção de energia e metabolização, devido o cálcio ser co-fator de muitas reações intracelulares. Este desequilíbrio também gera um stress funcional que induzem as células a apoptose (SQUIER, 2001).

Durante o processo de envelhecimento o stress oxidativo ocorre em todo o organismo de forma disseminada e pouco controlada, visto que o dano causado muitas vezes não pode ser reparado totalmente, sendo desta forma cumulativa e sinérgica a outros processos, que envolvidos no envelhecimento provocam danos tais que aceleram a perda de funções vitais. Contudo o stress oxidativo pode ser modulado para causar mínimos danos ao organismo. Uma redução dos efeitos oxidativos sobre células em cultivo demonstrou que a viabilidade e o tempo de vida das células aumentaram significativamente por meio de adição de anti-oxidantes em meio de cultura das células (STADTMAN & LEVINE, 2003).

Uma das vias de modulação do stress oxidativo é a remoção de proteínas oxidadas via proteossomo específico. O proteossomo 20S reconhece proteínas com alterações na conformação e proteínas oxidadas, que na maioria das vezes estão ubiquitinadas. A ubiquitinação de proteínas é um processo comum dentro da célula, que tem por finalidade de remover proteínas que se acumulam e reaproveitar proteínas que perderam a função devido a alterações conformacionais. Este processo envolve gasto de energia, o que seria desfavorável à célula, porém o resultado final do processo induz uma melhor transdução de sinal intracelular e evita possíveis geradores intracelulares de radicais oxidativos (SQUIER, 2006).

Dentro do contexto de envelhecimento relacionado ao stress, JIANG et al., 2000 descrevem uma análise comparativa entre camundongos jovens e

senis para vários RNAs mensageiros de proteínas encontrados no cérebro, sendo dividido em três principais regiões: Hipotálamo, Hipocampo e Córtex. Os resultados indicaram uma menor expressão de RNA mensageiro para *ST11* em animais adultos envelhecidos, quando comparados a animais jovens dentre outras proteínas, nas regiões de Hipotálamo e Córtex.

Perante esta informação, foi sugerida a hipótese de que um decréscimo na transcrição do RNA mensageiro da *ST11* deveria levar a diminuição na síntese desta proteína. A diminuição na concentração de *ST11*, explicaria parte da perda de algumas das funções do cérebro durante o envelhecimento, à luz das funções desempenhadas pela *ST11* nos processos biológicos, tais como neuroproteção (ZANATA et al., 2002), neuritogênese (LOPES et al., 2006) e co-chaperona (NICOLET et al., 1994).

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo investigar a diferença da expressão protéica de STI1 no sistema nervoso central de camundongos jovens e senis, procurando correlacionar tal diferença sob uma perspectiva oxidativa.

### Objetivos Específicos

- Analisar comparativamente a expressão de STI1 presente em extratos de hipotálamo, hipocampo e córtex entre camundongos jovens e velhos e em duas amostras de cérebro humano.
- Avaliar comparativamente a quantidade de STI1 em linhagens celulares imortalizadas submetido a stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.
- Comparar a distribuição de STI1 pelas estruturas do cérebro de camundongos jovens e senis.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Para análise da proteína STI1 utilizou-se 16 camundongos da linhagem Balb-C cedidos pelo biotério da UFPR sendo 8 animais velhos, com aproximadamente 23 meses de idade pesando aproximadamente 25g e 8 animais novos com 21 dias de idade pesando aproximadamente 16g.

A manipulação e ortotanásia dos animais seguiu as orientações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPR e a nômima veterinária vigente, sob o protocolo nº 113/2005

### **3.2. Procedimento Experimental**

#### **3.2.1 Avaliação em extrato total de cérebro murino**

Para avaliação inicial de STI1 foi realizada uma quantificação de STI1 em extrato total de cérebro de um camundongo velho e um camundongo novo, seguindo os seguintes passos (MARTINS et al., 1997): remoção e maceração do cérebro murino em tampão de lise (1% de Triton X100® e 1% de NP40® como detergentes, 10mM de Phenantrolina, 50mM de PMSF, 200mM de EDTA, 50mM de NEM, 200mM de Iodoacetamida e 100mM de Benzamidina, como inibidores de protease, diluídos em tampão PBS), durante 15 minutos em aparato de Potter, sendo posteriormente centrifugado a 13000g por 15 minutos à 4°C com a finalidade de remoção de debris, em seguida recolhido e aliqotado o sobrenadante para a quantificação da concentração de proteína total pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976) em placa de 96 poços com reagente Bradford Biorad®, espectrofotometricamente lido em 595nm. Seguindo com posterior separação de 50, 100, 150ug de proteína total em SDS-PAGE com gel de acrilamida 10% (LAEMMLI,1970) em aparato Mini-PROTEAN 3, Biorad®.

Terminada a separação eletroforética procedeu-se a técnica de Western Blotting (TOWBIN et al., 1979). Foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL Amersham Pharmacia®) a fim de fixar as proteínas na membrana e poder identificar a proteína de interesse – STI1 – por reconhecimento com anticorpos específicos contra STI1.

Anticorpos anti-rSTI-1 foram obtidos a partir da imunização de coelhos neozelandeses com His6-rSTI-1 purificada em coluna de NTA-Ni-Agarose. Estes anticorpos foram fornecidos na forma de imunoglobulinas purificadas pelo fornecedor Bethyl Co. (USA).

A transferência foi realizada em aparato Mini-PROTEAN 3, Biorad® pela técnica de eletrotransferência submersa em tampão de transferência (39mM de glicina (Merck), 48mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol) a uma baixa temperatura por 1 hora com voltagem constante de 100V.

Obtida a membrana de nitrocelulose está foi lavada com água destilada por dois minutos, com a finalidade de remover o excesso de SDS do tampão de transferência, logo depois corada com corante Ponceau (Sigma®) em solução de 1% de ácido acético (Sigma®) para certificação da fixação das proteínas na membrana de nitrocelulose. Então a membrana foi lavada com tampão TBST 0,05% (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) por 15 minutos e incubada com uma solução de bloqueio contendo leite desnatado à 5%(Molico, Nestlé®) em tampão TBST 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente.

Logo após o bloqueio da membrana, esta foi incubada com uma solução de anticorpo primário anti-STI1(Bethyl Co.), em leite desnatado a 5% em TBST 0,05% (1:2000), sendo incubada por 16 horas a temperatura de 4°C sob agitação. Em seguida foi lavada a membrana com tampão TBST 0,05% durante 10 minutos, repetiu-se a lavagem por 3 vezes. Então a membrana foi incubada com uma solução de anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:2000)(Peroxidase Goat Anti-Rabbit Ig Pharmigen®) por 1 hora a temperatura ambiente.

Após uma nova série de lavagens, revelaram-se as membranas com substrato adequado para reação quimioluminescente (Amersham-Pharmacia®). Um filme radiográfico (Kodak®) foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequado.

### **3.2.2. Análise de STI1 em estruturas do cérebro**

Para a análise das estruturas isoladas foi empregado uma lupa de dissecação e material cirúrgico apropriado (MARTINS et al., 1997).

Após a obtenção dos encéfalos procedeu-se dessecação das estruturas em banho de gelo para evitar a proteólise inespecífica que ocorre nos tecidos pós morte. Para separação das estruturas cerebrais seguiu-se pela remoção do cérebro da caixa craniana, este foi colocado sobre uma placa de Petry em banho de gelo, onde se removeu o cerebelo por separação do plano de dessecação córtex-cerebelo; colocado o Hipotálamo para cima, este foi removido com auxílio de uma espátula pontiaguda; seguiu-se a dessecação do córtex com micro pinça passando-a no plano de dessecação entre hipocampo e córtex logo abaixo e a direita da separação dos hemisférios cerebrais. Logo após foi realizado o processamento do tecido para extrato de estruturas, com emprego de tampão lisante acrescido de inibidores de proteases (1% de Triton X100® e 1% de NP40® como detergentes, 10mM de Phenantrolina, 50mM de PMSF, 200mM de EDTA, 50mM de NEM, 200mM de Iodoacetamida e 100mM de Benzamidina, como inibidores de protease, diluídos em tampão PBS).

Separadas as estruturas cada uma foi macerada separadamente em tampão de lise para obtenção do extrato, conforme o procedimento já descrito no experimento anterior. As avaliações feitas por Western Blotting seguiram o mesmo método já descrito, porém a concentração de proteína aplicada por poço no gel foi de 75ug.

Os extratos obtidos foram estocados por 24 horas em freezer -20°C para a conservação e remoção de possíveis precipitados protéicos formados durante o processamento do tecido.

Para separação eletroforética foi utilizado aparato Mini-PROTEAN 3, Biorad® e um gel de poli-acrilamida a 10% de concentração.

As estruturas cerebrais humanas citadas são de doação do Instituto Médico Legal de Curitiba no Serviço de Verificação de Óbito. Estas estruturas vieram de encéfalos retirados com propósito de autópsia e seriam dispensados como devido. Sob supervisão do patologista de plantão as estruturas foram

removidas de dois encéfalos de cadáveres com morte natural, sendo um de aproximadamente 2 meses de idade e outro com 71 anos de idade.

As amostras foram gentilmente cedidas sob condições legais para enriquecer os dados do estudo.

Conhecendo a molécula de STI1 com peso molecular de 66KDa e seguindo as recomendações do fabricante do aparato de eletroforese, foi empregado um marcador de massa molecular de proteínas. Realizou-se a separação por massa molecular das proteínas presentes no extrato das estruturas. Logo após a resolução protéica foi transferido e fixado em nitrocelulose, o que permitiu a utilização de anticorpos para reconhecimento da proteína.

O anticorpo anti-STI1 reconhece a proteína na diluição de 1:5000, o que demonstra a especificidade do anticorpo.

Para revelação da reação de anti-STI1 empregou-se anti-IgG de coelho marcada acoplada a peroxidase. O substrato da peroxidase utilizado foi o luminol que oferece uma resolução de qualidade na revelação.

### ***3.3. Análise de STI1 em linhagens celulares imortalizadas em cultura sob condições de stress oxidativo***

Para estabelecer uma relação entre a proteína STI1 e stress oxidativo, principal fator do envelhecimento, foram realizados experimentos com células de neurabloma humano (SH-SY5Y – ATCC n°CRL-2266) .

Para o cultivo de células SH-SY5Y foram seguidas as orientações da manipulação recomendadas pela ATCC – American Type Culture Collection: meio 50 % EMEM e 50% HAM-F12 suplementado com 10mM de piruvato, 10mM de NON (meio de cultura neuro basal), 10mM de Glutamina e 10% em volume de Soro Bovino Fetal para expansão em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, com umidade acima de 85% e temperatura 37,5°C. Para o subcultivo utilização de 0,25% (p/v) de tripsina em solução de PBS-EDTA (PBS com 0,53mM de EDTA).

As células foram subcultivadas em placas de 6 poços (TPP® GmbH, Switzzland) em número de  $2 \cdot 10^5$  células/poço e mantidas por 24 horas até a troca de meio. Após 48 horas de cultivo, as células estavam em um número aproximado de  $4 \cdot 10^5$  quando se adicionou meio de stress: peróxido de hidrogênio nas concentrações de 1; 10; 25; 50; 100  $\mu\text{M}$  ao meio MEM sem suplementos às placas testes e mantendo duas placas controles, apenas com meio MEM sem suplementos.

