



## Efeito do $\beta$ -hidroxi $\beta$ -metilbutirato (HMB) sobre a proteína Parkin em diferentes tecidos

Ana Laura Vieira da Silva, Igor Luchini Baptista, Gustavo Palmeira dos Santos e Marcos Vinícius Esteca

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA), Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LabCeT)

### Resumo

O  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) é um metabólito da leucina com efeito anabólico proteico que tem sido apontado como possível modulador da via ubiquitina-proteassoma nos diferentes tecidos corpóreos. O objetivo do projeto foi analisar o efeito da suplementação com HMB sobre a expressão da proteína Parkin, uma ubiquitina E3 ligase ponto chave da mitofagia. Camundongos C57BL/6J receberam, via oral (via gavagem), 600mg/kg/dia de Hidrato de Cálcio 3-hidroxi-3-metilbutirato dissolvido em água durante três dias. A suplementação foi capaz de elevar o conteúdo proteico de Parkin no coração, cérebro e fígado. Entretanto, no fígado, esse aumento se deu no núcleo dos hepatócitos, demonstrando que a proteína não está realizando atividade de E3 ligase nesse tecido. Ademais, a suplementação causou também a modulação de outras proteínas mitocondriais associadas a mitofagia de forma dependente do tipo celular. Portanto, os resultados do presente projeto apontam o HMB como um meio pelo qual seria possível modular o conteúdo proteico de Parkin e de outras proteínas mitocondriais por meio da ingestão.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -hidroxi  $\beta$ -metilbutirato, Parkin, mitofagia.

### Introdução

As mitocôndrias são estruturas essenciais para a manutenção da vida, pois atuam como “centrais elétricas” celulares<sup>[1]</sup> ao associarem redução de oxigênio e transporte de elétrons através de sua membrana mitocondrial para produzir energia na forma de ATP<sup>[2]</sup>. Contudo, também são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs) como subproduto da produção de energia<sup>[1]</sup>.

Os EROs são um grupo de radicais hiperativos (livres) de curta duração altamente reativos, os quais possuem capacidade de interagir quimicamente com componentes celulares. Dessa forma, principalmente quando as mitocôndrias se encontram disfuncionais, os EROs são gerados em excesso, acumulando-se e produzindo um estado de estresse oxidativo. Esse estado pode danificar, tanto a própria mitocôndria, quanto outros componentes celulares<sup>[1]</sup>, além de levarem à neurodegeneração e à morte celular neuronal (apoptose)<sup>[3]</sup>.

Por isso, como meio de reduzir os danos provocados pelo acúmulo de EROs e manter a qualidade mitocondrial, o organismo possui a mitofagia, uma forma seletiva de autofagia, como via responsável por eliminar mitocôndrias danificadas ou não funcionais<sup>[4]</sup>. Nesse processo, destaca-se a proteína Parkin, uma ubiquitina E3 ligase que, ao ser recrutada para a membrana mitocondrial externa, ubiquitina proteínas específicas presentes nesse local e garante

especificidade para o substrato o qual será alvo da via de degradação ubiquitina-proteassoma<sup>[5]</sup>.

Nesse sentido, estudos têm apontado o  $\beta$ -hidroxi  $\beta$ -metilbutirato (HMB), um dos metabólitos do aminoácido leucina, como possível modulador da via ubiquitina-proteassoma nos diferentes tecidos corporais<sup>[6]</sup>. No entanto, ainda é desconhecido o real efeito do HMB sobre as vias mitofágicas e, principalmente, sobre a expressão de Parkin.

Por isso, o presente projeto buscou, portanto, analisar o efeito da suplementação com HMB sobre a expressão da proteína Parkin nos diferentes tecidos corporais.

