

VERIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA DA REDE MITOCONDRIAL NO PROCESSO DE *BROWNING* INDUZIDO PELO FRIO EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Fernando Penna Durr¹; Magno Alves Lopes²; Miguel Luiz Batista Junior³

1. Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: Fernando_penna@live.com
2. Doutorando em Biotecnologia; e-mail: magnolopes22@hotmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail migueljr4@me.com

Área do Conhecimento: **Biologia Tecidual, Fisiologia**

Palavras-chave: Dinâmica Mitocondrial; Tecido Adiposo; Metabolismo Energético; *Browning*.

INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é um importante órgão para os vertebrados superiores visto que é capaz de responder à mudanças na disponibilidade de nutrientes e, também, à mudanças na temperatura ambiental (BARTELT; HEEREN, 2014). O tecido adiposo pode ser classificado em dois tipos: o Tecido Adiposo Branco (TAB), que possui uma única gotícula de lipídeos (unilocular), ser heterogêneo, possuir poucas mitocôndrias e baixa vascularização. A sua principal função é fornecer substratos para a manutenção energética do organismo (BATISTA et al., 2012); o outro tipo, é o Tecido Adiposo Marrom (TAM), que possui várias gotículas de lipídeos (multilocular), elevado número de mitocôndrias e ser ricamente vascularizado (BARTELT; HEEREN, 2014). Sua principal função é auxiliar no controle da temperatura corporal (termogênese) (CANNON; NEDERGAARD, 2004). É sabido que alguns adipócitos brancos podem adquirir características morfofuncionais dos adipócitos marrons, através de exposição crônica ao frio, prática de exercícios e queimaduras. Neste caso, os adipócitos do TAB superexpressam uma proteína denominada *uncoupling protein 1* (UCP1), principal marcador termogênico que está presente na membrana mitocondrial interna. Esta transdiferenciação é conhecida como *browning* do TAB e as células derivadas, de adipócitos “bege” (PETRUZZELLI et al., 2014). O *browning* vem sendo amplamente estudado por aparecer em síndromes como a caquexia associada ao câncer e por possui potencial terapêutico na obesidade (PETRUZZELLI et al., 2014). A produção de calor no TAM e em adipócitos “bege” se deve ao desacoplamento da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, promovido pelo aumento da expressão da UCP1 (BARTELT; HEEREN, 2014). Esse processo é chamado de Termogênese Adaptativa (TA) e pode ser ativado por exposição à baixas temperaturas ou por dietas alimentares (VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009). Por participarem da termogênese do tecido adiposo, as mitocôndrias possuem papel importante nos processos de *browning*. Elas são organelas de dupla membrana responsáveis por prover a maioria do ATP celular pela fosforilação oxidativa (GAO; HOUTKOOPE, 2014). Para manter a homeostase metabólica, as mitocôndrias ficam distribuídas no citoplasma formando uma espécie de rede (BENARD et al., 2007). Esta rede é altamente dinâmica, pois pode mudar sua morfologia através de processos denominados de fissão e fusão mitocondriais, em resposta a diversos estímulos intra e extracelulares. Estes processos são controlados por proteínas, sendo que em mamíferos as *mitofusin 1* (MFN1) e 2 (MFN2) são responsáveis pela fusão da membrana mitocondrial externa (MME), e para a fusão da membrana mitocondrial interna (MMI) é necessária a *optic atrophy protein 1* (OPA1). Para a fissão, é necessária a *dynamin-related protein 1* (DRP1) e seu receptor na MME, a FIS1 (CHAN, 2006). Disfunções

ou deleções nesses processos podem levar a um desequilíbrio energético na célula (CHAN, 2006). Apesar da importância metabólica dos processos morfológicos mitocondriais, não há evidências destes no *browning*. Desta forma, o objetivo do presente trabalho se dá por estudar o perfil de expressão das proteínas de fusão e fissão mitocondrial durante o processo de *browning* induzido por baixa temperatura.

OBJETIVOS

Estudas as possíveis alterações da dinâmica mitocondrial durante o processo de *browning* induzido por baixa temperatura em camundongos de linhagem C57BL/6, avaliando a expressão das proteínas de fusão e fissão.