Aos controles foi adicionado o mesmo volume de células e meio de cultura sem agente oxidante.

As células ficaram em cultivo com os devidos meios de recuperação por 24 horas. Terminado, as células foram lavadas com PBS por três vezes e em seguida adicionou-se 400ul de tampão de lise (PBS acrescido de 1% e NP-40 e inibidores de protease Complete - Roche®), o qual foi mantido por 15 minutos. Com auxílio de um *cell-scrapier*, as células foram removidas das placas e lisadas. O lisado celular foi transferido para um eppendorf de 1,5ml e centrifugado a 13000g por 15 minutos a 4°C. Então procedeu-se a dosagem de proteína total por Bradford, com reagente Bradford Biorad® (BRADFORD, 1976).

A análise comparativa dos lisados celulares pelo método de Western Blotting foi realizada do mesmo modo como já citado no item *Análise de ST11 em estruturas do cérebro*.

### **3.4. Aferição da massa aplicada nas linhas do gel de SDS-PAGE**

Para confirmação da aplicação da mesma massa em todas as linhas do gel, com intuito de não haver diferenças na concentração de ST11 devido a aplicação de diferentes massas, utilizou-se a marcação de proteínas que não estivessem alteradas, pelo envelhecimento ou por stress oxidativo. As proteínas escolhidas foram a  $\beta$ -actina, proteína do citoesqueleto, como proteína “house keeping”; Hsp70 que não se altera durante o envelhecimento e proteína príon celular. Estas duas últimas proteínas foram testadas, devido a sua interação direta com ST11, porém não estavam alteradas servindo de proteínas “house keeping”. U

Neste experimento de aferição empregou-se o anticorpo monoclonal anti- $\beta$  Actina marca Sigma®, anticorpo monoclonal anti-Hsp70 marca Sigma® e anti-PrPc, obtido no laboratório de neurobiologia por imunização de camundongos knockout para PrPc com PrPc recombinante. Estes anticorpos foram aplicados sobre as membranas já reveladas contra ST11.

### ***3.5. Comparação da distribuição de ST11 nas estruturas cerebrais de camundongos jovens e senis por emprego de imunohistoquímica***

A técnica de imunohistoquímica empregada foi a marcação de ST11 em cortes anatômicos de cérebros de camundongos jovens e senis nos planos sagital e coronal. Para execução utilizou-se 3 camundongos jovens e 3 senis, dos quais retirou-se o encéfalo e separou-se o cérebro. Este foi congelado em criostato CM3050 e incluído em OTC (meio de inclusão para cortes congelados) e cortados a 8 $\mu$ m de espessura, tanto no corte sagital quanto no coronal. Este cortes foram montados sobre lâminas vidro sinalizadas com Organo Silano Merck® e bloqueadas com solução de bloqueio do kit Envision Pro - DAKO® conforme indicações do fabricante, então foram lavadas com PBS a 10°C e postas em câmara úmida. Então as lâminas foram cobertas com 500  $\mu$ l de solução de PBS-BSA com anti-ST11 (Bethyl Co.) na proporção 1:2000 e deixados por 2 horas. Logo após as lâminas foram lavadas com PBS-BSA a 10°C e incubadas com a solução do polímero do kit, para revelação da imunohistoquímica, por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS-BSA a 10°C e os cortes foram cobertos com o substrato do kit para revelação por 3 minutos. As lâminas então foram lavadas com PBS a temperatura ambiente e montadas com lamínulas e Enthelan - Merck®. Após a secagem do Enthelan as lâminas foram observadas em fotomicroscópio Olympus FD520, no aumento de 4x com objetivas plano cromáticas e luz difusa, o qual permitiu a captura de imagens que deram origem ao resultado.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DE STI1 EM CAMUNDONGOS JOVENS E SENIS

Procurou-se neste trabalho fazer uma abordagem comparativa da expressão protéica de STI1 no SNC de camundongos. Tal iniciativa foi baseada em resultados da literatura que apontam para uma diminuição de quatro vezes na quantidade relativa de RNA mensageiro para esta proteína no hipotálamo de camundongos senis quando comparados a jovens (JIANG et al.,2005).

Inicialmente foi utilizado o extrato total do encéfalo de animais jovens (máximo 24 dias) e senis (entre 22 e 25 meses de idade). Nestes experimentos procurou-se estabelecer a melhor massa total de proteína do extrato que poderia ser aplicada no gel de poliacrilamida visando resultados consistentes e confiáveis. Esta padronização é necessária uma vez que excesso de proteína poderia mascarar pequenas diferenças de expressão como consequência da saturação da reação quimioluminescente. Outro parâmetro importante é a concentração dos anticorpos empregados, os quais não devem ser limitantes, porém não devem estar demasiadamente concentrados, pois neste último caso poderão gerar grande sinal de fundo.

Apesar de ter sido descrita uma diferença de RNA mensageiro em uma estrutura específica do cérebro, o hipotálamo (JIANG et al.,2005), foi utilizado o encéfalo total nestes primeiros experimentos apenas como varredura inicial das amostras e reagentes que seriam empregados nesta dissertação.

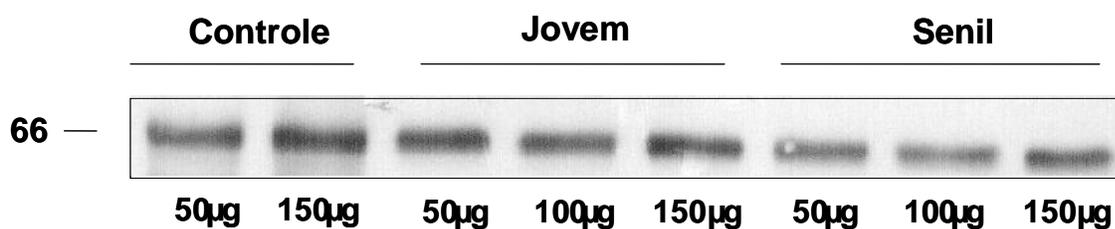
Para os camundongos jovens foi decidida a idade de  $22 \pm 2$  dias, devido a critérios de formação do encéfalo (JIANG et al., 2005). Já para os camundongos senis optou-se por utilizar animais com mais de 22 meses devido a média etária de estes animais ser de 25 meses.

Em um experimento típico foram empregadas três massas distintas de extrato total de encéfalo de camundongos novos e senis (Figura 1). Foi empregado apenas um animal de cada idade e as massas escolhidas foram, 50, 100 e 150  $\mu\text{g}$  totais de proteína. Para controle de reação foi utilizado o sobrenadante da fração 30% de saturação de sulfato de amônio do extrato total de

encéfalos de camundongos adultos. Este processo concentra boa parte da STI1 na fração solúvel da preparação devido às características bioquímicas da molécula (MARTINS et al., 1997).

O resultado da reação de Western Blotting está apresentado na figura 1 e apresenta uma tendência qualitativa da diminuição de STI1 nas amostras dos animais senis frente aos jovens. Também foi estabelecido que a massa total adequada de extrato a ser aplicado por linha estava entre 50µg e 100µg de proteína.

Obtidos os resultados iniciais os ensaios foram conduzidos em direção da expressão de STI1 nas estruturas cerebrais separadamente, visto que cada estrutura desempenha uma função específica e as alterações sobre estas levariam à diferentes efeitos no indivíduo. Além disso, no caso do RNA mensageiro, foi observada diferença apenas no hipotálamo, assim a utilização de extrato total poderia estar mascarando diferenças de expressão entre regiões encefálicas distintas.



**Figura 6. Comparação da expressão de STI1 no extrato total de encéfalo de animais jovens e senis.** Extrato total (50, 100, 150 µg/linha) do encéfalo de animais BALB/C jovens (22 dias pós nascimento) n=3 e senis (22 meses) foram resolvidos por SDS-PAGE a 10% e analisados por reação de immunoblotting com anticorpo anti-STI1 (1:2000, ZANATA et al., 2002). Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante da fração 30% de saturação de sulfato de amônio do extrato total de encéfalos de camundongos adultos (MARTINS et al., 1997). Pode ser observada uma diminuição na intensidade das bandas nos animais senis quando comparadas as bandas de 50 µg ou 100 µg, com a banda dos animais jovens. Aparentemente não há diferença de intensidade quando se compara as bandas de 150µg de ambos animais. O marcador de massa molecular a esquerda figura representa a migração eletroforética da albumina bovina em kDa.

O resultado apresentado na figura 6 mostra que o reconhecimento do anticorpo anti-STI1 é específico por se ligar a uma só banda e a intensidade de reação mostra que o anticorpo na concentração de 1:5000 reage tão fortemente que a diferença de intensidade das bandas nas diferentes massas aplicadas fica pequena. Este resultado confirma a necessidade da importância da aplicação da massa correta de proteína, para ser possível a análise comparativa das bandas de animais jovens e senis. A expressão de STI1 no SNC é alta (ZANATA et al, 2002; LOPES et al., 2006), se comparado com outras proteínas expressas no mesmo sistema. Tal fato deve ser levado em consideração quando se compara concentração entre indivíduos, pois alta massa de proteína total, como 100µg e 150µg, possui alta massa relativa de STI1, o que levaria a saturação do sinal produzido pelo reagente quimioluminescente e sensibilizado sobre o autoradiograma.

A maior expressão de STI1 no SNC de camundongos jovens pode ser devido a múltiplos fatores, como desenvolvimento do sistema nervoso central, que em indivíduos jovens há um número grande de divisões celulares e produção de novas proteínas, o que aumentaria a concentração de STI1 pela função de co-chaperona e sinalizadora intracelular no processo altamente dinâmico do desenvolvimento. Outro ponto a ser considerado é que o desenvolvimento do SNC é um processo de modelamento de estruturas e adaptação bioquímica das células, principalmente neurônios, os quais produzem neurotransmissores e impulsos nervosos. Todo este processo gera stress às células podendo causar dano, e neste contexto a proteína STI1 colaboraria para uma diminuição dos efeitos nocivos do stress. A hipótese de maior concentração de STI1 em situações de stress durante o desenvolvimento do SNC, no camundongo jovem, poderia ser apoiada no estudo dos casos de patologias encefálicas, como hidrocefalia, hipóxia pós-natal e meningites as quais acabam acarretando, na grande maioria das vezes, em seqüelas neurológicas.

Já a diminuição da concentração de STI1 em indivíduos velhos pode ter vários motivos, como alterações na tradução da proteína por diminuição de estímulo. Uma vez que o SNC está formado e maduro, a expressão protéica é menor do que em jovens (ZARKOVIC, 2003) e a função de proteção contra stress

e o redobramento de proteínas é intenso a ponto da recuperação de STI1 não ser suficiente para reposição das moléculas de STI1 perdidas.

Outra possibilidade é que as alterações que o envelhecimento causa sobre o SNC, de forma ampla e irrestrita, possam gerar stress funcional a célula, levando a uma redução na expressão de STI1. Tendo em vista as funções propostas para a STI1 (ZANATA et al., 2002; LOPES et al., 2006; SAKUDO et al., 2005) as alterações sobre os processos intracelulares, como conseqüência da sua disponibilidade, gerariam alterações na resposta da célula quanto a outros fatores de stress.

No caso do RNA mensageiro, o efeito cumulativo do stress geraria uma diminuição da expressão de STI1 em indivíduos senis, entretanto esta seria de causa multifatorial (JIANG et al., 2005), não sendo possível no momento isolar qual ou quais seriam os principais fatores de diminuição da sua expressão.