### Materiais e Métodos

Foram utilizados camundongos selvagens C57BL/6J machos com 10 a 12 semanas de idade e peso de 20 a 26 gramas distribuídos em dois grupos: grupo controle (CTRL, n=3) e grupo suplementação (HMB, n=3). Ambos foram submetidos à gavagem objetivando igualar os níveis de manipulação e estresse entre os grupos. Nesse sentido, o grupo controle recebeu água clorada, enquanto o grupo suplementado recebeu 300 $\mu$ L de solução de Hidrato de Cálcio 3-hidroxi-3-metilbutirato, 97% (Alfa Aesar®) dissolvido em água potável clorada na concentração de 600 mg/kg de peso corporal ao dia<sup>[7]</sup>.

A suplementação durou três dias e, decorrido esse tempo, os animais foram eutanasiados por overdose de

anestésico via intraperitoneal (240mg/kg de cetamina e 30mg/kg de xilazina). Coletou-se o cérebro, o coração e o fígado, tecidos os quais foram estudados por meio das técnicas de Western Blotting, Coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) e Imunofluorescência.

## Resultados

*A suplementação com HMB não produziu alterações morfológicas no coração e fígado de camundongos.* Por meio da Coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) foi possível comparar as preservações histológicas do grupo controle com as do grupo suplementado, a partir da qual percebeu-se a manutenção das características específicas tanto do tecido cardíaco quanto do hepático. Portanto, conclui-se que a suplementação de três dias com HMB em animais selvagens não induziu modificações na morfologia celular (fig. 1).

*A suplementação com HMB promoveu aumento do conteúdo proteico de Parkin no cérebro, coração e fígado de camundongos.* Os resultados de Western Blotting demonstram que ocorreu um aumento do conteúdo de Parkin nos três tecidos estudados após a suplementação com HMB. Entretanto, em comparação, apenas no fígado o suplemento pareceu exercer uma influência mais significativa sobre a quantidade de Parkin, visto que nos demais tecidos o incremento não aconteceu de forma estatística (fig. 2). Nesse sentido, o fato de o fígado constituir o principal local de produção e metabolização do HMB poderia justificar os maiores efeitos observados nesse local em comparação aos demais. Apesar disso, tal resultado parece indicar o HMB como um meio através do qual seria possível modular a expressão de Parkin nos tecidos a partir da ingestão.

*O aumento de Parkin no fígado não está atrelado a mitofagia.* Através da aplicação a técnica de Imunofluorescência foi possível assegurar que, após a suplementação, ocorreu o aumento do conteúdo proteico de Parkin, visível pelo acréscimo da marcação (fig. 3A). No entanto, pode-se perceber também que esse incremento se deu, principalmente, no núcleo do hepatócito ao invés de se colocalizar com VDAC2, observação que foi confirmada por meio da execução do método de análise estatística de distância de objetos (SODA)<sup>[8]</sup> (fig. 3B). Assim, a ausência de colocalização de Parkin com VDAC2 sugere que, no fígado, essa proteína não está envolvida com a via de mitofagia. Portanto, propomos que, ao permanecer no núcleo do

