

Ausência de Parkin e seus efeitos para a resposta ao β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) em diferentes tecidos de camundongos

Palavras-Chave: β -hidroxi- β -metilbutirato, mitofagia, Parkin

Autores/as:

Ana Laura Vieira da Silva, Gustavo Palmeira dos Santos, Marcos Vinícius Esteca [Faculdade de Ciências Aplicadas - Unicamp]

Prof. Dr. Igor Luchini Baptista (orientador) [Faculdade de Ciências Aplicadas - Unicamp]

INTRODUÇÃO:

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia celular (ATP) por fosforilação oxidativa^[1]. Contudo, ao associarem redução de oxigênio e transporte de elétrons através da sua membrana mitocondrial interna, promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio, as quais podem danificar inespecificamente distintas macromoléculas, membranas celulares e as próprias mitocôndrias, gerando disfunção mitocondrial, incapacidade de manutenção da homeostase celular e ativação de apoptose^[1, 2].

Desse modo, as células possuem mecanismos que visam identificar e remover organelas disfuncionais antes que essas sejam capazes de causar algum dano celular, sendo a mitofagia a principal via responsável por manter a qualidade da rede mitocondrial. Nesse processo destaca-se Parkin, uma E3 ligase que ubiquitina mitocôndrias disfuncionais, marcando-as para a degradação^[1]. Assim, devido ao seu papel, Parkin é expressa em uma variedade de tipos celulares, como neurônios, cardiomiócitos e hepatócitos, contribuindo para a homeostase de órgãos e tecidos^[3].

A partir disso, evidencia-se o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), um metabólito produzido endogenamente a partir do aminoácido essencial leucina. Estudos sugerem que esse suplemento nutricional é capaz de diminuir E3 ligases e a ubiquitinação de proteínas^[4, 5]. No entanto, em projeto anterior observamos que a suplementação de 3 dias com HMB elevou o conteúdo proteico de Parkin e de outras proteínas mitocondriais associadas à mitofagia em diferentes tecidos animais. Tendo isso em vista, o presente projeto objetivou caracterizar os efeitos do HMB sobre proteínas envolvidas na via mitofágica em camundongos selvagens e *knockout* para a proteína Parkin em diferentes tempos de suplementação.

METODOLOGIA:

Foram utilizados camundongos machos selvagens C57BL/6J (WT) e *knockout* para a expressão da proteína Parkin (Parkin^{-/-}), os quais foram divididos em três grupos de estudo: grupo controle (CTRL); grupo suplementado por 3 dias (3D); e grupo suplementado por 10 dias (10D). Atingida a idade de 12 semanas, os animais receberam administração oral por meio de gavagem de hidrato de cálcio 3-hidroxi-3-metilbutirato, 97% (Alfa Aesar®) diluído em água potável clorada. O procedimento foi realizado de forma instrumentalizada

com agulha para gavagem, a qual foi introduzida no esôfago dos camundongos para administração de 300 μ L da solução de 600 mg/kg de peso corporal ao dia^[6]. Decorridos os períodos de suplementação, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico via intraperitoneal. Em seguida, coletou-se três tecidos: cérebro, coração e fígado, os quais foram destinados à identificação do conteúdo proteico por Western Blotting.

Western Blotting

Foram utilizados 10 mL de tampão RIPA (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1mM DTT, 10% SDS e 0,1 mL de inibidor de proteinase Sigma Aldrich®) para homogeneizar 1 g de tecido, com posterior centrifugação a 15.000×g por 10 min. 40 μ g de proteínas foram aplicadas à eletroforese em SDS-PAGE gel preparado entre 10–15%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi corada com Ponceau Red (Sigma-Aldrich®). Após bloqueio com solução de tampão Tris salino com 0,1% Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite, os anticorpos primários foram incubados em solução de bloqueio de 5% de BSA em TBS-T, *overnight*, a 4 ° C. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários durante 1 hora em temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas usando Western Blotting Pierce™ ECL (ThermoFisherScientific® 32106) e reveladas utilizando o fotodocumentador G:BOX Chemi XRQ, alimentado pelo software GeneSys (SYNGENE®) para detectar o sinal de quimioluminescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Por meio da técnica de Western Blotting fomos capazes de observar que a suplementação com HMB elevou o conteúdo proteico de Parkin em animais WT nos três tecidos analisados (Figura 1).