#### ***4.2. Análise de STI1 em diferentes estruturas cerebrais***

Uma vez que havia indicação na literatura que a expressão do RNA mensageiro para STI1 era diferente em distintas regiões anatômicas do encéfalo de camundongos jovens e senis (JIANG et al. em 2005), procurou-se dissecar separadamente cada uma das estruturas e se obter os respectivos extratos protéicos de forma isolada. Com isso, esperava-se que as possíveis diferenças de expressão de STI1 nas diferentes regiões encefálicas fossem mais acentuadas aquela observada para o encéfalo total de animais jovem e senil (Figura 1).

Decidiu-se pela análise de três estruturas distintas: hipotálamo, hipocampo e córtex. No trabalho de JIANG e colaboradores (2005) foram avaliados apenas o córtex e o hipotálamo. Decidimos incluir o hipocampo tanto pela importância que tal estrutura tem para a cognição e memória como pela descrição de expressão acentuada de STI1 nesta região de encéfalo (LOPES et al., 2006). O cerebelo não foi incluído neste estudo porque não seria possível comparar os achados obtidos para expressão protéica com dados de RNA mensageiro, pela inexistência dos últimos na literatura. Entretanto pretende-se

incluir o cerebelo em estudos posteriores levando-se em conta a alta expressão do ligante de STI1, a proteína príon celular (SALES et al., 1998) nesta estrutura do encéfalo.

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir em tópicos por estrutura analisada.

#### **4.2.1. Hipotálamo**

O hipotálamo é constituído por substância cinzenta e várias áreas na base do cérebro e é a principal estrutura integradora das atividades viscerais. Possui como função a regulação hormonal e a manutenção da homeostase corpórea. Por controlar a hipófise também faz a ligação entre do sistema nervoso ao endócrino, secretando hormônios que atuam na função hipofisária. Sua função na homeostase é essencial pela ação que exerce no controle de temperatura, sistema cardiovascular, fome, sede, saciedade e comportamento, por pertencer ao sistema límbico. Além disso, controla o comportamento, estando envolvido na manutenção e alteração do estado de humor, libido e do ciclo de sono-vigília (WOLFHEIDGER,1998).

A atuação do hipotálamo no estado vegetativo se dá por atuar no sistema endócrino regulando vários sistemas de forma a modular a resposta conforme o estímulo recebido do ambiente. No sistema cardiovascular o hipotálamo atua na pressão arterial e na frequência cardíaca conduzindo estímulos para formação reticular de ponte e bulbo, os quais são os efetores na condução da resposta. Paralelamente age também sobre o estado hídrico do organismo regulando a sede, retenção e perda de água. Este efeito é modulado pela concentração de eletrólitos no hipotálamo lateral, contribuindo com a regulação da pressão arterial (KUMAR et al., 1997 ).

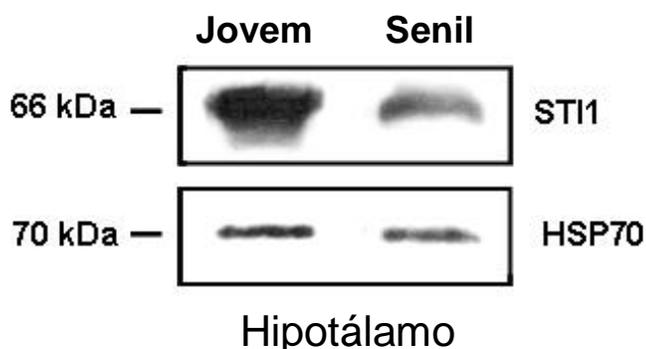
O controle da temperatura do organismo exercido pelo hipotálamo é modulado pela passagem de sangue sobre a estrutura hipotalâmica. Já as áreas ventromediais e laterais do hipotálamo são responsáveis pelo controle de fome e saciedade, regulando o sistema gastrintestinal. Estas áreas também estão envolvidas na ejeção de leite pelas glândulas mamárias durante a lactação.

Algumas mulheres com disfunções hipotalâmicas produzem leite sem estar amamentando (PURVES, Neuroscience. 3rd ed. England: Sinauer Associates; 2004).

Possuindo amplas conexões com as demais áreas cerebrais o hipotálamo regula as atividades neurais no comportamento como postura diante o medo e punição/satisfação, isto confere como estrutura alvo de medicamentos que modulam o comportamento (KUMAR et al., 1997).

O hipotálamo murino está localizado abaixo do hipocampo, adjacente ao tronco cerebral. Por ser uma estrutura de alta funcionalidade o hipotálamo varia de tamanho entre indivíduos jovens e velhos, sendo maior nestes.

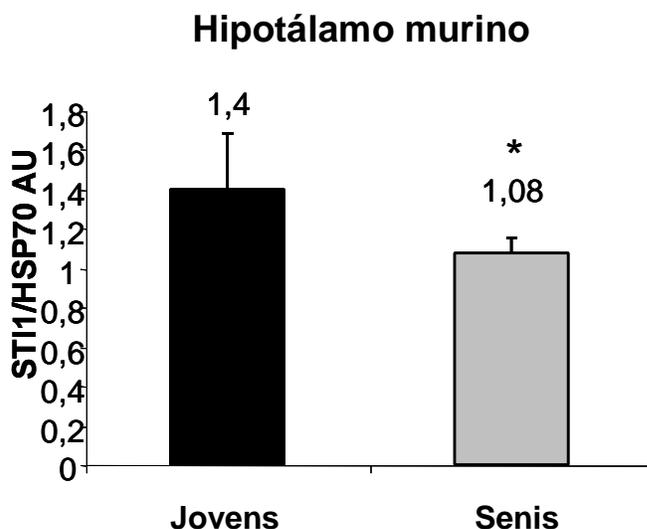
Para análise de STI1 foram utilizados hipotálamos jovens (n=12) e senis (n=12). O resultado representativo da análise de expressão diferencial de STI1 no hipotálamo é apresentado na figura 7.



**Figura 7. A expressão de STI1 está diminuída no hipotálamo de animais senis.** Extrato total (50µg/linha) do hipotálamo (n=12) de animais BALB/C jovens (22 dias pós-nascimento) e animais senis (22±2 meses) foram resolvidos por SDS-PAGE a 10% e analisados por reação de immunoblotting com anticorpo anti-STI1 (1:2000, ZANATA et al.,2002). Após a visualização da reação com substrato quimiluminescente, as membranas foram reutilizadas em nova reação empregando anticorpos anti-Hsp70 (1:1000, B&D) como controle da quantidade de proteína aplicada em cada linha. As amostras de animais jovens e senis são representativas das 12 reações de cada condição experimental avaliada. A diminuição observada em animais senis é específica e não consequência de menor massa de proteína aplicada nas linhas uma vez a intensidade de reação para Hsp70 é semelhante em ambas amostras.

Como pode ser observado há uma diminuição qualitativa na expressão de STI1 no hipotálamo de animais senis quando comparado ao de jovens. Para confirmação da aplicação da mesma quantidade de massa protéica por linha de gel foi utilizado anticorpo anti-HSP70, que reconhece especificamente a proteína de stress HSP-70. Interessantemente a expressão desta proteína não está alterada durante o envelhecimento, apesar deste membro da família das proteínas de choque térmico ter sua função de chaperona ligada à expressão da STI1. A expressão da HSP70 também poderia estar alterada uma vez que STI1 faz uma ponte estrutural entre HSP70 e HSP90, formando um complexo que atua no dobramento de polipeptídeos nascentes (PRODROMOU, et al.1999).

Uma análise quantitativa da diferença de expressão de STI1 durante o envelhecimento mostra que a STI1 está 1,3 vez diminuída em animais senis quando comparados a animais jovens (Figura 3). O valor obtido na literatura para o RNA mensageiro de STI1 (JIANG et al. em 2005) mostra uma diminuição de 4,9 vezes deste transcrito em animais senis em relação aos jovens.



**Figura 8. A expressão de STI1 está 1,3 vezes diminuída no hipotálamo de animais senis.** As bandas específicas para STI1 e Hsp70 para cada uma das amostras de animais jovens (n=12) e senis (n=12) foram analisadas por densitometria e os valores expressos com a razão de STI1/Hsp70. Cada condição experimental é representada pela média  $\pm$  erro padrão de 12 animais de um total de três experimentos. \*  $p < 0,1$  senis versus jovem, *t*-teste de Student's.

Uma comparação direta entre os dois valores não é possível uma vez que se trata de processos diferentes, ou seja, transcrição e tradução. Além disso, é sabido que o RNA está sujeito a diferentes taxas de síntese e degradação e que a estabilidade do RNA mensageiro pode variar de gene para gene.

Entretanto os resultados aqui apresentados vão ao encontro dos achados para RNA mensageiro que apontam para uma diminuição da expressão de STI1 durante o processo de envelhecimento.

No caso da estrutura hipotalâmica a hipótese sobre as causas da diminuição podem ser muito amplas, visto a atividade e importância para o organismo do hipotálamo. Sendo um centro de conexão entre SNC e as funções viscerais o hipotálamo recebe todo efeito de stress, dos mais variados tipos, que ocorrem no organismo, tendo que modular sua atividade para melhor manutenção do equilíbrio funcional do organismo.

Porém sabendo que as estruturas cerebrais funcionam com relações e conexões interdependentes mínimas alterações no hipotálamo podem gerar significativo dano ao indivíduo por se tratar de uma região de processamento dos estímulos recebidos do ambiente via órgãos sensoriais.

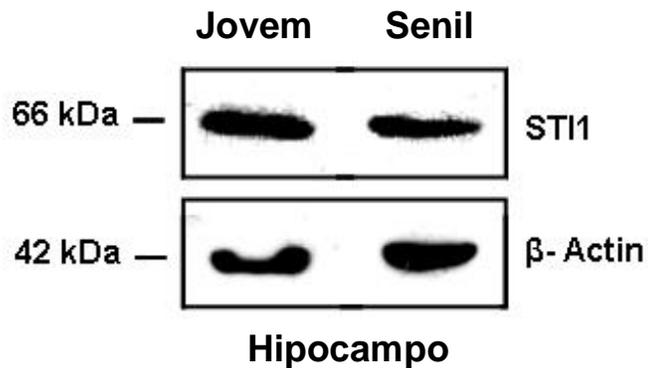
#### **4.2.2. Hipocampo**

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais que possui alta plasticidade e adaptação. Sua função está relacionada com aprendizado e memória.

Sendo a porta de entrada do sistema límbico o hipocampo recebe todos os estímulos sensoriais do ambiente, produzindo respostas comportamentais diferentes. As respostas emitidas pelo sistema límbico dependem da área estimulada pelo hipocampo após o estímulo sensorial. O hipocampo pode modular respostas fisiológicas por estímulo do hipotálamo, conforme o estímulo físico ou psíquico. Muitos traumas psíquicos estimulam o hipocampo a produzir diversos tipos de respostas, um exemplo são pacientes neurológicos com distúrbios de perseguição, os quais geram ansiedade e um aumento na frequência cardíaca e na pressão sanguínea (GOLDENSTEIN et al., 2005; BARTZOKIS, 2004).

