



Busca de reguladores transcricionais da função mitocondrial por plataforma de ensaios de bioenergética e silenciamento gênico

Introdução e justificativa:

Atualmente, cerca de 1,9 bilhões de pessoas no mundo apresentam sobrepeso ou obesidade, segundo dados da OMS, e apesar de se conseguir controlar parte destes casos com reeducação alimentar e atividades físicas, a prevalência continua subindo, isso evidencia que o controle farmacológico em combinação com a mudança de hábitos pode contribuir com a redução da obesidade e suas comorbidades. Com função de produzir energia através da oxidação de substratos, a mitocôndria tem papel central no aparecimento destes quadros e no seu agravamento, e fármacos que melhoram sua função, como os ativadores de PPAR γ , já são utilizados na clínica. PPAR γ faz parte de uma rede de fatores de transcrição que regulam a função e a biogênese mitocondrial, juntamente com corre reguladores como PGC1- α e NCoR1, através da modulação da expressão de genes de mitocondriais codificadas no genoma nuclear. Tendo em vista que novos reguladores transcricionais tem potencial para se tornarem alvos terapêuticos e que um conjunto coeso de ensaios para identificação de novos agentes que melhorem a função mitocondrial é central para a descoberta destes alvos, propomos neste projeto a construção de uma plataforma de ensaios para este fim e a prospecção de reguladores utilizando estes ensaios.

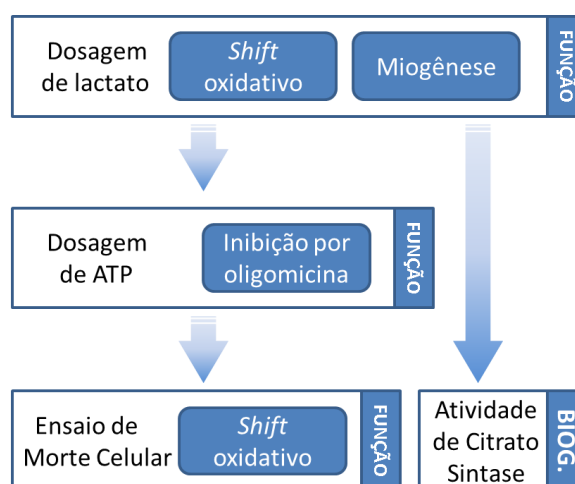


Figura 1. Esquema da sequência de ensaios propostos para seleção e validação do gene-alvo para controle molecular do metabolismo oxidativo.

Através de análise de bioinformática do proteoma de mitocôndrias isoladas de mioblastos e miotubos de células musculares esqueléticas (C2C12), foi gerada uma



lista composta principalmente por fatores de transcrição associados à regulação das proteínas mitocondriais que tiveram seu conteúdo aumentado durante o processo de miogênese, condição com conhecido aumento da função e densidade mitocondrial. Esta lista será utilizada para prospecção de alvos com a plataforma proposta.

Objetivo

Prospecção de fatores de transcrição reguladores do metabolismo oxidativo e otimização de conjunto de ensaios de bioenergética para *screening* de agentes reguladores do metabolismo.

Métodos

A primeira etapa do projeto proposto já foi executada e consistiu na avaliação dos efeitos do *knockdown* dos genes selecionados na produção de lactato por células musculares. Para estes ensaios, preparou-se uma placa de 96 poços com células C2C12, as quais foram transfectadas simultaneamente à indução da diferenciação com os siRNAs. No terceiro dia após transfecção as células foram incubadas por 3 horas em tampão de Krebs com 25 mM de glicose, 1 mM de piruvato e 4 mM de L-glutamina, este meio foi coletado e transferido para outra placa de 96 poços para dosagem de lactato por método enzimático com a enzima lactato desidrogenase e hidrazina. O NADH gerado nessa reação é medido por fluorescência e uma curva padrão foi feita para determinar as concentrações absolutas de lactato na amostra. O experimento subsequente buscou a otimização do tempo da morte celular induzida por galactose, nele plaqueou-se células MEF em uma placa de 96 poços, com 60% de confluência trocou-se o meio de cultura por DMEM e seus devidos substratos (glicose e/ou galactose), em diferentes concentrações, 25mM e 10mM, em dois períodos de tempo, doze e vinte e quatro horas. A leitura deste experimento foi feita com iodeto de propídeo e medida em espectrofotômetro de placa e normalizado em cristal violeta.

Os genes selecionados no primeiro experimento partirão para as etapas posteriores, que consistiram em o ensaio de morte induzida por galactose, dosagem de ATP glicólico e mitocondrial, atividade da citrato sintase e ensaio de consumo de oxigênio em Seahorse XF24



Resultados

No primeiro experimento da plataforma (Figura 2), medimos a concentração de lactato do meio de cultivo de células transfectadas com os siRNAs indicados. Partimos da premissa de que quanto maior a concentração de lactato encontrado, maior é a chance deste gene silenciado poder interferir na função oxidativa da célula, visto que o lactato é produto da via glicolítica. Oito dos siRNAs induziram mudanças significativas em relação ao controle negativo, em uma média de 48% de aumento, sendo o *knockdown* de KDM5A o que apresentou maior aumento relativo (72%). Estes 8 genes serão utilizados nos experimentos seguintes.