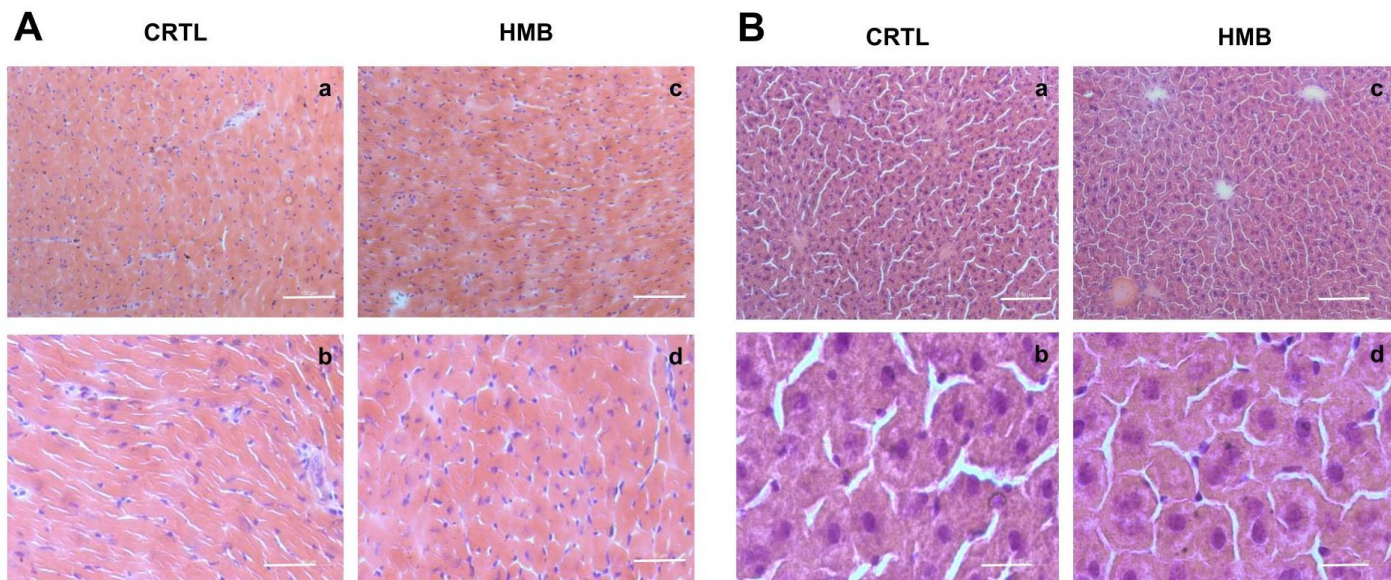
hepatócito, Parkin exerce outras funções que não de ubiquitina E3 ligase, tal como fator de transcrição para genes.

*O aumento de Parkin foi acompanhado pela modulação de proteínas mitocondriais.* Ainda se utilizando da técnica de Western Blotting, foi possível analisar a quantidade total das demais proteínas associadas a mitofagia. Dessa forma, em ambos os tecidos, pode-se observar que o aumento de Parkin foi acompanhado, concomitantemente, pela elevação de proteínas mitocondriais (fig. 4, 5 e 6). Tais resultados, mesmo não sendo estatísticos, são importantes porque ajudam a compreender os efeitos do HMB sobre a via, demonstrando que a modulação não se restringe apenas a proteína Parkin e que o suplemento pode constituir um importante meio pelo qual modular também as proteínas mitocondriais através da ingestão. Ademais, esses resultados auxiliam na elucidação dos efeitos do HMB no organismo, os quais aconteceram de forma dependente do tipo celular visto que os diferentes tecidos analisados distinguiram entre si com relação a expressão de algumas proteínas, inclusive de Parkin.