A lesão do hipocampo traz a amnésia anterógrada, a qual faz com que o indivíduo não consiga memorizar informações baseadas em simbolismos verbais, ou seja, não é possível gravar os nomes das pessoas que conhece, porém a memória passada, de longo tempo, permanece armazenada. O hipocampo é importante no processo de transição da memória de curto prazo para memória de longo prazo: faz com que a mente repita várias vezes aquela informação a fim de que seja consolidada a memória para aquela informação. Muitos pacientes portadores de Alzheimer apresentam características de amnésia, o que leva a conclusão que há dano sobre o hipocampo destes pacientes, porém caracterizar o dano a esta estrutura é difícil devido sua plasticidade funcional e localização no SNC. A discussão sobre causas da doença de Alzheimer é vasta, porém uma teoria de que a causa inicial chave seria uma redução da vascularização do hipocampo devido a patologias vasculares, como também hipertensão.

A expressão de ST11 no hipocampo de animais jovens e senis não foi qualitativamente diferente (Figura 9). Tal fato pode ser reflexo de que o estímulo hipocampal nos animais deve ser o mesmo ao longo da vida, apresentando pouca evolução de aprendizado e reduzidos estímulos ambientais que forcem o animal a aprender a sobreviver no ambiente, uma vez que os mesmos passam toda a sua vida confinada nas caixas plásticas do biotério.

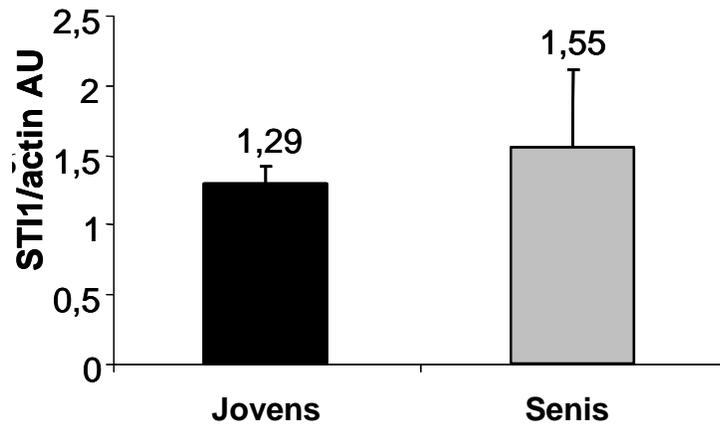


**Figura 9. A expressão de STI1 é mantida constante no hipocampo de animais senis quando comparada a de animais jovens.** Extrato total (75µg/linha) do hipocampo (n=12) de animais BALB/C jovens (22 dias pós-nascimento) e senis (22±2 meses) foram resolvidos por SDS-PAGE a 10% e analisados por reação de immunoblotting com anticorpo anti-STI1 (1:2000, ZANATA et al., 2002) Após visualização da reação com substrato quimioluminescente, as membranas foram reutilizadas em nova reação empregando anticorpos anti-β-actina (1:500, Sigma) como controle de quantidade de proteína aplicada em cada linha. As amostras de animais jovens e senis são representativas das 12 condições experimentais avaliadas. Como pode ser observado não há uma variação qualitativa da expressão de STI1 durante o envelhecimento.

Em humanos o estudo de alterações no hipocampo é de grande interesse visto as funções a ele atribuídas e as conseqüências sobre o organismo durante o envelhecimento das estruturas hipocampais. Outro ponto interessante sobre o hipocampo humano é a questão ambiental de estímulo. Indivíduos que exercem uma atividade intelectual superior, a qual exigia maior função do hipocampo estão sujeitos a diferentes estados de stress e alterações hipocampais, se comparados a indivíduos com hábitos semelhantes, porém com atividade intelectual mediana.

A análise quantitativa da expressão diferencial de STI1 no hipocampo de animais jovens e senis é apresentada na figura 10.

## Hipocampo murino



**Figura 10. A expressão de STI1 é mantida constante no hipocampo de animais senis.**

As bandas específicas para STI1 e  $\beta$ -actina para cada uma das amostras de animais jovens (n=12) e senis (n=12) foram analisadas por densitometria óptica e os valores expressos como a razão de STI1/ $\beta$ -actina. Cada condição experimental é representada pela média  $\pm$  erro padrão de 12 animais de um total de três experimentos. Os valores obtidos não foram estatisticamente diferentes.

### 4.2.3. Córtex

O córtex encefálico é a estrutura que reveste os hemisférios cerebrais e as outras estruturas neles presentes, sendo ligados por um feixe grosso de fibras nervosas chamado corpo caloso. Esta estrutura é uma camada que varia de espessura, entre 2 e 6 milímetros conforme a área do encéfalo, tendo a superfície com sulcos e giros em mamíferos superiores. Os roedores como ratos e camundongos não possuem muita complexidade em tais estruturas na superfície de seus córtices quando comparados a mamíferos superiores como primatas e cetáceos, sendo que estes últimos possuem uma complexidade muito maior, havendo sulcos e giros bem definidos. A presença de sulcos e giros no encéfalo demonstra a complexidade de funcionamento do órgão, visto que sua formação se deve a uma maior superfície para conexão de áreas distintas (PURVES, Neuroscience. 3rd ed. England: Sinauer Associates; 2004).

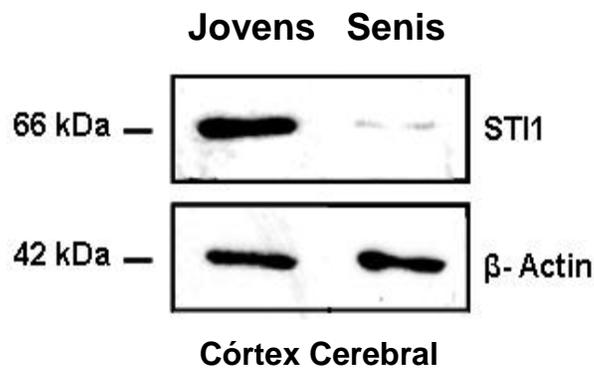
O córtex é constituído pela substância cinzenta, formada por células gliais e os corpos das células nervosas, diferindo da substância branca a qual é formada predominantemente por fibras das células nervosas. A substância

cinzenta é onde ocorre o processamento de informações e a geração de estímulos motores, sendo estes conduzidos pelos axônios presentes na substância branca.

A função cortical está relacionada à parte motora do indivíduo que pode ser controlada por outras estruturas do sistema nervoso periférico, no caso do ato-reflexo. A conexão do sistema límbico, o qual é o maior responsável pelo estímulo cortical, é feita pelos giros cingulados anteriores e subcalosos. Estas áreas funcionam como associação de controle do comportamento.

Lesões no córtex causam distúrbios motores, como Parkinson, e algumas áreas como córtex orbital frontal traz insônia e inquietude, já áreas como a conexão com o sistema límbico causa distúrbios comportamentais como violência excessiva e auto-agressão.

Quando se compara a expressão de STI1 no córtex de animais jovens e senis pode-se observar uma diminuição qualitativa de STI1 no córtex de animais senis (Figura 11).

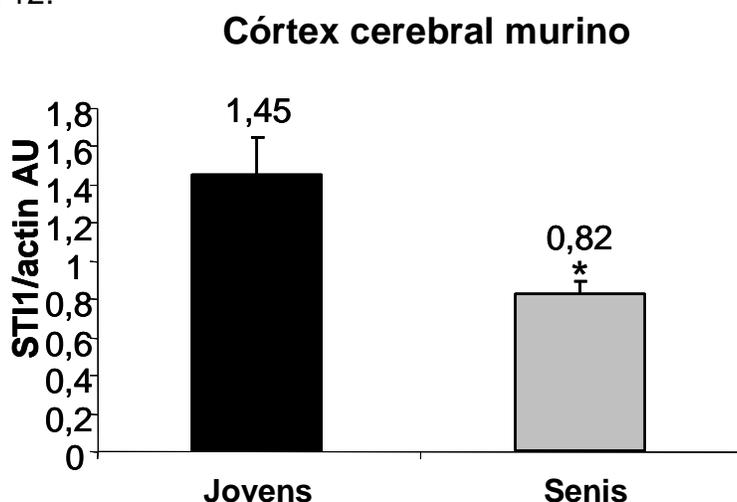


**Figura 11. A expressão de STI1 está diminuída no córtex cerebral de animais senis quando comparada a de animais jovens.** Extrato total (75µg/linha) do córtex cerebral (n=12) de animais BALB/C jovens (22 dias pós-nascimento) e senis (22±2 meses) foram resolvidos por SDS-PAGE a 10% e analisados por reação de imunoblotting com anticorpo anti-STI1 (1:2000, ZANATA et al., 2002) Após visualização da reação com substrato quimioluminescente, as membranas foram reutilizadas em nova reação empregando anticorpos anti-β-actina (1:500, Sigma) como controle de quantidade de proteína aplicada em cada linha. As amostras de animais jovens e senis são representativas das 12 condições experimentais avaliadas. A diminuição observada em animais senis é específica e não é consequência de menor massa de proteína aplicada nas linhas uma vez a intensidade de reação para β-actina é semelhante em ambas as amostras.

Observando os resultados fica clara a diferença da concentração de STI1 entre indivíduos jovens e senis. A diminuição da expressão de STI1 em animais senis não é consequência da diferença de massa protéica aplicada nas linhas, uma vez que a reação com anticorpos anti- $\beta$ -actina possui semelhança em intensidade em todas as amostras analisadas. A  $\beta$ -actina foi utilizada como proteína “house-keeping” por constituir o citoesqueleto, que por sua vez não é alterado significativamente durante o processo de envelhecimento, servindo perfeitamente para comparação da expressão de STI1 entre indivíduos de diferentes idades.

O resultado obtido corrobora àqueles obtidos por JIANG et al., 2000, no qual há visível decréscimo na síntese de mRNA para STI1 nos indivíduos velhos.

Tratando das alterações da concentração de STI1 no córtex, sua diminuição fica mais bem evidenciada do que nas estruturas anteriores, visto que o camundongo é um animal bastante ativo fisicamente com estímulo motor bastante evidente. Quando observa-se a ação comportamental dos indivíduos nota-se que os senis são menos ativos que os jovens, assim fazendo uma conexão com as evidências bioquímicas apresentadas. A análise quantitativa da expressão diferencial de STI1 no córtex de animais jovens e senis é apresentada na figura 12.



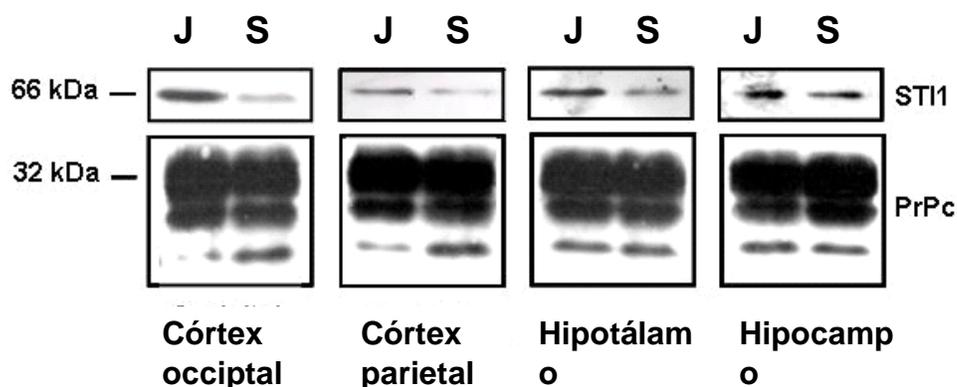
**Figura 12. A expressão de STI1 está 1,8 vezes diminuída no córtex cerebral de animais senis.** As bandas específicas para STI1 e  $\beta$ -actina para cada uma das amostras de animais jovens (n=12) e senis (n=12) foram analisadas por densitometria e os valores expressos com a razão de STI1/  $\beta$ -actina. Cada condição experimental é representada pela média  $\pm$  erro padrão de 12 animais de um total de três experimentos. \* p < 0,001 senis versus jovem, t-teste de Student's.