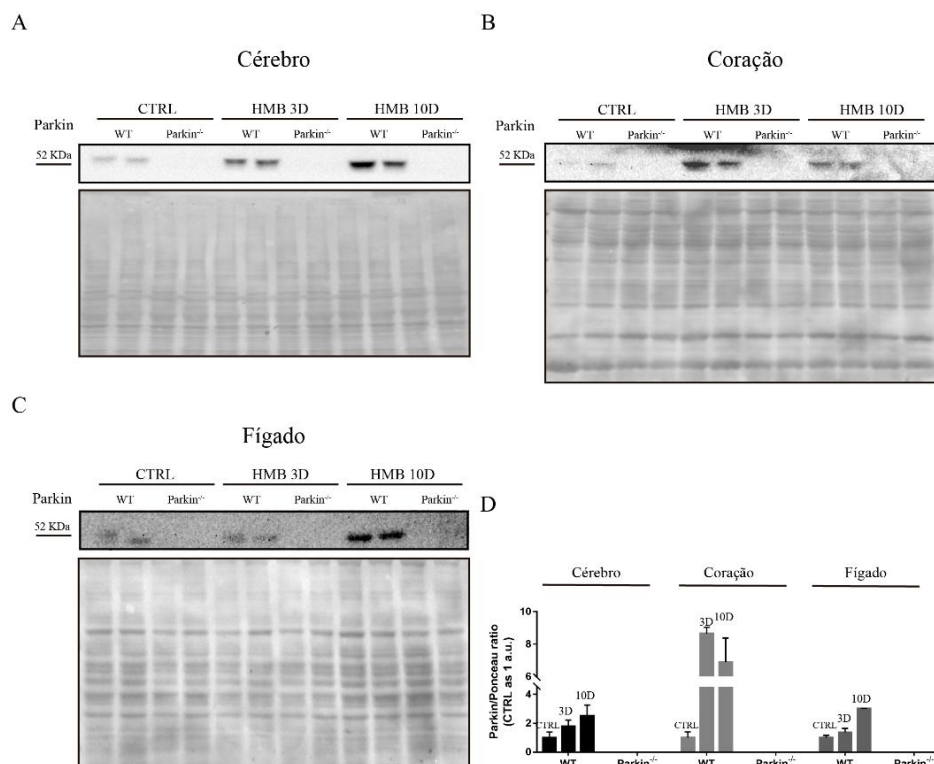


Figura 1. (A) Western Blotting representativo do efeito do HMB sobre a quantidade total da proteína Parkin no cérebro de animais selvagens suplementados durante 3 e 10 dias (N=2). (B) Western Blotting representativo do efeito do HMB sobre a quantidade total

da proteína Parkin no coração de animais selvagens suplementados durante 3 e 10 dias (N=2). (C) Western Blotting representativo do efeito do HMB sobre a quantidade total da proteína Parkin no fígado de animais selvagens suplementados durante 3 e 10 dias (N=2).

No tecido nervoso, após 10 dias de suplementação com HMB ocorreu uma redução no conteúdo proteico de p62 e LC3 em animais *Parkin*^{-/-} (Figura 2). Durante a mitofagia, o adaptador de autofagia p62 é incorporado aos autofagossomos por interação direta com LC3, sendo ambos degradados juntamente com a mitocôndria disfuncional ao final do processo^[2]. Dessa forma, tal resultado parece indicar que o fluxo mitofágico se encontra mais acelerado no cérebro de camundongos *knockout*, fato corroborado pela ausência da fração II do LC3, único marcador de proteína associado de forma confiável com os autofagossomos^[7].

Para mais, verificamos uma queda no conteúdo proteico de VDAC2 e Tom20 após 10 dias de suplementação (Figura 2), o que parece reafirmar tal hipótese. VDAC2 é um canal iônico voltagem dependente, enquanto Tom20 participa de um complexo de receptores que permite o movimento de proteínas para o espaço intermembrana, sendo que ambos se localizam na membrana mitocondrial externa^[8]. Nesse sentido, a diminuição do sinal desses marcadores pode indicar que as mitocôndrias foram eliminadas pela via mitofágica.

Por fim, *Mfn2* é uma proteína responsável por realizar a fusão de mitocôndrias danificadas com saudáveis em momentos de estresse visando reparar as organelas disfuncionais e, assim, formar novas redes mitocondriais a fim de manter a fosforilação oxidativa^[1, 2]. Desse modo, observamos que o conteúdo proteico de *Mfn2* se encontra elevado em animais *Parkin*^{-/-} após 3 dias de suplementação (Figura 2), possivelmente como uma tentativa de reparar o dano mitocondrial. Contudo, após 10 dias de suplementação, os níveis dessa proteína também diminuíram, reforçando a hipótese de que ocorreu a eliminação das mitocôndrias danificadas.

