



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

**Palavras-Chave:** fator de transcrição, plataforma de ensaios, metabolismo

**Autores/as:**

**HENRIQUE BACCI – UNICAMP**

**DIMITRIUS SANTIAGO P.S.F. GUIMARÃES – UNICAMP**

**Prof. Dr. LEONARDO R. SILVEIRA – orientador – UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

O aumento na prevalência da obesidade e de suas comorbidades vêm crescendo exponencialmente nas últimas décadas. Uma das principais causas desse fenômeno epidemiológico é a redução da função mitocondrial em tecidos periféricos incluindo o músculo esquelético. Desse modo, há um interesse crescente em genes e compostos que modulam a função mitocondrial e, conseqüentemente, em estratégias de rastreamento capazes de selecionar esses agentes de forma eficiente. No entanto, a manutenção da homeostase mitocondrial, bem como, da capacidade oxidativa, são processos dinâmicos e bem ajustados em níveis alostérico, pós-transcricional e transcricional. Embora essa organela possua seu próprio genoma, a maior parte de seu proteoma é codificada por genes nucleares, deixando o cenário muito mais complexo na busca de reguladores moleculares da função e/ou biogênese mitocondrial. As poucas estratégias para a pesquisa de agentes moduladores mitocondriais são dispendiosas e inicialmente requerem uso de técnicas que limitam sua aplicação em larga escala [1]. Por outro lado, abordagens mais acessíveis, como o uso isolado de sondas para determinação do potencial de membrana e medição de ATP [2], são menos informativas, uma vez que uma variedade de estressores, não necessariamente relacionados ao metabolismo, podem resultar em alterações temporárias no potencial de membrana e nos níveis de ATP. Conseqüentemente, os métodos para o rastreamento de drogas e caminhos para as intervenções clínicas são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias capazes de restaurar a função mitocondrial muscular em indivíduos com distúrbios metabólicos.

Aqui estamos propondo o desenvolvimento de um método rápido, altamente sensível e preciso para pesquisar novos compostos com potencial para aumentar a função mitocondrial no músculo esquelético. Nossa abordagem consiste em um conjunto de ensaios baseado em bioenergética para quantificar os parâmetros ortogonais da função mitocondrial, como o *shift* metabólico glicolítico pela produção de lactato, capacidade oxidativa mitocondrial pelo consumo de

oxigênio, morte celular por desvio metabólico induzido pela galactose e densidade mitocondrial pela atividade da enzima citrato sintase. Assim, validamos nossa plataforma usando uma estratégia assistida por bioinformática para gerar um conjunto inicial de reguladores transcricionais putativos da função mitocondrial durante a miogênese em células C2C12. A triagem selecionou o growth factor independent 1 (GFI1) como um regulador da função mitocondrial no músculo esquelético. Experimentos adicionais indicaram que GFI1 é necessário para a manutenção da capacidade oxidativa em miócitos, uma vez que sua diminuição levou a redução no consumo de oxigênio ligado ao ATP mitocondrial e no potencial de membrana mitocondrial.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

### **Ensaio bioenergéticos indicam GFI1 como novo regulador do metabolismo mitocondrial**

Realizamos experimentos baseados em bioenergética com RNAi que promoveram o knockdown de 11 alvos selecionados em miócitos de C2C12. O primeiro ensaio consistiu na medição da concentração de lactato extracelular em células controles e silenciadas com siRNA (Fig. 1 A) uma vez que a taxa de produção de lactato e o conteúdo de lactato têm sido amplamente usados como uma medição da atividade glicolítica tanto em cultura de células quanto nos níveis de organismo inteiro [3] [4]. O knockdown de 8 genes (KDM5A, KLF4, GFI1, NR4A2, ZBTB7A, IRF2, NELFA e ZFX) aumentaram significativamente a produção de lactato, sendo, 72%, 53%, 46%, 35%, 34%, 33%, 26%, e 26%, respectivamente. Estes genes foram, então, selecionados para o próximo experimento, no qual o processo de morte celular foi induzido por galactose (Fig. 1 B). A expressão do fator de transcrição, KLF4, aumentou sob exposição com galactose em 5.4x, comparado ao controle, seguido pelo GFI1 com 3.3 e pelo KDM5A com 2.8. É interessante notar que o knockdown do KLF4 e do GFI1 foram mais eficientes em sensibilizar as células para a galactose que o nosso controle positivo ESRRB, que aumentou a marcação pelo iodeto de propídio em 2.9x. Finalmente, como um índice de densidade mitocondrial, a atividade da citrato sintase foi medida em miócitos C2C12 transfectados com KLF4, GFI1 e KDM25, mas apenas o knockdown do Growth Factor Independent 1 (GFI1) aumentou significativamente a atividade da enzima CS (Fig. 1 C).