### 4.3 Análise de STI1 em diferentes estruturas encefálicas humanas

Uma vez estabelecidas as diferenças na expressão de STI1 em modelo murino de animais jovens e senis procurou-se avaliar se tais diferenças poderiam ser também observadas em humanos.

Apesar da dificuldade na obtenção de amostras obtivemos resultados qualitativos de expressão de STI1 em diferentes regiões anatómicas de cérebros humanos.

A figura 8 mostra que a expressão de STI1 está diminuída em todas as regiões anatómicas do cérebro de um homem de 71 anos de idade quando comparada a do cérebro de criança do sexo masculino com 2 meses de nascimento. Interessantemente a diminuição de expressão inclui o próprio hipocampo, o qual em camundongos não apresentou expressão diferencial (Figuras 6 e 7).



**Figura 13. A expressssão de STI1 está qualitativamente diminuída em animais senis enquanto a expressão de PrPc é mantida constante em diversas regiões anatómicas do cérebro humano.** Extrato total (100µg/linha) de diversas regiões anatómicas do cérebro humano foram obtidas das necropsias de um lactente de 2 meses de idade (J - jovem) e de um idoso de 71 anos de idade (S – senil). Massas iguais de proteína forma resolvidas por SDS-PAGE a 10% e analisadas por reação de imunoblotting com anticorpos anti-STI1 e anti-PrPc (1:2000 e 1:1000, respectivamente ZANATA et al., 2002). As reações foram levadas a cabo simultaneamente após a divisão da membrana de nitrocelulose, uma vez que as duas proteínas possuem massas moleculares distintas e são facilmente resolvidas nestas condições de eletroforese. Como pode ser observado a expressão de STI1 está qualitativamente diminuída no cérebro do indivíduo senil. Já a expressão do PrPc em todas as amostras analisadas, pode-se considerar, nestas condições experimentais, o PrPc como um bom controle o carregamento das amostras em cada uma das linhas.

#### **4.4. Análise da expressão de STI1 na linhagem SHSY-5Y submetidas ao stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.**

Dos diferentes tipos de condição de stress que as células do sistema nervoso estão sujeitas durante seu processo normal de envelhecimento, talvez o stress oxidativo seja o mais relevante, devido sua continuidade durante toda a vida do indivíduo.

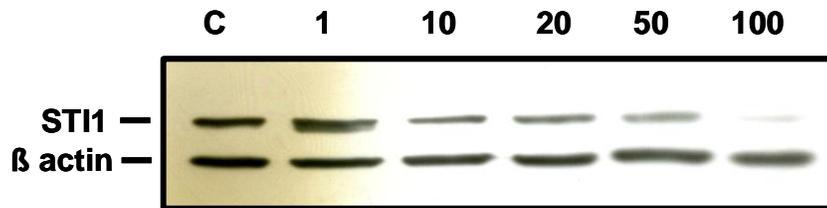
A hipótese de que a expressão de STI1 poderia estar diminuída no sistema nervoso de mamíferos como consequência do stress oxidativo foi testada empregando-se modelo de células em cultivo.

Neste modelo empregou-se a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a qual foi desafiada com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 24 horas (Figura 9).

Como pode ser observado há uma relação inversa entre stress oxidativo e a expressão de STI1. Este resultado vai ao encontro da hipótese de que o stress oxidativo contínuo no sistema nervoso poderia levar a uma diminuição da expressão de STI1. Os mecanismos intracelulares que levariam a tal diminuição ainda não são conhecidos.

Pelo que já se conhece da função biológica da STI1 poderia se argumentar que o declínio progressivo do sistema nervoso durante o envelhecimento poderia ser consequência da diminuição da expressão de STI1. Neste contexto a STI1 atuaria ou como agente protetor da apoptose (ZANATA et al., 2002; CHIARINI et al., 2002), ou como estimulador da neuritogênese (LOPES et al., 2006) ou ainda como facilitador da atividade da enzima SOD (SAKUDO et al., 2005).

Assim, a diminuição da expressão de STI1 durante a vida do indivíduo poderia levar as perdas observadas na velhice como consequência da diminuição de umas das funções da STI1, separadamente ou em conjunto.



**Figura 14. A expressão de STI1 diminui em células SH-SY5Y sob condições de stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.** Extratos totais (50µg/linha) de células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y não tratadas (controle, C) e tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (1, 10, 20, 50, 100µM) foram resolvidos por SDS-PAGE a 10% e analisados por reação de imunoblotting com anticorpo anti-STI1 (1:2000, ZANATA et al.,2002). Após a visualização da reação com substrato quimioluminescente, as membranas foram reutilizadas em nova reação empregando anticorpo anti-β-actina (1:500, Sigma) como controle da quantidade de proteína aplicada em cada linha. Como pode ser observado, há uma diminuição progressiva na expressão de STI1 frente ao aumento na concentração de peróxido de hidrogênio.

A hipótese é de que mesmo com uma concentração muito superior a fisiológica, o agente oxidante atue provocando stress oxidativo sobre a célula em curto espaço de tempo, no caso 24 horas, e estes efeitos modulem a função de STI1 de forma a diminuí-la na concentração celular. Este fato ocorre pelo processamento das moléculas de STI1 presentes antes do pulso de stress, as quais são recrutadas para recuperação de proteínas e dobramento de novas proteínas recém sintetizadas. Outra hipótese complementar a esta é que a atuação de sinalizador intracelular de STI1 esteja prejudicada pelos efeitos do stress oxidativo, diminuindo consideravelmente a reposição da molécula de STI1, pela não transmissão correta de estímulos intracelulares.

Uma segunda hipótese seria que para síntese de novas moléculas de STI1 seriam necessárias moléculas de STI1 para o dobramento das moléculas recém sintetizadas.

Com a avaliação das informações obtidas é possível traçar hipóteses, cientificamente sustentadas, de como o processo de envelhecimento está ligado a ação degenerativa cumulativa do stress oxidativo sobre o sistema nervoso central e suas áreas, com funções específicas. Estes dados permitem entender as limitações que a idade causa aos indivíduos por observação do seu comportamento e relação com o ambiente, quando avaliados do ponto de vista funcional das áreas avaliadas. Um exemplo seria as alterações fisiológicas dos

idosos, que não havendo estímulo hipotalâmico sobre seus alvos, poderiam levar a alterações como regulação da temperatura, mudança no estado de sono-vigília e alterações hormonais com suas conseqüências.

A literatura apresenta diversos dados da influência do stress oxidativo sobre o sistema nervoso central degenerando-o lentamente. Procedendo a análise no nível dos processos moleculares intracelulares e metabolismo celular é possível entender a conseqüência do dano causado pelo stress oxidativo de modo a abranger diversas células de diferentes estruturas do SNC com diferentes funções.

Analisando os processos que a STI1 está envolvida, no funcionamento da célula, fica claro que uma diminuição da concentração desta acarreta danos celulares. O envolvimento da STI1 na formação conformacional de proteínas recém sintetizadas é um ponto importante, visto que a manutenção da viabilidade e função celular ficam alterados quando há uma menor quantidade de proteínas sendo produzidas ou estruturalmente bem moldadas para execução de sua função.

Uma menor concentração de proteínas funcionais diminui a capacidade da célula de executar sua função, sendo assim uma menor capacidade resposta ao seu ambiente. Não só a concentração de proteínas funcionais, mas suas características estruturais bem formadas são necessárias para função. Uma proteína que por motivos de stress ou má formação não execute perfeitamente sua função pode ser acumulada gerando outro fator danoso à célula, a qual quando possível destrói as proteínas alteradas gastando energia com um processo não programado gerando mais stress celular. A recuperação de proteínas com alterações conformacionais é outra que função necessária a indivíduos velhos, visto que a síntese de novas proteínas está comprometida por oxidação do DNA, dificultando o processo de tradução (HAZRA et al. 2006).

Os danos causados pelo stress oxidativo sobre as células e os processos intracelulares de indivíduos idosos pode ser avaliado pelas alterações irreparáveis que acontecem as moléculas com formação de marcadores de produtos oxidados. No caso dos lipídios o produto da oxidação gera o HNE (2-hidroxi-4-noneal), que se avaliado comparativamente entre jovens e velhos a

concentração de HNE é muito superior em indivíduos velhos, demonstrando que o processo oxidativo ocorreu e é cumulativo. A presença do HNE no SNC de indivíduos senis indica que houve peroxidação ou nitrificação dos lipídios da bainha de mielina e alguns da membrana celular. Este fato causa dano ao funcionamento do SNC pela desmielinização dos feixes nervosos, causando problemas na condução do sinal nervoso, uma vez que o HNE é tóxico para as células e age sobre as enzimas mitocôndrias, diminuindo a produção de energia pela célula (BARTZOKIS, 2004; ZARKOVIC, 2003).

Um marcador de oxidação para proteínas é o carbonil, que quando presentes na molécula protéica geram danos a esta alterando sua função. Moléculas protéicas contendo grupamentos carbonil são encontradas na maioria das amostras biológicas, devido a exposição aos efeitos do stress oxidativo, apresentando uma maior concentração em amostras de indivíduos portadores de diabetes, doenças neurodegenerativas e idosos.

Tratando-se do envelhecimento a oxidação pontual de moléculas é um problema que altera os processos intracelulares tornando-se um processo degenerativo crônico. No caso do SNC este processo crônico pode ser mais agressivo ao organismo devido sua função e o efeito que age sobre todo organismo. As alterações oxidativas nas células do SNC, causando uma diminuição de ST11, aceleram a degeneração do sistema, pela ampla importância da molécula a célula. A questão da conformação das proteínas é ponto importante pela geração de proteínas mal formadas que podem gerar maior efeito oxidativo, gerando maior stress. Proteínas sem conformação podem agregar-se formando amilóides, os quais são depositados na célula causando inúmeros problemas. Placas amilóides são encontradas em cérebros de pacientes com doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer, Creutzfeld-Jacob e Huntington acelerando o processo degenerativo das funções cerebrais, levando-os a morte.

Correlacionando alterações das atividades das estruturas cerebrais com os efeitos degenerativos causados por placas amilóides pode-se supor os danos causados e os sintomas encontrados nos pacientes. Avaliando o processo de envelhecimento sobre o hipotálamo podemos perceber as alterações causadas ao organismo por diminuição da função desta estrutura. O hipotálamo, por regular

o sistema endócrino, faz com que indivíduos velhos apresentem disfunções endócrinas pequenas, porém gradativas. Alterações no hipotálamo seriam caracterizadas por alterações comportamentais, como estado de sono-vigília e alterações hormonais. Se as alterações atingem o hipocampo os sintomas dos pacientes seriam alterações nos estados de memória, demência e esquizofrenia, além de mudanças na capacidade cognitiva e sensoriais, como perda gradativa do olfato, perda do tato e respostas de ato-reflexo. Algumas destas características podem ser encontradas em portadores de Alzheimer. Presença de placas amilóides no córtex gera alterações na capacidade motora e de localização, bem como na comunicação das áreas cerebrais, podendo haver até hiper função de algumas áreas por deficiência na conexão. Indivíduos portadores de Parkinson apresentam estes sintomas, porém as placas amilóides nem sempre estão presentes, sugerindo uma alteração a nível celular.