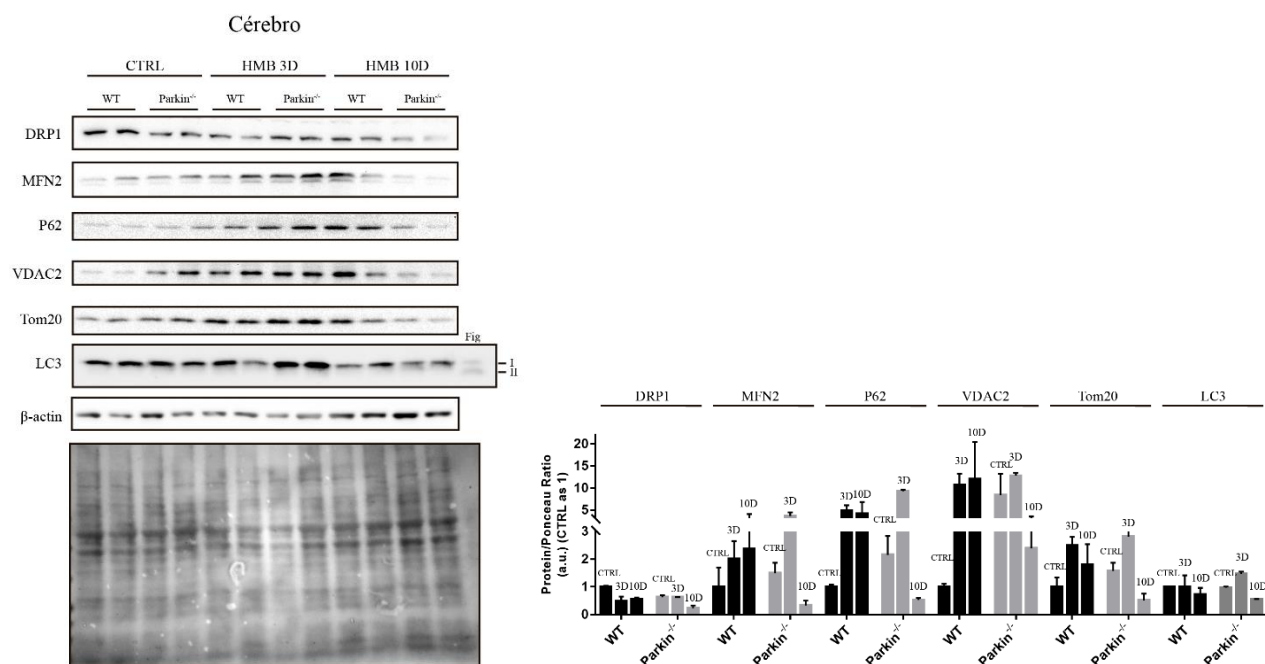


Figura 2. Western Blotting representativo do conteúdo proteico de DRP1, Mfn2, p62, VDAC2, Tom20 e LC3 no cérebro de animais selvagens e *knockout* para a proteína Parkin após 3 e 10 dias de suplementação com HMB (N=2).

No tecido cardíaco observamos que os níveis de p62 e LC3-II permaneceram elevados em ambos os genótipos estudados mesmo após 10 dias de suplementação (Figura 3), o que sugere um fluxo mitofágico reduzido. Dessa forma, o HMB não pareceu exercer efeito sobre a mitofagia nesse tecido.

No entanto, encontramos um aumento do conteúdo proteico de VDAC2 e Tom20 no tecido cardíaco (Figura 3), proteínas localizadas na membrana mitocondrial externa que podem indicar um incremento na população de mitocôndrias desse tecido. Ademais, a elevação nos níveis de Mfn2 também foi visualizada (Figura 3), corroborando com a hipótese aqui levantada, pois tal proteína contribui para a formação de redes mitocondriais^{1,2}. Houve ainda um aumento no conteúdo de DRP1 (Figura 3), a qual é responsável por realizar fissão mitocondrial. Em conjunto, os processos de fissão e fusão atuam de modo equilibrado e contínuo a fim de manterem uma estrutura mitocondrial funcional, além de desempenharem um papel na biogênese^{1,2}. Tendo isso em vista, sugerimos que no tecido cardíaco o fluxo mitofágico se encontra diminuído, contudo, a biogênese mitocondrial e a dinâmica de fissão e fusão podem estar ativadas de modo a compensar as mitocôndrias disfuncionais em ambos os genótipos estudados.