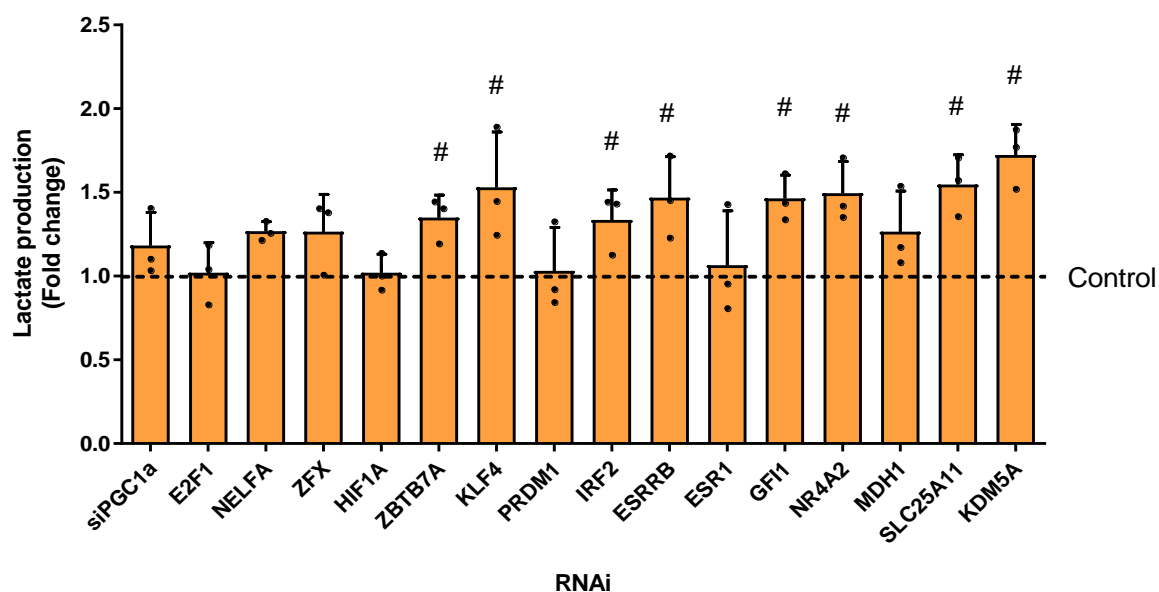


Figura 2. Produção de lactato em miócitos silenciados por RNAi – células C2C12 confluentes foram transfectadas e diferenciadas em uma placa de 96 poços com siRNAs, ao terceiro dia de transfecção as células foram incubadas com tampão Krebs contendo 25mM de glicose. O meio foi coletado e o lactato medido indiretamente pela fluorescência de NADH através de reação com lactato desidrogenase em meio contendo hidrazina. Os resultados foram normalizados em relação ao controle de cada experimento. N = 3.

Em seguida, determinamos o melhor tempo para realização dos ensaios de morte celular induzida por galactose em células MEF. Os resultados (Figura 3) mostram que não há diferença de morte relativa nas células com glicose, ou com galactose por 12 horas, mas observa-se aumento de 50% de morte celular com 10 mM ou 25 mM de galactose após 24 horas. Para determinar se de fato estávamos promovendo o metabolismo oxidativo nestas condições, dosamos o lactato nesse



mesmo desenho experimental. Nestes resultados entendemos que o nosso experimento deve ser realizado com 24h, pois assim encontramos morte induzida pela galactose e a uma concentração de 10 mM de galactose é suficiente para induzir o shift-oxidativo (Figura 4).