Alterações de proteínas de transporte e sinalização são danos comuns encontrados em portadores de doenças neurodegenerativas. Uma alteração em uma proteína com função de canal de cálcio altera o funcionamento da célula de modo a comprometer as células vizinhas desencadeando uma perda de função da área. Em algumas neuropatologias hipotalâmicas alterações na área lateral levam a um desequilíbrio osmótico ao organismo do indivíduo.

Atualmente atribuiu-se a STI1 uma função de sinalizadora intracelular (SILIGARDI, 2004), porém os mecanismos ainda não estão bem claros. Estudos recentes demonstram que a sinalização celular é alterada quando a célula está em estados de stress, e a presença de proteínas mal formadas e agregados protéicos, bem como concentrações alteradas de cálcio geram um ruído que impede o envio correto do sinal. Diante deste fato a STI1 age tampando os problemas causados para um melhor transdução de sinal, uma diminuição significativa de STI1 acarretaria na perda do controle da sinalização intracelular, conseqüentemente um dano maior a função da célula.

Uma diminuição da concentração de STI1 no SNC reduz a capacidade de formar novas conexões neurais, demonstrados pela atividade neuritogênica da molécula de STI1 (LOPES et al., 2006). O efeito da redução recai sobre áreas como hipocampo e córtex, as quais dependem de novas conexões

para exercer um melhor funcionamento. A capacidade de aprendizado fica limitada quando não há uma plasticidade adequada dos neurônios hipocâmpais, os quais sem novas conexões não conseguem processar a informação adquirida. Outro ponto do hipocampo é a memória que é prejudicada, em especial a de curto prazo, pelas conexões utilizadas estarem sobrecarregadas. Efeitos sobre o córtex da diminuição da neurogênese são observados pela limitação motora e controle emocional.

Dentro do contexto do envelhecimento e do resultado obtido pela análise comparativa de ST11 em indivíduos jovens e velhos, nota-se que a importância da concentração de ST11 nas células é grande, para manutenção dos processos celulares. A diminuição da concentração de ST11 pelos processos multifatoriais do envelhecimento levam as células a perda de uma proteína anti-stress, causando um maior efeito degenerativo do stress nos processos intracelulares, limitando a função celular. A consequência destes fatos é a perda gradativa das funções do tecido afetado, no caso do SNC estendendo-se ao organismo de forma agressiva, agravando o estado de stress tornando-o cumulativo.

#### ***4.5. Comparação da distribuição de ST11 nas estruturas cerebrais de camundongos jovens e senis***

O desenvolvimento das estruturas do cérebro ocorre dinamicamente durante a vida. O aprimoramento das estruturas cerebrais está relacionado a função a ser desempenhada pela estrutura, demandando adaptações bioquímicas e conexões intercelulares. As mudanças na bioquímica da célula proporcionam significativas alterações no funcionamento da estrutura, bem como sua complexidade por proporcionar as células da estrutura a fazerem várias novas conexões, as quais devem ser bem direcionadas e precisas.

O cérebro do indivíduo velho é menos capaz de adaptações e formação de novas conexões, visto que as diferenças bioquímicas, quando comparado ao jovem, são bem evidentes. Mas ainda não somos capazes de

apontar com precisão quais são as alterações significativas que causem a diminuição da neuronavegação em indivíduos velhos.

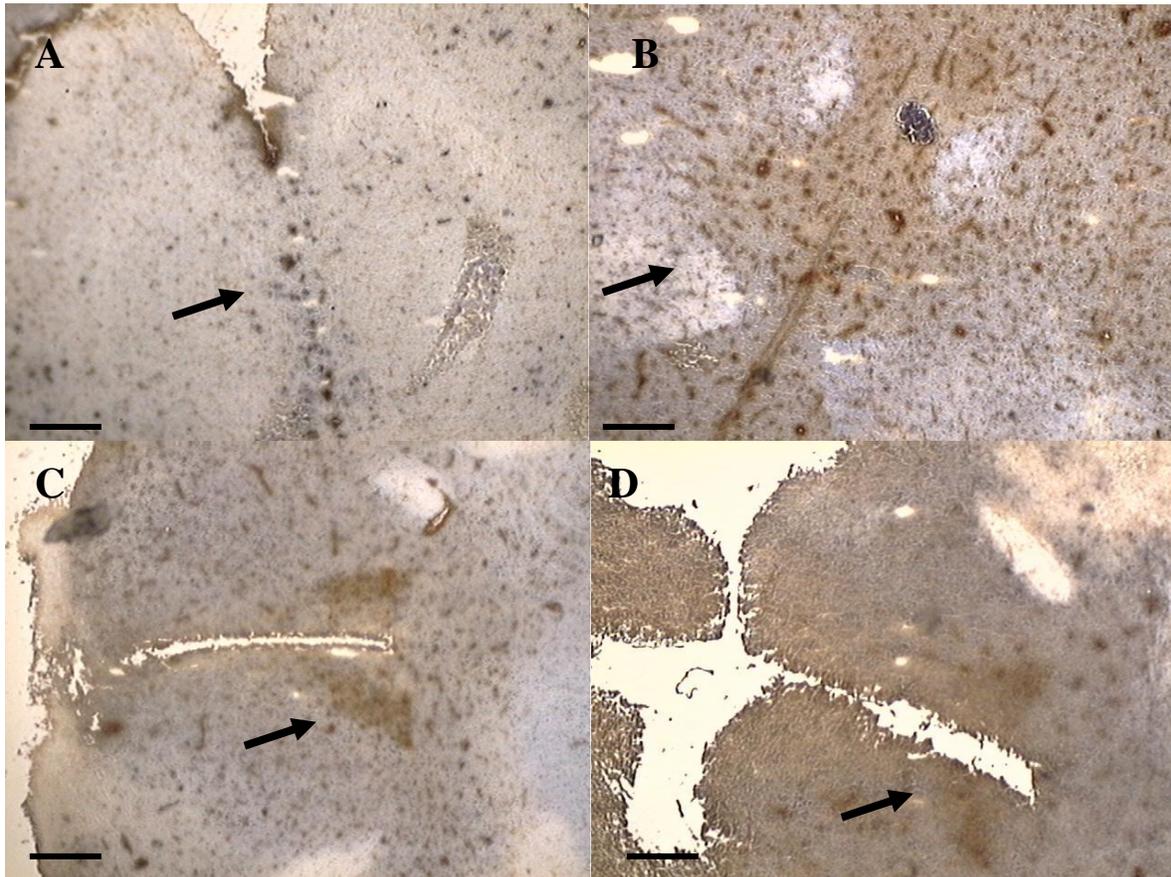
A neuronavegação é um processo pouco conhecido quanto ao funcionamento, mas há resultados na literatura que demonstram o envolvimento bioquímico nas ações de neuronavegação, sendo o mais bem descrito a neuritogênese.

Sabendo do envolvimento de ST11 na neuritogênese (LOPES et al., 2006) levantou-se a hipótese que a distribuição de ST11 no cérebro jovem e velho era diferente.

Os resultados de stress oxidativo obtidos demonstram claramente que o fator stress atua ativamente sobre a expressão de ST11. Relacionando este resultado aos citados na literatura sobre o envolvimento de ST11 na neuronavegação, isto corrobora a acreditar que a distribuição de ST11 está alterada.

A seguir são apresentados os resultados obtidos da distribuição de ST11 nos cérebros jovens e senis.

## Hipotálamo



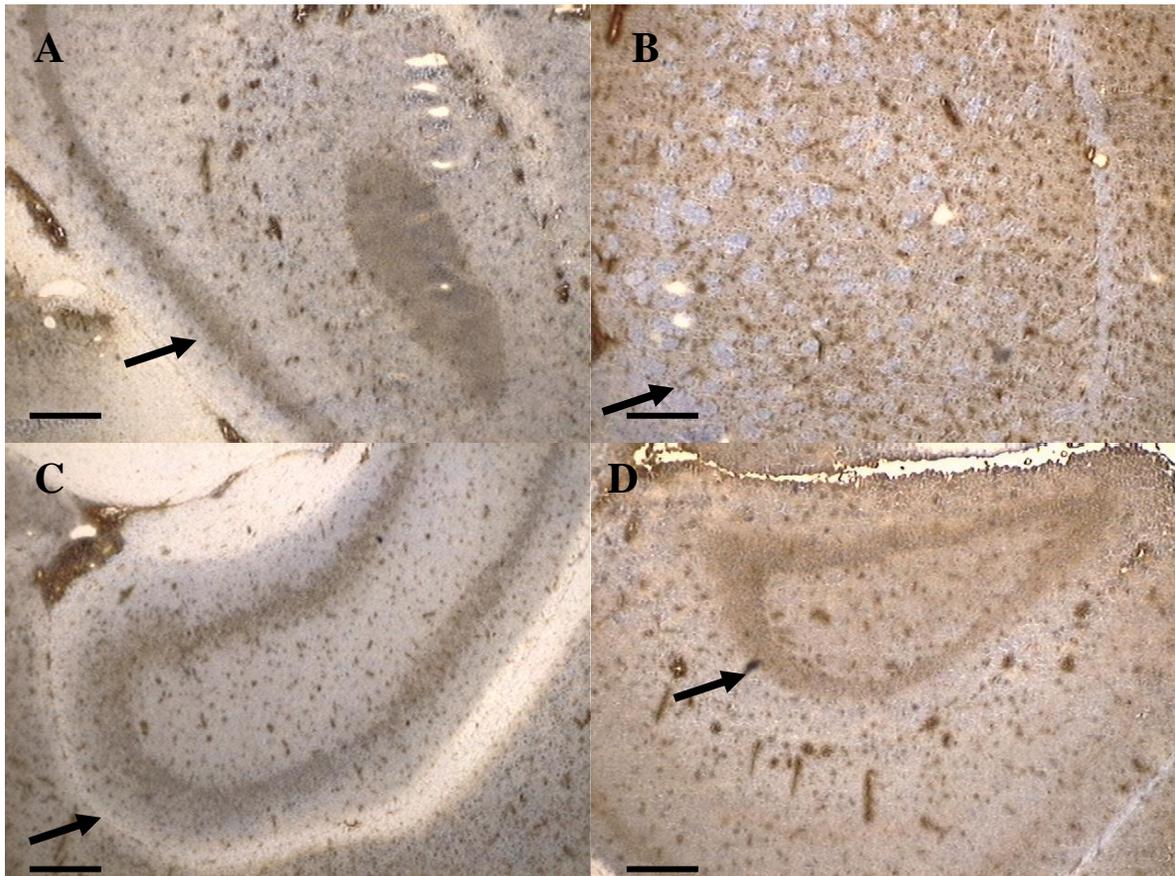
**Figura 15. Imunohistoquímica de hipotálamos de camundongos jovem e velho marcado para ST11 (em castanho). Cortes sagital e coronal focando área central, aumento 4x. A** corte sagital de cérebro de camundongo senil, seta indica hipotálamo. **B** corte sagital de cérebro de camundongo jovem, seta indica hipotálamo. Nota-se a evidente diferença. **C** corte coronal de cérebro de camundongo senil, seta indica hipotálamo. **D** corte coronal de cérebro de camundongo jovem, seta indica hipotálamo.