METODOLOGIA

Foram utilizados 9 camundongos machos da linhagem C57BL/6 (CEUA 001/2017), pesando entre 20 e 25g, divididos randomicamente em dois grupos experimentais: Grupo Controle (GC n=5) e Grupo Frio (GF n=4). Os camundongos foram mantidos a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ para o GC, enquanto que os camundongos do GF foram primeiramente aclimatados em temperatura média de $16\sim 18^\circ\text{C}$ durante 7 dias e, depois, foram alocados em câmara fria em $4\sim 6^\circ\text{C}$, onde permaneceram por 8 dias. Ambos os grupos tiveram acesso à água e alimentação durante os 15 dias e com ciclos de claro/escuro a cada 12h. Após eutanásia no 15º dia, os tecidos adiposos, subcutâneo (SC) e marrom (TAM), foram coletados e armazenados para análises posteriores. Foi feito acompanhamento de massa e temperatura durante o período experimental. Foi realizado imunomarcção via *Western blotting* para as proteínas de fissão e fusão mitocondriais. Para análise estatística foi utilizado o software *GraphPad Prism 6*, utilizando o Teste T de *Student* com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, que exhibe as membranas imuno-marcadas e a quantificação proteica, é possível visualizar que a UCP1 (Figura 1A), a principal responsável pelo *browning* (PETRUZZELLI et al., 2014) teve um aumento de 4.2-fold ($p < 0,05$) em relação ao GC. Isso demonstra que a indução de *browning* pelo frio foi atingido, caracterizando o modelo experimental proposto. Com o aumento da UCP1, há um aumento da atividade termogênica e há uma melhor eficiência no controle de temperatura pelo organismo (BARTELT; HEEREN, 2014). Nesta mesma Figura 1 também possível visualizar que a proteína MFN2 (Figura 1C) se mostra com uma tendência à redução nos tecidos subcutâneo em 54,3% ($p = 0,0635$) no GF. A OPA1 (Figura 1E) não se mostrou diferente nos grupos ($p = 0,5238$). É sabido que ambas proteínas além de participarem na dinâmica mitocondrial, também participam em eventos fisiológicos em adipócitos marrons, melhorando a interação entre as mitocôndrias e as gotículas lipídicas e facilitando a termogênese do tipo *non-shivering* (CHU; TAO; TASKEN, 2017). Estes dados sugerem que estas proteínas estão intimamente ligadas também ao metabolismo dos adipócitos. Assim, com a tendência à diminuição da MFN2 nos adipócitos “bege”, pode afetar não somente a rede mitocondrial, como também a homeostase celular (CHU; TAO; TASKEN, 2017). Curiosamente, a proteína DRP1 (Figura 1G) não foi imunomarcada nos tecidos SC de ambos os grupos, mas foi marcada no controle positivo apresentado (TAM), demonstrando que o protocolo foi bem realizado, porém a proteína não se apresenta no tecido. Como a DRP1 é a principal mediadora da fissão mitocondrial conhecida até o momento (CHAN, 2006) é possível que a mesma não seja necessária no SC, visto a baixa quantidade de mitocôndrias nos adipócitos deste tecido (BATISTA et al., 2012). Porém, como a dinâmica mitocondrial é necessária para a homeostase energética (CHAN,

2006), pode ser que haja um outro mecanismo de fissão, como mostrado no estudo de Hatch e colaboradores (2014), em que propuseram que pode haver um mecanismo de fissão independente da DRP1, embora ainda não haja evidências claras deste modelo. Desta forma são necessários mais estudos para verificar se o modelo é viável e está presente em nosso modelo.