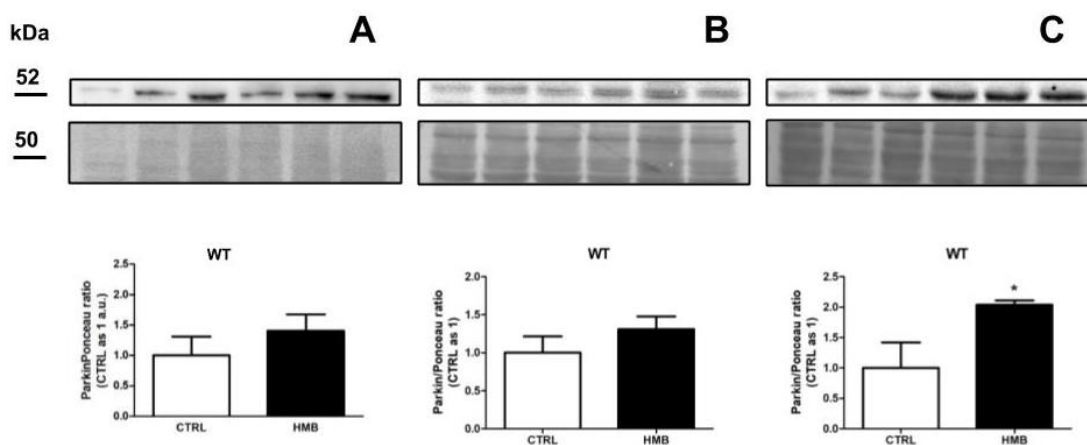
## DISCUSSÃO

Sabe-se que o HMB pode atuar na regulação metabólica da síntese proteica ao promover a ativação de hormônios e vias anabólicas. Nesse sentido, estudos indicam que, ao regular positivamente o eixo somatotrópico, o HMB estimula a síntese e a secreção do hormônio do crescimento (GH), o qual atua sobre o tecido hepático aumentando, nesse local, a expressão de mRNA e concentração sérica do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1)<sup>[9]</sup>. Esse mecanismo também é descrito em outros tecidos, como o cérebro. Contudo, apesar de existir relação entre o suplemento e o eixo GH/IGF-1, ainda é desconhecido como tal estimulação poderia induzir o incremento de Parkin (fig. 2) e nossos resultados não são suficientes para elucidar esse mecanismo. Nesse sentido, sugerimos que IGF-1 possui mediadores em sua cascata de sinalização os quais se correlacionam com a via mitofágica, tais como PGC-1 $\beta$ , PRC e BNIP3<sup>[10]</sup>, os quais, de alguma forma, poderiam induzir o aumento de Parkin.

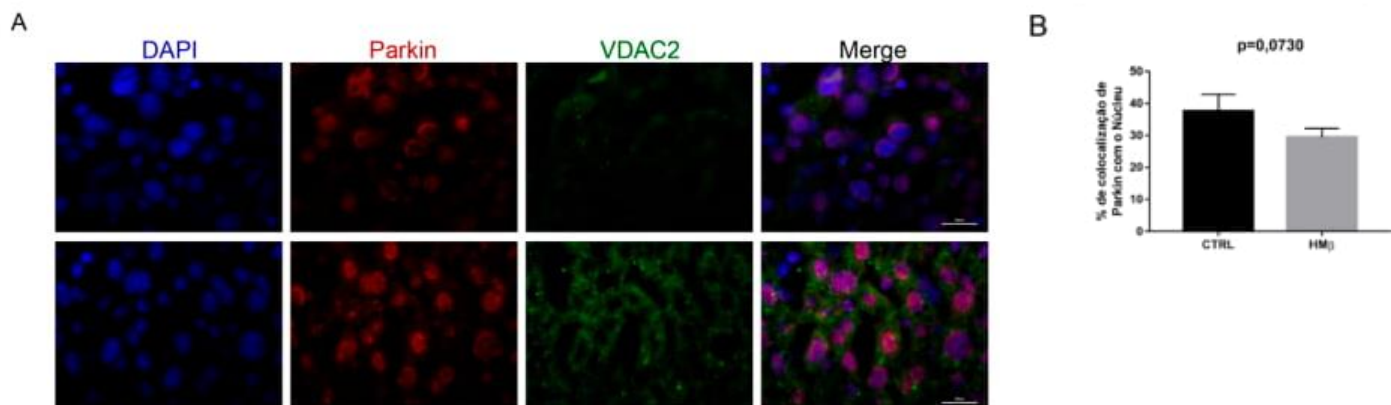
Ademais, a ativação da sinalização de IGF-1 poderia levar à elevação observada, não apenas de Parkin, mas também das proteínas mitocondriais analisadas (fig. 4, 5 e 6). Por isso, mais estudos são necessários a fim de compreender plenamente como o HMB atua e quais resultados poderiam ser atribuídos à sua atividade no organismo, visto que outra hipótese poderia justificar tais observações.



**Figura 1.** Análise histológica realizada por meio de coloração Hematoxilina-Eosina. **(A)** Manutenção das características morfológicas dos cardiomiócitos após três dias de suplementação. (a) Corte cardíaco do grupo controle com aumento de 100µm; (b) Corte cardíaco do grupo controle com aumento de 50µm; (c) Corte cardíaco do grupo suplementado com aumento de 100µm; (d) Corte cardíaco do grupo suplementado com aumento de 50µm. **(B)** Manutenção das características morfológicas dos hepatócitos após três dias de suplementação. (a) Corte hepático do grupo controle com aumento de 100µm; (b) Corte hepático do grupo controle com aumento de 20µm; (c) Corte hepático do grupo suplementado com aumento de 100µm; (d) Corte hepático do grupo suplementado com aumento de 20µm.