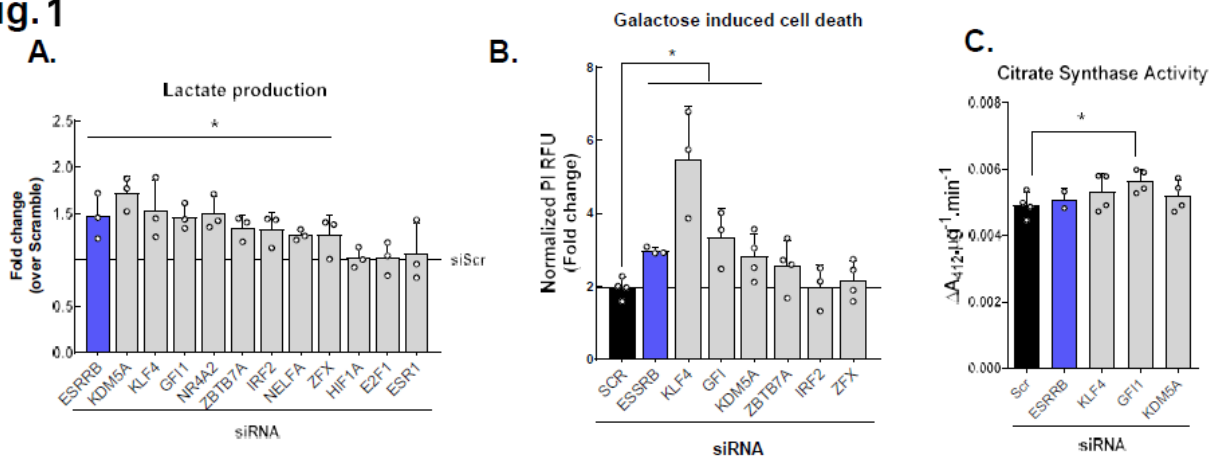
**Fig. 1**

Figura 1 - Mioblastos confluentes foram transfectados no momento da diferenciação usando siRNA scramble como controle ou siRNA para os genes selecionados e os experimentos realizados no terceiro dia após a diferenciação celular. ESRRB foi usado como um controle positivo. A. As células foram incubadas por 3 horas em tampão Krebs-Henseleit suplementado com glicose (25 mM), piruvato (1 mM) e L-glutamina (4 mM), e o conteúdo de lactato no meio foi medido por ensaio enzimático, (N = 3); B. Após atingir a diferenciação, as células foram incubadas em DMEM contendo galactose (10 mM) ou glicose (10 mM) por um período de 8 horas. A morte celular foi medida por coloração com iodeto de propídio e normalizada por cristal violeta (N = 3-4); C. A atividade da citrato sintase foi medida por ensaio colorimétrico em lisado celular e normalizada pelo conteúdo de proteína (N = 4). Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP e \* denota significância estatística ( $p < 0,05$ ) calculada pelo teste t de Student comparando alvos knockdown para siScr.

### Caracterização do fenótipo metabólico do “knockdown de GFI1”

Para validar o conjunto proposto de ensaios como uma plataforma para a triagem de agentes moduladores mitocondriais e atestar se o alvo selecionado, GFI1, poderia ser um novo regulador transcricional do metabolismo muscular, investigamos a função mitocondrial pelo consumo de oxigênio (Fig. 2 A, B) em miócitos transfectados com siGFI1, o qual apresentou eficiência de “knockdown” de aproximadamente 50% (Fig. 2 H). Embora não fomos capazes de detectar alterações no consumo mitocondrial máximo e basal de oxigênio, houve clara tendência de redução da respiração associada ao consumo de ATP e no vazamento de prótons, os quais foram reduzidos em 86% e 17%, respectivamente, em células siGFI1. Também encontramos um aumento de 40% nas taxas de acidificação extracelular (ECAR) (Fig 2 C), confirmando nossos achados anteriores de um aumento na produção de lactato e morte celular induzida por galactose em células knockdown GFI1. Além disso, o knockdown de GFI1 levou a uma mudança para um metabolismo mais glicolítico (Fig. 2 D), quando o consumo de oxigênio basal foi comparado à variação em relação ao controle, também observamos diminuição acentuada (20%) no potencial de membrana mitocondrial em células “knockdown” GFI1 (Fig. 2 E), que é compatível com a redução geral da função mitocondrial observada em experimentos anteriores. Esses experimentos indicaram que níveis mínimos de GFI1 são necessários para a manutenção da homeostase mitocondrial nas células musculares.