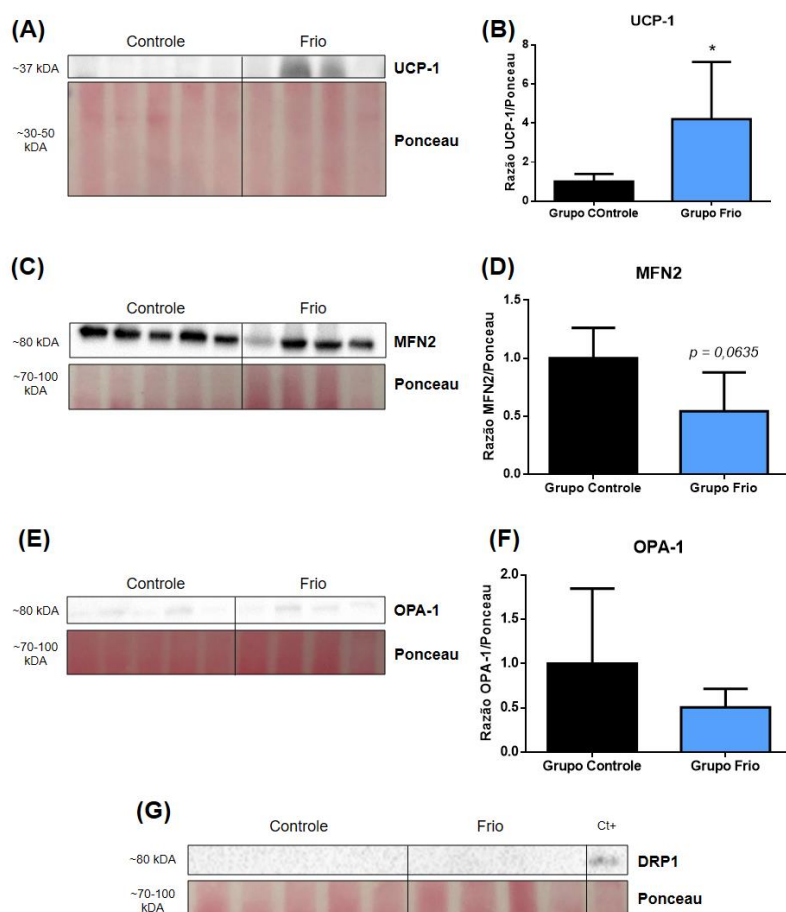


Figura 1: Imuno-marcações e quantificação das proteínas correspondentes. (A) Imuno-marcação para a proteína UCP-1 no SC relativizada pelo carregamento de proteínas totais, marcadas com Ponceau. (B) Quantificação da proteína UCP-1. (C) Imuno-marcação para as proteínas MFN2 no SC relativizada pelo carregamento de proteínas totais, marcadas com Ponceau. (D) Quantificação da proteína MFN2. (E) Imuno-marcação para a proteína OPA-1 no SC relativizada pelo carregamento de proteínas totais, marcadas com Ponceau. (F) Quantificação da proteína OPA-1. (G) Imuno-marcação para a proteína DRP no SC relativizada pelo carregamento de proteínas totais, marcadas com Ponceau. (*) $p < 0,05$. Ct+ = Controle Positivo.

CONCLUSÕES

Com os dados aqui obtidos, há indicações de que há alterações na dinâmica mitocondrial em adipócitos “bege” quando expostos ao frio, devido à tendência de redução da MFN2. Além disso, pode ser também que haja uma perda na capacidade lipolítica e termogênica destas células, mesmo estando sob influência da UCP1. Porém, com a não-

marcação da DRP1, não é possível afirmar se há uma maior fragmentação ou não da rede mitocondrial em adipócitos “bege”. Embora outros estudos propuseram diferentes mecanismos de fissão mitocondrial, até o presente momento, não pode-se afirmar que há uma maior fragmentação da rede mitocondrial no processo de *browning* visto que os outros mecanismos ainda não foram corroborados. Desta forma, futuros estudos devem ser feitos para verificar se há um outro mecanismo de fissão mitocondrial nos adipócitos bege, se eles influenciam diretamente no processo de *browning*, e no controle metabólico deste tecido.

REFERÊNCIAS

BARTELT, A.; HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 1, p. 24-36, 2014.

BATISTA, M. L., JR.; NEVES, R. X.; PERES, S. B.; YAMASHITA, A. S.; SHIDA, C. S.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. **J Endocrinol**, v. 215, n. 3, p. 363-373, 2012.

BENARD, G.; BELLANCE, N.; JAMES, D.; PARRONE, P.; FERNANDEZ, H.; LETELLIER, T.; ROSSIGNOL, R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. **J Cell Sci**, v. 120, n. Pt 5, p. 838-848, 2007.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CHAN, D. C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, n., p. 79-99, 2006.

CHU, D. T.; TAO, Y.; TASKEN, K. OPA1 in Lipid Metabolism: Function of OPA1 in Lipolysis and Thermogenesis of Adipocytes. **Horm Metab Res**, v. 49, n. 4, p. 276-285, 2017.

GAO, A. W.; HOUTKOOPE, R. H. Mitochondrial fission: firing up mitochondria in brown adipose tissue. **EMBO J**, v. 33, n. 5, p. 401-402, 2014.

HATCH, A. L.; GUREL, P. S.; HIGGS, H. N. Novel roles for actin in mitochondrial fission. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 21, p. 4549-4560, 2014.

PETRUZZELLI, M.; SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; CAMPOS-OLIVAS, R.; TSOLI, M.; ALLEN, J.; SWARBRICK, M.; ROSE-JOHN, S.; RINCON, M.; ROBERTSON, G.; ZECHNER, R.; WAGNER, E. F. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. **Cell Metab**, v. 20, n. 3, p. 433-447, 2014.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; VANHOMMERIG, J. W.; SMULDERS, N. M.; DROSSAERTS, J. M.; KEMERINK, G. J.; BOUVY, N. D.; SCHRAUWEN, P.; TEULE, G. J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med**, v. 360, n. 15, p. 1500-1508, 2009.