**Figura 2.** **(A)** Western Blotting representativo do efeito do HMB sobre a quantidade total da proteína Parkin no cérebro de animais controle e suplementados (n = 3 camundongos por grupo). **(B)** Western Blotting representativo do efeito do HMB sobre a quantidade total da proteína Parkin no coração de animais controle e suplementados (n = 3 camundongos por grupo). **(C)** Western Blotting representativo do efeito do HMB sobre a quantidade total da proteína Parkin no fígado de animais controle e suplementados (n = 3 camundongos por grupo; \*p<0,05 significativamente diferente entre o grupo CTRL e o grupo HMB).



**Figura 3.** **(A)** Imunofluorescência de fígado demonstrando o aumento de Parkin e de VDAC2 após três dias de suplementação com HMB (n = 3 camundongos por grupo). **(B)** Colocalização entre Parkin e o núcleo em hepatócitos de camundongos após três dias de suplementação com HMB (n = 3 imagens por grupo).

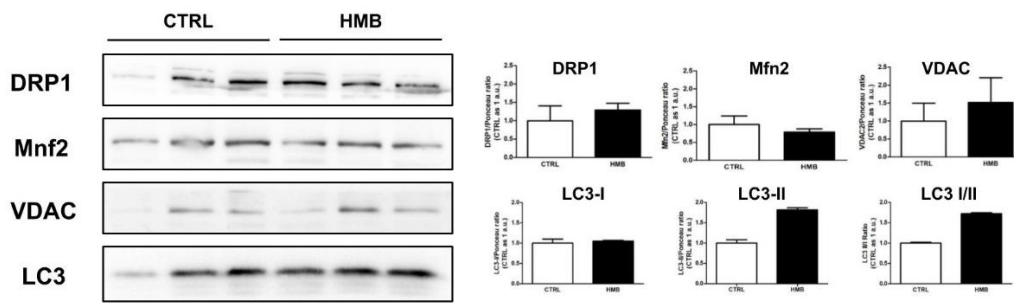


Figura 4. Western Blotting demonstrativo do aumento do conteúdo proteico de DRP1, Mfn2, VDAC2 e LC3 no tecido cerebral.

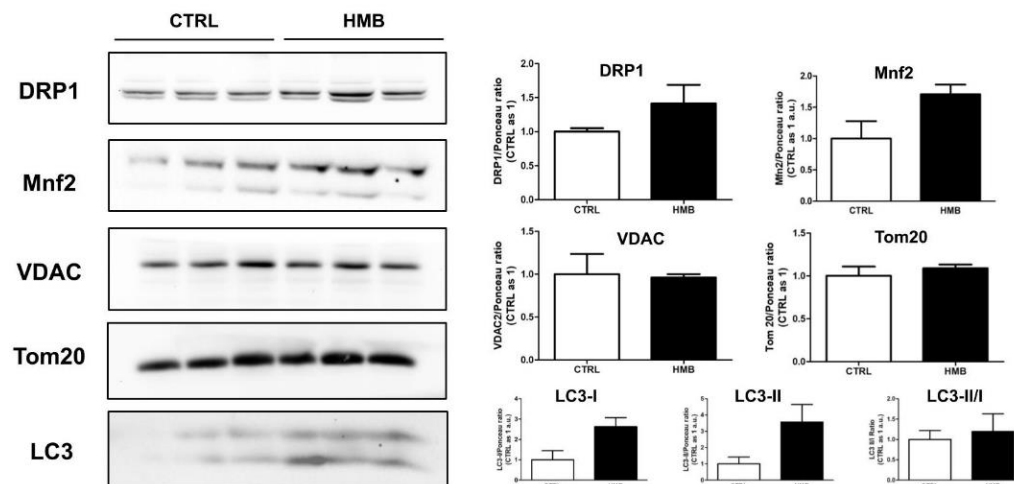


Figura 5. Western Blotting demonstrativo do aumento do conteúdo proteico de DRP1, mitofusina 2, VDAC2, Tom20 e LC3 no tecido cardíaco.