**Fig. 2**

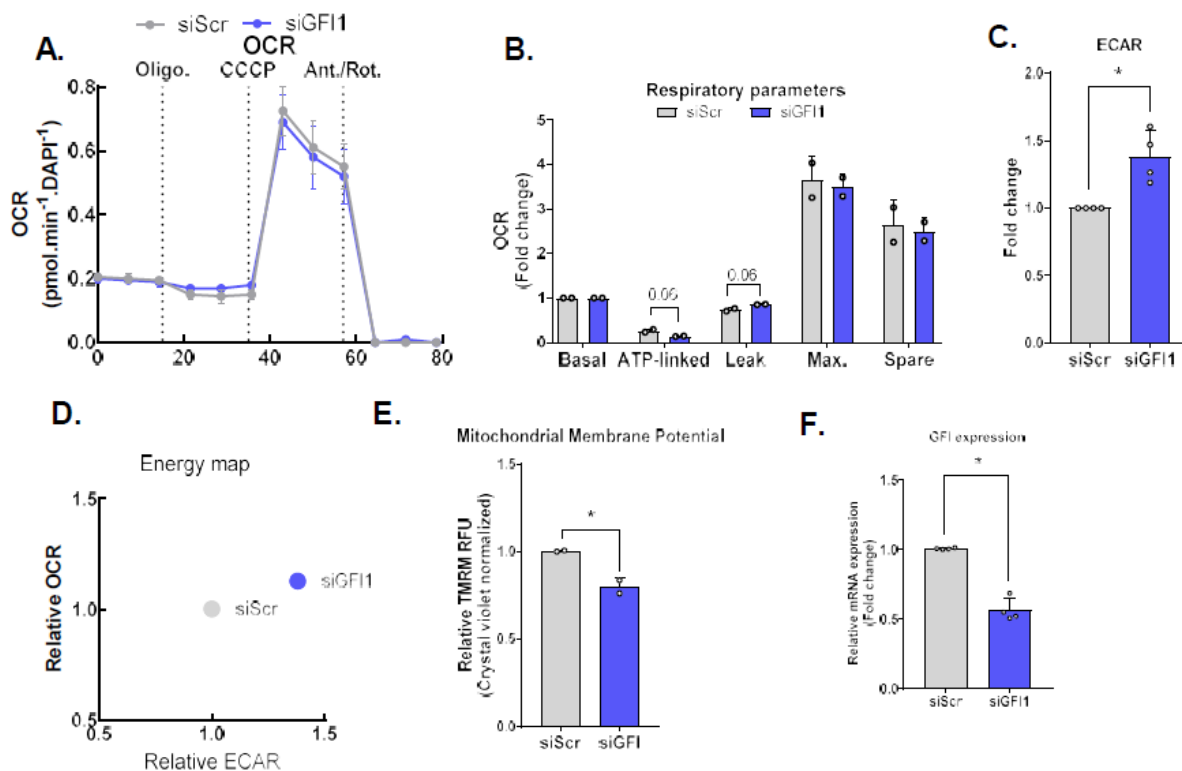


Figura 2 – A-B. Ensaios de consumo de oxigênio (OCR) em miócitos transfectados com siScr (controle) ou siGFI1 em um Seahorse Extracellular Flux Analyzer. Oligomicina (Oligo.), CCCP e antimicina A/rotenona (Ant./Rot.) foram adicionados em sequência para determinar os parâmetros respiratórios. Os dados brutos foram normalizados por coloração DAPI (N = 2); C. Taxa de acidificação extracelular durante OCR; D. Mudança de dobra relativa de OCR basal e ECAR em células siScr e siGFI1; E. O potencial de membrana mitocondrial de miócitos de controle e knockdown (siGFI1) foi medido por coloração TMRM e normalizado por violeta de cristal. (N = 2). F. Eficiência Knockdown medida por RT-qPCR (N = 4). Os valores são representados como média ± DP e \* denota p <0,05 calculado pelo teste t de Student.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Neste trabalho, montamos um conjunto de experimentos baseado em bioenergética composto por três ensaios funcionais e usamos uma lista de alvos gerada por bioinformática para validar nossa abordagem. Juntos, este conjunto de dados nos permitiu identificar pela primeira vez o fator de transcrição GFI1, como um novo regulador da função mitocondrial em células do músculo esquelético. Podemos afirmar ainda que esta plataforma é baseada em princípios gerais de bioenergética, sendo facilmente implementada e reproduzida em outras linhagens celulares. Finalmente, destaco que, de uma lista de 11 fatores de transcrição associados com o controle da função mitocondrial, conseguimos realizar ensaios que nos permitiram selecionar aquele que expressasse melhores resultados perante as respostas mitocondriais e metabólicas, acompanhado de baixo custo e de alta relevância funcional.