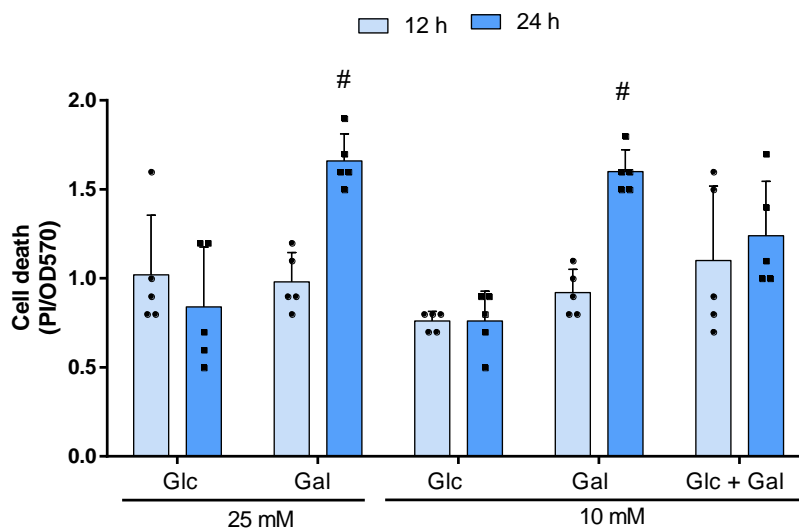


Figura 3. Otimização do tempo para indução de morte celular com galactose – células MEF 60% confluentes cultivadas em placa de 96 poços, em dois períodos de tempo, 12 e 24h, com dois substratos, glicose e galactose. A medida de morte foi feita pela fluorescência do iodeto de propídeo (PI) e normalizada por cristal violeta. (OD570). Glc: glicose; Gal: galactose. # indica p-valor < 0,05 pelo teste t de Student.

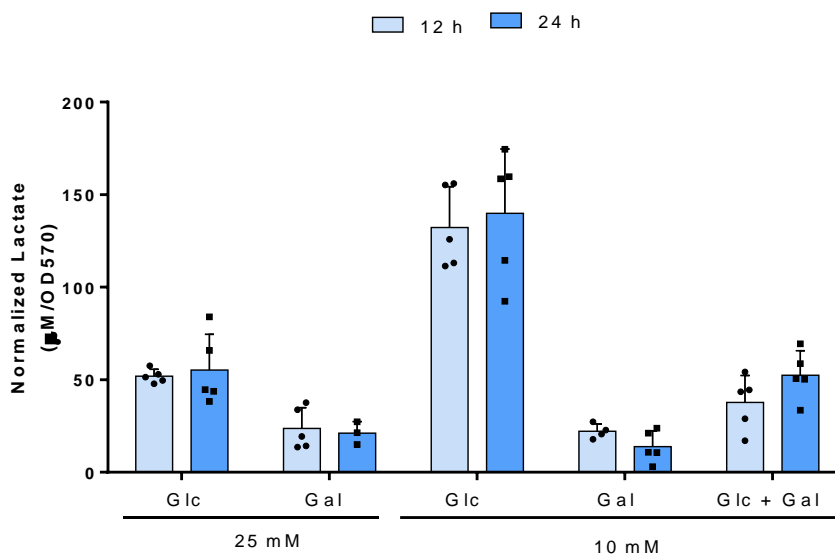


Figura 4. Ensaio de lactato em células MEF com diferentes meios – células MEF confluentes em placas de 96 poços tratadas com meios distintos em concentração de 25 e 10 mM de glicose e galactose por dois períodos de tempo, 12 e 24h. Glc: glicose; Gal: galactose.



Discussão

Os experimentos de dosagem de lactato em placa de 96 poços são o ponto de partida da plataforma de ensaios. Nos primeiros ensaios, notamos um forte efeito da passagem celular no valor absoluto de concentração de lactato, mesmo com a normalização, desta forma, calculamos a variação relativa ao controle siScr para cada experimento. A normalização por meio do cristal violeta, indicando a quantidade de células em cada poço, foi uma otimização importante, visto que alguns dos genes afetaram o crescimento celular. Surpreendentemente, o RNAi para PGC1- α não retornou os resultados esperados de aumento na produção de lactato de maneira reprodutiva, mas outros RNAi apresentaram considerável impacto na redução da função mitocondrial, dando-nos assim uma dá ótima perspectiva para continuar na pesquisa destes genes. A otimização do tempo e concentrações adequadas de galactose, a qual induz o metabolismo se aeróbio, já que dispense de mais ATP que a glicose para ser processada em piruvato, zerando seu saldo energético anaeróbio, é importante para realização dos ensaios de morte celular no tempo em que há efeito deletério decorrente da falta de capacidade de manter a capacidade oxidativa da mitocôndria e dos ensaios de produção de lactato no tempo em que não há morte.

Considerações finais

O presente trabalho visa completar estes ensaios para que possamos assumir uma estratégia que reúna ensaios bioenergéticos consolidados, de baixo custo e com alta relevância funcional, compreendendo medidas ortogonais de parâmetros da função mitocondrial, visto que já conseguimos selecionar genes alvos promissores com o primeiro experimento, além de otimizado o experimento seguinte. A perspectiva futura é consolidar a sequência de ensaios descritas e validar o gene selecionado por outras técnicas de bioquímica e biologia molecular.

Referências principais:

World Health Organisation, "WHO Overweight and Obesity Fact Sheet", 2020. [Online]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. [Acessado: 13-oct-2020]

Schulman, Ira G. "Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease." *Advanced drug delivery reviews* 62, no. 13 (2010): 1307-1315.

Lonard, David M., and Bert W. O'malley. "Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets." *Nature Reviews Endocrinology* 8, no. 10 (2012): 598.