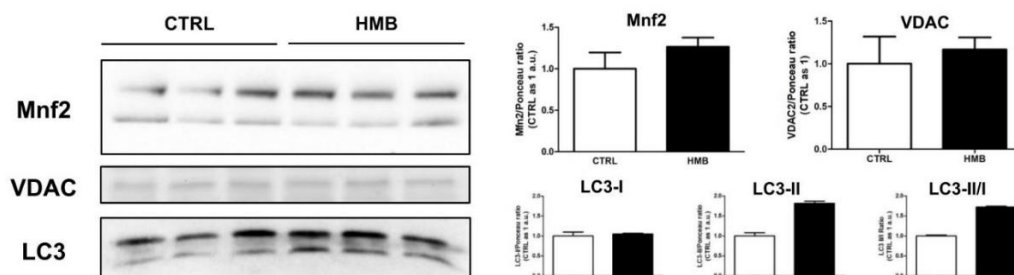


Figura 6. Western Blotting demonstrativo do aumento do conteúdo proteico de mitofusina 2, VDAC2 e LC3 no tecido hepático.

Assim, analisamos a proteína 2 do canal seletivo de ânion-dependente de voltagem (VDAC2), a qual interage especificamente com Parkin durante a mitofagia ao atuar como local de ancoragem mitocondrial para essa proteína<sup>[11]</sup>. Dessa forma, devido a essa associação, era esperado que ambas estivessem colocalizadas no hepatócito, sinalizando que a mitofagia estaria ocorrendo nesse tecido. No entanto, contrariando nossa hipótese, os resultados demonstraram que Parkin se colocaliza com o núcleo (fig. 3), fato que constitui um forte indicativo de que ela não está exercendo função de ubiquitina E3 ligase no fígado. A partir disso, acreditamos que essa proteína seja capaz de desempenhar

diversos papéis celulares, inclusive, como fator de transcrição para genes.

Nesse sentido, estudos que buscaram identificar alvos da atividade de Parkin como fator de transcrição demonstraram que esse codifica proteínas mitocondriais e, portanto, exerce um papel fundamental tanto na transcrição quanto na fisiologia mitocondrial das células, podendo atuar indiretamente na mitofagia. Assim, dentre os potenciais alvos da transcrição gênica medida por Parkin destaca-se mitofusina 1 (Mfn1), mitofusina 2 (Mfn2) e VDAC<sup>[12]</sup>, proteínas as quais constituem substratos da atividade de ubiquitina E3 ligase, relação essa já elucidada e validada pela literatura.

Tendo isso em vista, o fato de VDAC2 e Mfn2 constituírem potenciais alvos da atuação de Parkin como fator de transcrição poderia justificar o aumento verificado no conteúdo dessas proteínas após a suplementação, ou seja, a maior quantidade de Parkin pode ter oferecido mais estímulo transcricional, consequentemente, culminado no incremento observado de VDAC2 e Mfn2 (fig. 4, 5 e 6).

Essa mesma hipótese parece se aplicar à proteína do tipo dinamina-1 (DRP1), a qual teve o seu conteúdo proteico aumentado no fígado e no cérebro (fig. 4 e 6), sugerindo que o maior conteúdo de Parkin serviu como estímulo transcricional para essa proteína. Além disso, possuímos o indicativo de que o fluxo autofágico pode estar acelerado e, por isso, o processo de fissão mitocondrial induzido por DRP1 pode ter sido ativado como um pré-requisito para a mitofagia.

Com relação a isso, analisando a proteína associada a microtúbulos 1A/1B da cadeia leve 3 (LC3) por meio do Western Blotting, percebemos que houve um incremento da sua fração II nos três tecidos estudados (fig. 4, 5 e 6). Tal observação sinaliza que ocorreu um aumento na quantidade de autofagossomos, os quais são responsáveis por realizar a degradação do conteúdo citosólico e das mitocôndrias danificas<sup>[13]</sup>. Logo, acreditamos que o fluxo de autofagia possa estar acelerado após a suplementação com HMB.