## METODOLOGIA:

**Cultura de Célula:** as células usadas foram mioblastos de C2C12 do Banco de Células do Rio de Janeiro, suplementadas com soro fetal bovino a 10% em meio DMEM (Sigma, D5648), 1% penicilina e estreptomicina, cultivadas em 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> atmosférico. Para diferenciação e miogênese, foi

trocado o meio por soro de cavalo a 2% em meio DMEM. Os mioblastos foram transfectados com os siRNA citados com 200 nM do siRNA em lipofectamina RNAiMax.

**Produção de lactato:** As células cresceram em placas de 96 poços e foram incubadas por 3 h com 50 µL de tampão Krebs-Henseleit (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, KCl 4,7 mM, NaCl 111 mM, pH 7,3), glicose 25 mM, piruvato 1 mM e 4 mM Glutamina. A produção de lactato foi quantificada enzimaticamente como fluorescência de NADH (360 nm / 460 nm) pela reação reversa de L-lactato desidrogenase em uma reação contendo 20 µL de meio celular, 2 µg de enzima, 50 mM de Tris e Hidrazina 625 mM em PBS. Após o ensaio, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para normalização do número de células

**Ensaio por morte induzida de galactose:** 24 h antes do ensaio, foi trocado o meio dos miócitos cultivados em uma placa de 96 poços por D-galactose 10 mM para induzir a morte celular. As células foram coradas com 5 µg / mL de iodeto de propídio por 30 min, a fluorescência (530 nm / 620 nm) medida. Também foi normalizado por cristal violeta.

**Atividade da citrato sintase:** A medição enzimática da atividade da citrato sintase aconteceu pela conversão de ácido 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) em CoA-S-TNB. Miócitos crescendo em placas de 96 poços foram lisados com 40 µL de Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, KCl 175 mM, EDTA 2 mM e Triton-X100 0,1% durante 20 min sob agitação. Centrifugadas a 2.000 xg por 3 min e 30 µL de lisados foram adicionados à mistura em uma concentração final de 0,3 mM de acetil-CoA, 0,1 mM de 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) em Tris-HCl, pH 8,5 e absorvância em 412 nm medida. Oxaloacetato foi adicionado à mistura a uma concentração de 0,5 mM e a absorvância a 412 nm foi medida a cada 15 segundos durante 15 min. Para normalização, a proteína foi quantificada por Bradford no lisado restante e corrigida pela quantidade de proteína.

**Ensaio de consumo de oxigênio:** As células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços XF e foram tratadas como descrito. Uma hora antes do ensaio foram incubadas em tampão Krebs-Henseleit (pH 7,4) suplementado com 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e Glicose 25 mM a 37 ° C sem CO<sub>2</sub>. Após o período de 1h, o OCR basal foi medido e as seguintes drogas foram injetadas: 1 µM de oligomicina para inibir ATP sintase, 2 µM do (CCCP) e 1 µM de cada rotenona / antimicina para bloquear a respiração mitocondrial. O OCR não mitocondrial foi subtraído de todos os valores absolutos. Após o ensaio, as células foram normalizadas por cristal violeta

## BIBLIOGRAFIA

- [1] N. Biesemann et al., "High throughput screening of mitochondrial bioenergetics in human differentiated myotubes identifies novel enhancers of muscle performance in aged mice," *Sci. Rep.*, 2018.
- [2] B. H. Varkuti et al., "High-Throughput Small Molecule Screen Identifies Modulators of Mitochondrial Function in Neurons," *iScience*, 2020.
- [3] G. Van Hall, "Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise," *Acta Physiologica*. 2010.
- [4] B. Glancy, D. A. Kane, A. N. Kavazis, M. L. Goodwin, W. T. Willis, and L. B. Gladden, "Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease," *J. Physiol.*, 2021.