Como o hipotálamo é o centro controlador da homeostase é necessária a manutenção funcional de uma área, a qual fica encarregada de efetuar funções das áreas que já foram comprometidas durante o envelhecimento. O papel de neuroproteção da ST11 é de grande importância para o hipotálamo, visto sua função, e o comprometimento total da estrutura leva o indivíduo a uma perda da homeostase levando-o a morte.

As áreas laterais do hipotálamo do camundongo senil (Quadro A) apresentam uma concentração muito baixa de ST11, sugerindo que a atividade bioquímica realizada pela proteína estaria comprometida. Já o camundongo jovem (Quadro B) apresenta uma distribuição mais homogênea de ST11 no hipotálamo.

Isto pode estar relacionado ao fato do camundongo jovem não ter sido exposto aos efeitos do stress.

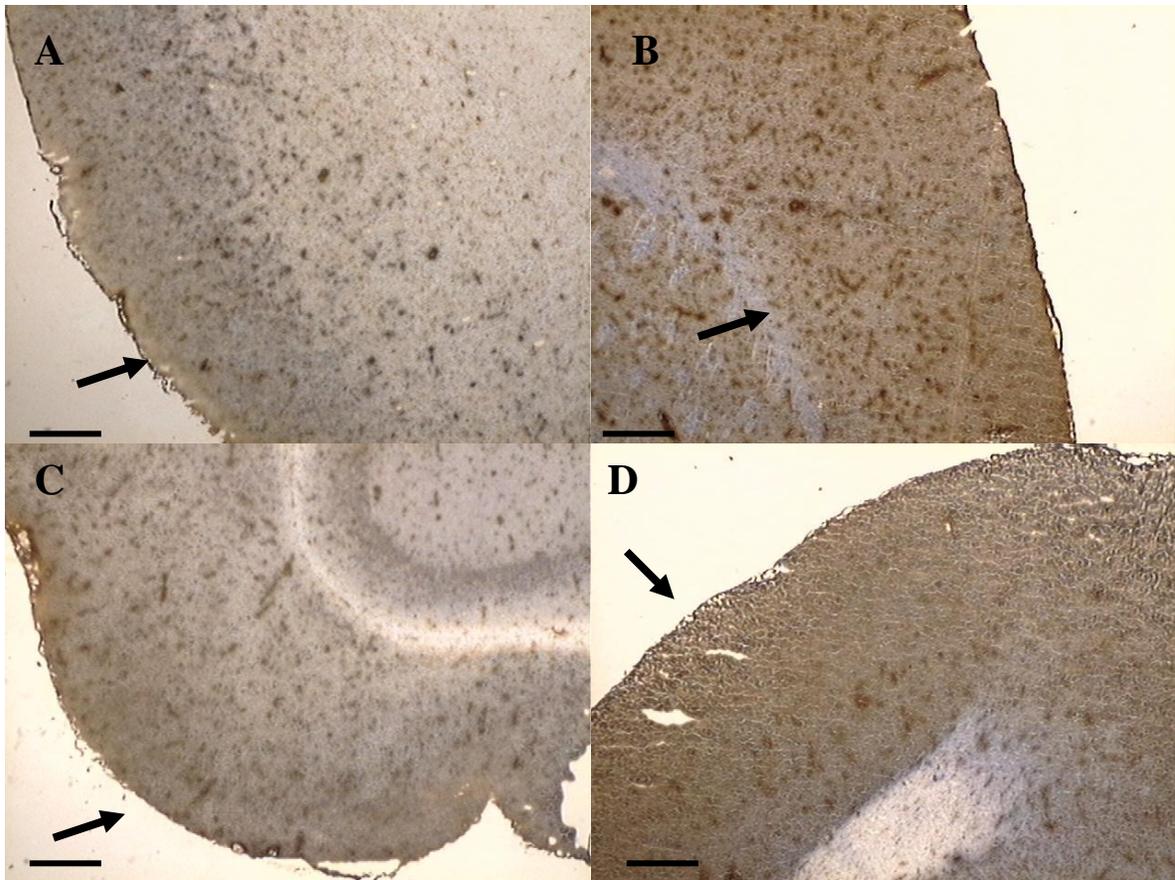
### *Hipocampo*



**Figura 16. Imunohistoquímica de hipocampus de camundongos jovem e velho marcado para ST11 (em castanho). Cortes sagital e coronal focando área central, aumento 4x. A** corte sagital de cérebro de camundongo senil, seta indica 1º giro do hipocampo. **B** corte sagital de cérebro de camundongo jovem, seta indica 1º giro do hipocampo. Nota-se a evidente diferença. **C** corte coronal de cérebro de camundongo senil, seta indica 1º giro do hipocampo. **D** corte coronal de cérebro de camundongo jovem, seta indica 1º giro do hipocampo.

Sendo o hipocampo a estrutura com maior plasticidade e função de receptor sensorial a expressão de ST11 é de grande importância. Porém a concentração de ST11 no hipocampo é similar em jovens e velhos, alterando a distribuição, a qual se deve ao motivo da funcionalidade da estrutura.

### *Córtex*



**Figura 17. Imunohistoquímicas de córtex de camundongos jovem e velho marcado para ST11 (em castanho). Cortes sagital e coronal focando área central, aumento 4x. A** corte sagital de cérebro de camundongo senil, seta indica córtex. **B** corte sagital de cérebro de camundongo jovem, seta indica córtex. Nota-se a evidente diferença. **C** corte coronal de cérebro de camundongo senil, seta indica córtex. **D** corte coronal de cérebro de camundongo jovem, seta indica córtex.

Nota-se que a expressão de ST11, no camundongo jovem, é evidentemente periférica, havendo poucos e pequenos focos de maior concentração na estrutura. O córtex é uma estrutura de alta atividade funcional, este fato é considerado quando se trata de stress, e esta estrutura é muito susceptível.

Estes resultados corroboram com os resultados de Western Blotting sugerindo que há uma menor expressão nas estruturas cerebrais dos camundongos senis, quando comparados aos jovens, como já havia sido discutido anteriormente.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos a análise comparativa de STI1 entre indivíduos jovens e velhos demonstrou-se que há uma diferença significativa na concentração e distribuição de STI1 no cérebro e nas suas estruturas: Hipotálamo e Córtex de camundongos e Hipotálamo, Hipocampo e Córtex de humanos.

Esta diminuição pode ser causa ou conseqüência dos efeitos do stress oxidativo sofridos pelo indivíduo ao longo da vida, uma vez que em modelo empregando células SH-SY5Y há uma correlação inversa entre o stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e a expressão de STI1.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS-TERKI T, BRIAND PA, DONZE O, PICARD D. The Hsp90 co-chaperones Cdc37 and Sti1 interact physically and genetically. **Biol Chem**. 2002 Sep;383(9):1335-42.
- BLATCH GL, LASSLE M, ZETTER BR, KUNDRA V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**. 1997 Jul 31;194(2):277-82.
- BOBULA J, TOMALA K, JEZ E, WLOCH DM, BORTS RH, KORONA R. Why molecular chaperones buffer mutational damage: a case study with a yeast Hsp40/70 system. **Genetics**. 2006 Oct;174(2):937-44. Epub 2006 Jul 18.
- BRANDEN C AND TOOZE J. **Introduction to protein structure**. Garland 1999
- BUTTERFIELD DA, ABDUL HM, NEWMAN S, REED T. Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. **NeuroRx**. 2006 Jul;3(3):344-57. Review.
- BUTTERFIELD DA, PERLUIGI M, SULTANA R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. **Eur J Pharmacol**. 2006 Sep 1;545(1):39-50. Epub 2006 Jun 15. Review.
- BUTTERFIELD DA. Oxidative stress in neurodegenerative disorders. **Antioxid Redox Signal**. 2006 Nov-Dec;8(11-12):1971-3. Review.
- CAPLAN AJ. What is a co-chaperone? **Cell Stress Chaperones**. 2003 Summer;8(2):105-7.
- CARRELLO A, INGLE Y E, MINCHIN RF, TSAI S, RATAJCZAK T. The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90. **J Biol Chem**. 1999 Jan 29;274(5):2682-9.
- CARRIGAN PE, NELSON GM, ROBERTS PJ, STOFFER J, RIGGS DL, SMITH DF. Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. **J Biol Chem**. 2004 Apr 16;279(16):16185-93. Epub 2004 Feb 11.
- CASTILLA J, SAA P, MORALES R, ABID K, MAUNDRELL K, SOTO C. Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. **Methods Enzymol**. 2006;412:3-21. Review.
- CHANG CC, SU YC, CHENG MS, KAN LS. Protein folding by a quasi-static-like process: a first-order state transition. **Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys**. 2002 Aug;66(2 Pt 1):021903. Epub 2002 Aug 9

- CHANG HC, LINDQUIST S. Conservation of Hsp90 macromolecular complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**. 1994 Oct 7;269(40):24983-8.
- CHANG HC, NATHAN DF, LINDQUIST S. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). **Mol Cell Biol**. 1997 Jan;17(1):318-25.
- CHEVION M, BERENSHTEIN E, STADTMAN ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. **Free Radic Res**. 2000 Nov;33 Suppl:S99-108. Review.
- CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.O.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals, **EMBO J**, v.21, p.3317-3326, 2002.
- DOLINSKI KJ, CARDENAS ME, HEITMAN J. CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. **Mol Cell Biol**. 1998 Dec;18(12):7344-52.
- ESTRUCH F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiol Rev**. 2000 Oct;24(4):469-86. Review.
- FASANO C, CAMPANA V, ZURZOLO C. Prions: protein only or something more? Overview of potential prion cofactors. **J Mol Neurosci**. 2006;29(3):195-214. Review.
- FENTON WA, HORWICH AL. GroEL-mediated protein folding. **Protein Sci**. 1997 Apr;6(4):743-60. Review.
- FLOM G, WEEKES J, WILLIAMS JJ, JOHNSON JL. Effect of mutation of the tetratricopeptide repeat and asparatate-proline 2 domains of Sti1 on Hsp90 signaling and interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. 2006 Jan;172(1):41-51. Epub 2005 Oct 11.
- FLOYD RA, HENSLEY K, BING G. Evidence for enhanced neuro-inflammatory processes in neurodegenerative diseases and the action of nitrones as potential therapeutics. **J Neural Transm Suppl**. 2000;(60):387-414. Review.
- FLOYD RA, HENSLEY K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiol Aging**. 2002 Sep-Oct;23(5):795-807. Review.
- FREEMAN BC, YAMAMOTO KR. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. **Science**. 2002 Jun 21;296(5576):2232-5.
- FRYDMAN J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annu Rev Biochem**. 2001;70:603-47. Review.