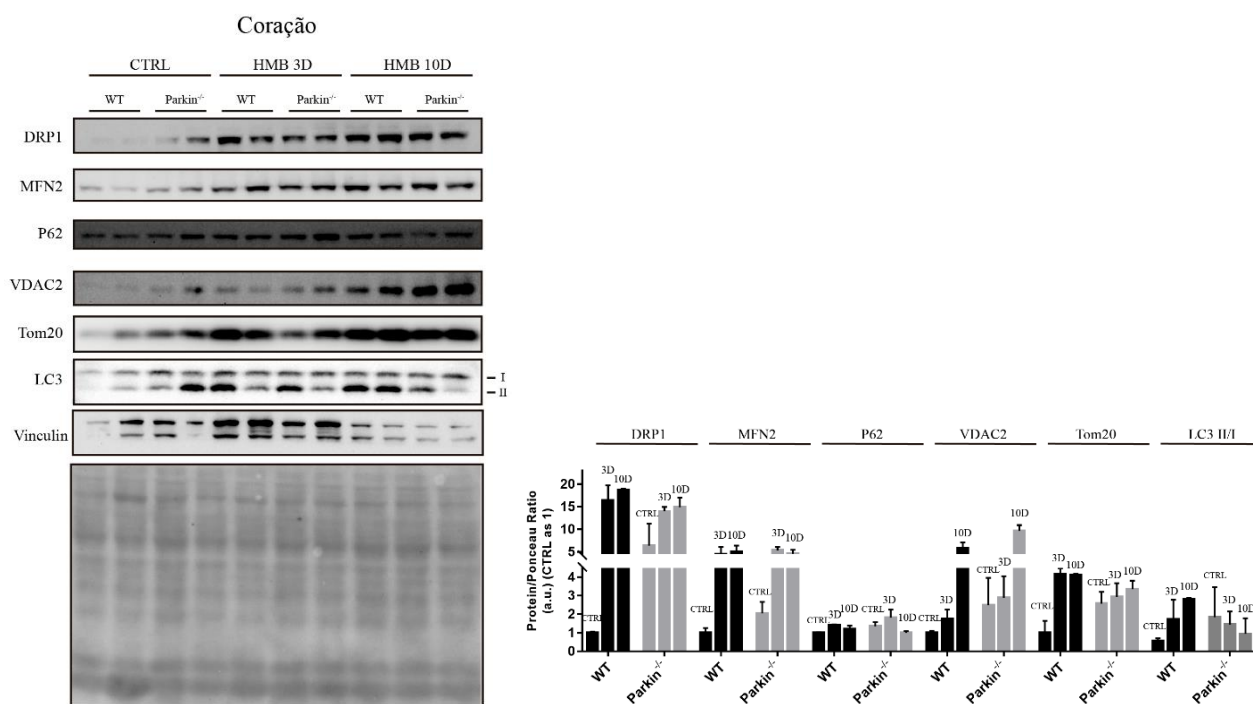


Figura 3. Western Blotting representativo do conteúdo proteico de DRP1, Mfn2, p62, VDAC2, Tom20 e LC3 no coração de animais selvagens e *knockout* para a proteína Parkin após 3 e 10 dias de suplementação com HMB (N=2).

Por fim, a suplementação com HMB no tecido hepático, apesar de elevar o conteúdo proteico de Parkin, não modulou de forma significativa e consistente as demais proteínas mitocondriais (Figura 4) a ponto de sermos capazes de associar tais modulações com funções mitocondriais. Para além disso, em projeto anterior, observamos por meio da técnica de Imunofluorescência que a suplementação de 3 dias com HMB em animais selvagens elevou o conteúdo de Parkin no núcleo do hepatócito, dados sugestivos de que o HMB pode influenciar as funções nucleares dessa proteína em detrimento das suas funções mitocondriais.