Assim, apesar da dualidade existente com relação ao papel que Parkin desempenha, mesmo atuando como fator de transcrição ela parece se associar à mitofagia, visto que parece ser capaz de codificar proteínas mitocondriais. Todavia, vale ressaltar que LC3 e DRP1 possuem relação com a atividade de E3 ligase de Parkin já elucidadas pela literatura, mas ainda não se sabe se também podem ser apontados como alvos de transcrição da mesma forma que Mfn2 e VDAC. Dessa forma, mais estudos são necessários a fim de se compreender plenamente o papel desempenhado por Parkin no núcleo celular como fator de transcrição para confirmar se a modulação das proteínas mitocondriais observada ocorreu em resposta a essa atuação ou se foi devido a ação do HMB no organismo e a estimulação do eixo somatotrópico realizada por esse.

Portanto, o presente projeto evidenciou o amplo papel de Parkin na dinâmica mitocondrial, corroborando com a literatura ao ressaltar sua atuação como fator de transcrição para genes mitocondriais. Ademais, nossos resultados podem auxiliar na elucidação dos efeitos do HMB nos diferentes tecidos, os quais ocorrem de forma dependente do tipo celular. Contudo, não fomos capazes de determinar qual mecanismo desencadeado pelo HMB é responsável por

e elevar o conteúdo mitocondrial de Parkin, ressaltando a necessidade de mais estudos objetivando compreender todos os efeitos e mecanismos de ação do suplemento, sendo que a determinação do papel desempenhado por Parkin no núcleo celular poderia contribuir para tal. Todavia, podemos concluir que a suplementação com HMB constitui uma forma de modular via ingestão, não apenas o conteúdo proteico de Parkin, mas também de outras proteínas mitocondriais relacionadas à mitofagia, independentemente de esse mecanismo acontecer via transcrição gênica mediada por Parkin ou por atuação direta do HMB.

## Referências

- [1] BANKAPALLI, Kondalarao *et al.* **Redox-dependent regulation of mitochondrial dynamics by DJ-1 paralogs in *Saccharomyces cerevisiae*.** 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7026286>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [2] NERENDRA, Derek P *et al.* **Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control.** 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21194381/>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [3] YEUNG, Andy Wai Kan *et al.* **Reactive Oxygen Species and Their Impact in Neurodegenerative Diseases: Literature Landscape Analysis.** 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32030995/>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [4] GU, Jian *et al.* **PINK1 Activation and Translocation to Mitochondria-Associated Membranes Mediates Mitophagy and Protects Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury.** 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32195921>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [5] WHITWORTH, Alexander J *et al.* **Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease.** 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15911761/>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [6] HOLECEK, M *et al.* **Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues.** 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056452>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [7] BAPTISTA, Igor Luchini *et al.* **Leucine and HMB differentially modulate proteasome system in skeletal muscle under different sarcopenic conditions.** 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124592/>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- [8] LAGACHE, Thibault *et al.* **Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics.** 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-03053-x>. Acesso em: 19 set. 2020.
- [9] GERLINGER-ROMERO, F. *et al.* **Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats.** 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21237681/>. Acesso em: 6 ago. 2020.
- [10] LYONS, Amy *et al.* **Insulin-like growth factor 1 signaling is essential for mitochondrial biogenesis and mitophagy in cancer cells.** 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28821609/>. Acesso em: 27 ago. 2020.
- [11] SUN, Yu *et al.* **Voltage-dependent Anion Channels (VDACs) Recruit Parkin to Defective Mitochondria to Promote Mitochondrial Autophagy.** 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504778/>. Acesso em: 27 ago. 2020.
- [12] COSTA, Cristiane Alves da *et al.* **The Transcription Factor Function of Parkin: Breaking the Dogma.** 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00965/full>. Acesso em: 20 set. 2020.
- [13] CHOE, Sehyo Charley *et al.* **Autophagy capacity and sub-mitochondrial heterogeneity shape Bnip3-induced mitophagy regulation of apoptosis.** 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4528699/>. Acesso em: 2 set. 2020.