- GAJDUSEK DC, ZIGAS V. Kuru; clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea. **Am J Med.** 1959 Mar;26(3):442-69.
- GASCH AP, SPELLMAN PT, KAO CM, CARMEL-HAREL O, EISEN MB, STORZ G, BOTSTEIN D, BROWN PO. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol Biol Cell.** 2000 Dec;11(12):4241-57.
- GILGUN-SHERKI Y, MELAMED E, OFFEN D. Anti-inflammatory drugs in the treatment of neurodegenerative diseases: current state. **Curr Pharm Des.** 006;12(27):3509-19. Review.
- GILGUN-SHERKI Y, MELAMED E, OFFEN D. Antioxidant treatment in Alzheimer's disease: current state. **J Mol Neurosci.** 2003;21(1):1-11. Review.
- GILGUN-SHERKI Y, MELAMED E, OFFEN D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology.** 2001 Jun;40(8):959-75. Review.
- GOLDING I, COX EC Protein synthesis molecule by molecule. **Genome Biol** (Genome biology). Volume: 7 Edição: 6 Páginas: 221 Data: 2006
- HARA T, KAMURA T, KOTOSHIBA S, TAKAHASHI H, FUJIWARA K, ONOYAMA I, SHIRAKAWA M, MIZUSHIMA N, NAKAYAMA KI. Role of the UBL-UBA protein KPC2 in degradation of p27 at G1 phase of the cell cycle. **Mol Cell Biol.** 2005 Nov;25(21):9292-303.
- HAZRA TK, DAS A, DAS S, CHOUDHURY S, KOW YW, ROY R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective. **DNA Repair (Amst).** 2006 Nov 18;
- HEINE H, DELUDE RL, MONKS BG, ESPEVIK T, GOLENBOCK DT. Bacterial lipopolysaccharide induces expression of the stress response genes hop and H411. **J Biol Chem.** 1999 Jul 23;274(30):21049-55.
- HENDERSON B, NAIR SP, COATES AR. Molecular chaperones and disease. **Inflamm Res.** 1996 Apr;45(4):155-8. Review.
- HENDRICK JP, HARTL FU The role of molecular chaperones in protein folding. **FASEB J.** 1995 Dec;9(15):1559-69. Review.

- HENSLEY K, FLOYD RA. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. **Arch Biochem Biophys**. 2002 Jan 15;397(2):377-83. Review.
- HENSLEY K, ROBINSON KA, GABBITA SP, SALSMAN S, FLOYD RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic Biol Med**. 2000 May 15;28(10):1456-62. Review.
- HONORE B, LEFFERS H, MADSEN P, RASMUSSEN HH, VANDEKERCKHOVE J, CELIS JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J Biol Chem**. 1992 Apr 25;267(12):8485-91.
- HUMPHRIES KM, SZWEDA PA, SZWEDA LI. Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage. **Free Radic Res**. 2006 Dec;40(12):1239-43. Review.
- JOHNSON BD, SCHUMACHER RJ, ROSS ED, TOFT DO. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. **J Biol Chem**. 1998 Feb 6;273(6):3679-86.
- KAYE FJ, MODI S, IVANOVSKA I, KOONIN EV, THRESS K, KUBO A, KORNBLUTH S, ROSE MD. A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. **FEBS Lett**. 2000 Feb 11;467(2-3):348-55.
- KIM HP, MORSE D, CHOI AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. **Expert Opin Ther Targets**. 2006 Oct;10(5):759-69. Review.
- KIM PS, ARVAN P. Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. **Endocr Rev**. 1998 Apr;19(2):173-202. Review.
- KOHEN R, NYSKA A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**. 2002 Nov-Dec;30(6):620-50. Review.
- KORNITZER D, CIECHANOVER A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. **J Cell Physiol**. 2000 Jan;182(1):1-11. Review.
- LANGER T, LU C, ECHOLS H, FLANAGAN J, HAYER MK, HARTL FU. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. **Nature**. 1992 Apr 23;356(6371):683-9.
- LASSLE M, BLATCH GL, KUNDRA V, TAKATORI T, ZETTER BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J Biol Chem**. 1997 Jan 17;272(3):1876-84.

- LEE P, SHABBIR A, CARDOZO C, CAPLAN AJ. Sti1 and Cdc37 can stabilize Hsp90 in chaperone complexes with a protein kinase. **Mol Biol Cell**. 2004 Apr;15(4):1785-92. Epub 2004 Jan 23.
- LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG, AHN BW, SHALTIEL S, STADTMAN ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**. 1990;186:464-78.
- LONGSHAW VM, CHAPPLE JP, BALDA MS, CHEETHAM ME, BLATCH GL. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. **J Cell Sci**. 2004 Feb 15;117(Pt 5):701-10.
- LONGSHAW VM, DIRR HW, BLATCH GL, LASSLE M. The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif. **Biol Chem**. 2000 Nov;381(11):1133-8.
- LOPES MH, HAJJ GN, MURAS AG, MANCINI GL, CASTRO RM, RIBEIRO KC, BRENTANI RR, LINDEN R, MARTINS VR. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci**. 2005 Dec 7;25(49):11330-9.
- MANSON JC, CANCELLOTTI E, HART P, BISHOP MT, BARRON RM. The transmissible spongiform encephalopathies: emerging and declining epidemics. **Biochem Soc Trans**. 2006 Dec;34(Pt 6):1155-8. Review.
- MORAN DS, ELI-BERCHOER L, HELED Y, MENDEL L, SCHOCINA M, HOROWITZ M. Heat intolerance: does gene transcription contribute? **J Appl Physiol**. 2006 Apr;100(4):1370-6. Epub 2005 Dec 15.
- MORISHIMA Y, KANELAKIS KC, SILVERSTEIN AM, DITTMAR KD, ESTRADA L, PRATT WB. The Hsp organizer protein hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system. **J Biol Chem**. 2000 Mar 10;275(10):6894-900.
- NETZER WJ, HARTL FU. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. **Trends Biochem Sci**. 1998 Feb;23(2):68-73. Review.
- NICOLET CM, CRAIG EA. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**. 1989 Sep;9(9):3638-46.
- ODUNUGA OO, LONGSHAW VM, BLATCH GL. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays**. 2004 Oct;26(10):1058-68. Review.
- PEARL LH, PRODROMOU C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu Rev Biochem**. 2006;75:271-94. Review.

- PRODROMOU C, PEARL LH. Structure and functional relationships of Hsp90. **Curr Cancer Drug Targets**. 2003 Oct;3(5):301-23. Review.
- PRODROMOU C, SILIGARDI G, O'BRIEN R, WOOLFSON DN, REGAN L, PANARETOU B, LADBURY JE, PIPER PW, PEARL LH. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. **EMBO J**. 1999 Feb 1;18(3):754-62.
- PRUSINER SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1998 Nov 10;95(23):13363-83. Review.
- PURVES D et al., **Neuroscience**. 3rd ed. England: Sinauer Associates; 2004
- RONGA L, TIZZANO B, PALLADINO P, RAGONE R, URSO E, MAFFIA M, RUVO M, BENEDETTI E, ROSSI F. The prion protein: Structural features and related toxic peptides. **Chem Biol Drug Des**. 2006 Sep;68(3):139-47. Review.
- RONGA L, TIZZANO B, PALLADINO P, RAGONE R, URSO E, MAFFIA M, RUVO M, BENEDETTI E, ROSSI F. The prion protein: Structural features and related toxic peptides. **Chem Biol Drug Des**. 2006 Sep;68(3):139-47. Review.
- RUTHERFORD SL, ZUKER CS Protein folding and the regulation of signaling pathways. **Cell**. 79(7): 1129-32 1994 Dec 30
- SAKUDO A, LEE DC, LI S, NAKAMURA T, MATSUMOTO Y, SAEKI K, ITOHARA S, IKUTA K, ONODERA T. PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochem Biophys Res Commun**. 2005 Mar 4;328(1):14-9.
- SANGSTER TA, LINDQUIST S, QUEITSCH C. Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. **Bioessays**. 2004 Apr;26(4):348-62. Review.
- SCHUMACHER RJ, HURST R, SULLIVAN WP, MCMAHON NJ, TOFT DO, MATTS RL. ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. **J Biol Chem**. 1994 Apr 1;269(13):9493-9.
- SHACTER E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metab Rev**. 2000 Aug-Nov;32(3-4):307-26. Review.
- SILIGARDI G, HU B, PANARETOU B, PIPER PW, PEARL LH, PRODROMOU C. Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. **J Biol Chem**. 2004 Dec 10;279(50):51989-98. Epub 2004 Oct 2.

- SILIGARDI G, HU B, PANARETOU B, PIPER PW, PEARL LH, PRODROMOU C. Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. **J Biol Chem**. 2004 Dec 10;279(50):51989-98. Epub 2004 Oct 2.
- SONG Y, MASISON DC. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). **Biol Chem**. 2005 Oct 7;280(40):34178-85. Epub 2005 Aug 12.
- STADTMAN ER, LEVINE RL. Why have cells selected reactive oxygen species to regulate cell signaling events? **Hum Exp Toxicol**. 2002 Feb;21(2):83.
- STADTMAN ER, MOSKOVITZ J, BERLETT BS, LEVINE RL. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. **Mol Cell Biochem**. 2002 May-Jun;234-235(1-2):3-9. Review.
- STADTMAN ER, MOSKOVITZ J, LEVINE RL. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. **Antioxid Redox Signal**. 2003 Oct;5(5):577-82. Review.
- TERMAN A, BRUNK UT. Aging as a catabolic malfunction. **Int J Biochem Cell Biol**. 2004 Dec;36(12):2365-75. Review.
- TERMAN A, BRUNK UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. **Cardiovasc Res**. 2005 Dec 1;68(3):355-65. Epub 2005 Oct 6. Review.
- TERMAN A, BRUNK UT. Is aging the price for memory? **Biogerontology**. 2005;6(3):205-10. Review.
- TERMAN A, BRUNK UT. Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. **Antioxid Redox Signal**. 2006 Jan-Feb;8(1-2):197-204. Review.
- TERMAN A, BRUNK UT. The aging myocardium: roles of mitochondrial damage and lysosomal degradation. **Heart Lung Circ**. 2005 Jun;14(2):107-14. Review.
- VAN DER SPUY J, CHEETHAM ME, DIRR HW, BLATCH GL. The cochaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. **Protein Expr Purif**. 2001 Apr;21(3):462-9.
- WEGELE H, HASLBECK M, REINSTEIN J, BUCHNER J. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. **J Biol Chem**. 2003 Jul 11;278(28):25970-6. Epub 2003 Apr 25.
- MAIER PK. **Wolf-Heidegger's Atlas of Human Anatomy**. 1<sup>st</sup> ed. Alemanha: Hardcover; 1998.

- YON JM. Protein folding: concepts and perspectives. **Cell Mol Life Sci.** 1997 Jul;53(7):557-67. Review.
- ZANATA SM, LOPES MH, MERCADANTE AF, HAJJ GN, CHIARINI LB, NOMIZO R, FREITAS AR, CABRAL AL, LEE KS, JULIANO MA, DE OLIVEIRA E, JACHIERI SG, BURLINGAME A, HUANG L, LINDEN R, BRENTANI RR, MARTINS VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J.** 2002 Jul 1;21(13):3307-16.
- ZHANG M, WINDHEIM M, ROE SM, PEGGIE M, COHEN P, PRODROMOU C, PEARL LH. Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. **Mol Cell.** 2005 Nov 23;20(4):525-38.
- ZHANG X, BEURON F, FREEMONT PS. Machinery of protein folding and unfolding. **Curr Opin Struct Biol.** 2002 Apr;12(2):231-8. Review.
- ZHANG Y, OHASHI N, LEE EH, TAMURA A, RIKIHISA Y. Ehrlichia sennetsu groE operon and antigenic properties of the GroEL homolog. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 1997 May;18(1):39-46.