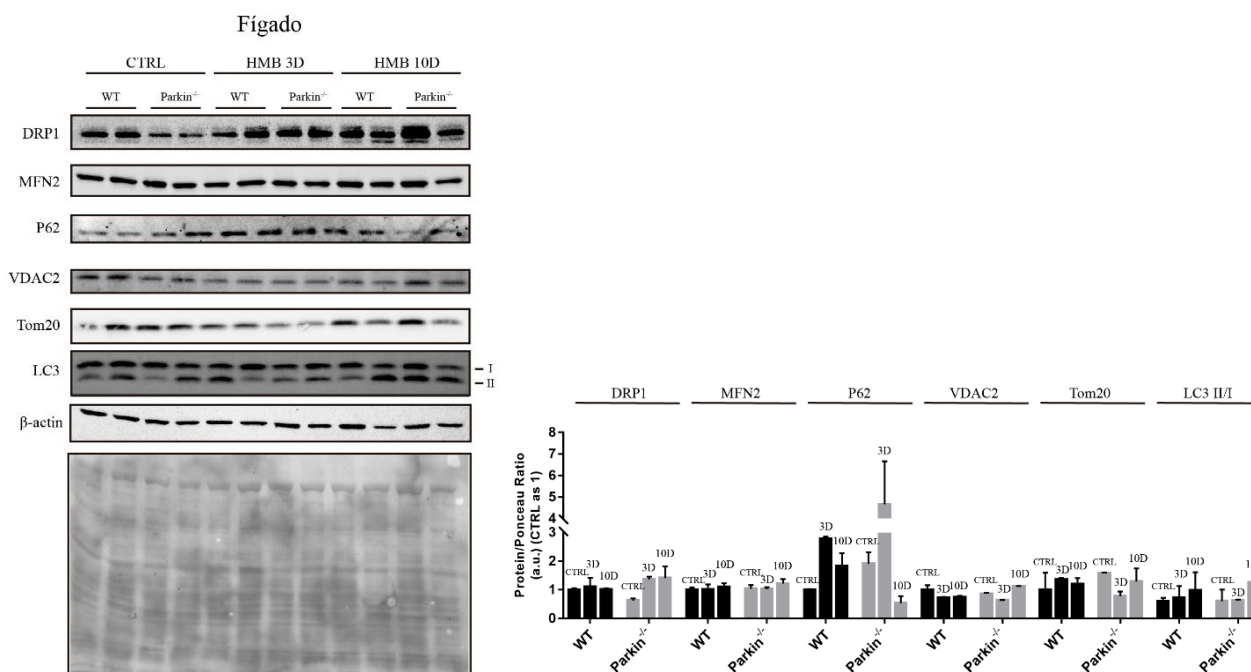


Figura 4. Western Blotting representativo do conteúdo proteico de DRP1, Mfn2, p62, VDAC2, Tom20 e LC3 no fígado de animais selvagens e *knockout* para a proteína Parkin após 3 e 10 dias de suplementação com HMB (N=2).

CONCLUSÕES:

Concluimos que a suplementação com HMB elevou o conteúdo proteico de Parkin nos tecidos estudados, além de modular proteínas mitocondriais associadas à mitofagia. Sugerimos que, no cérebro de animais *Parkin^{-/-}*, as mitocôndrias foram eliminadas devido à um aumento no fluxo mitofágico após 10 dias de suplementação. No entanto, acreditamos que não houve ativação da mitofagia no coração e fígado de animais de ambos os genótipos, o que indica distintos efeitos do HMB nesses tecidos os quais podem estar associados à biogênese mitocondrial e funções nucleares, respectivamente. Assim, mais estudos se fazem necessários a fim de confirmar as hipóteses aqui levantadas. Apesar disso, os resultados do presente projeto reafirmam o HMB como uma forma de modular o conteúdo de proteínas mitocondriais por meio da ingestão.

BIBLIOGRAFIA

- [1] GUSTAFSSON, Åsa B.; DORN, Gerald W. **Evolving and Expanding the Roles of Mitophagy as a Homeostatic and Pathogenic Process.** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6442924/>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- [2] SULKSHANE, Prasad *et al.* **Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia.** [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8254004/>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- [3] EDMUNDS, Lia R. *et al.* **Hepatic insulin sensitivity is improved in high-fat diet-fed Park2 knockout mice in association with increased hepatic AMPK activation and reduced steatosis.** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854109/>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- [4] ZANCHI, Nelo Eidy *et al.* **HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action.** [S. l.], 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20607321/>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- [5] HOLECEK, M *et al.* **Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues.** [S. l.], 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056452>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- [6] BAPTISTA, Igor Luchini *et al.* **Leucine and HMB differentially modulate proteasome system in skeletal muscle under different sarcopenic conditions.** [S. l.], 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124592/>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- [7] KLIONSKY, Daniel J. *et al.* **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.** [S. l.], 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26799652/>. Acesso em: 20 ago. 2021.
- [8] SUN, Yu *et al.* **Voltage-dependent Anion Channels (VDACs) Recruit Parkin to Defective Mitochondria to Promote Mitochondrial Autophagy.** [S. l.], 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23060438/>. Acesso em: 20 ago. 2021.