

Estudo da modulação de receptores PPAR γ a partir da alteração da expressão de PGC-1 α em cultura de células

Palavras-Chave: PGC-1 α , PPAR γ , C2C12

Autores:

Milton Fernando de Almeida Filho, FCA - UNICAMP

Beatriz Botasso Gomes, FCA - UNICAMP

Maíra Maftoum Costa, FCA - UNICAMP/UNIFESP

Prof. Dr. Fernando Moreira Simabuco, FCA - UNICAMP/UNIFESP

Profa. Dra. Maria Claudia Gonçalves de Oliveira (orientadora), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As condições dolorosas crônicas, especialmente as dores musculares crônicas, afetam uma grande parte da população, resultando em impactos econômicos e sociais significativos. No Brasil, 62,4% da população relata alguma manifestação de dor, sendo 58,3% dos casos classificados como crônicos (Machado et al., 2019). O tratamento clássico para condições dolorosas musculares consiste no uso de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Entretanto, nos últimos anos, a prescrição de exercícios físicos regulares tem surgido como ferramenta terapêutica bastante eficiente.

Pesquisas recentes sugerem que o exercício físico regular ative receptores PPAR γ , aumentando respostas anti-inflamatórias no tecido muscular e prevenindo a hiperalgesia crônica através da modulação do fenótipo de macrófagos e das citocinas pró e anti-inflamatórias, evitando assim o estabelecimento da hiperalgesia muscular crônica (de Azambuja et al., 2021). A comunicação entre os receptores PPAR γ e os macrófagos no tecido muscular possivelmente acontece através da sinalização parácrina envolvendo a célula muscular e o sistema imunológico, uma vez que, no modelo de dor muscular crônica, os receptores PPAR γ parecem não estar expressos em macrófagos (de Azambuja et al., 2021). A PGC-1 α tem sido um dos co-ativadores de receptores PPAR γ mais bem estudados e há evidências de que ela é modulada dentro das células musculares com o exercício físico (Granata et al., 2020). Assim, hipotetizamos que o exercício físico é capaz de induzir uma comunicação entre PGC-1 α e PPAR γ dentro da célula muscular esquelética, ativando a liberação de substâncias capazes de modular o fenótipo dos macrófagos para um perfil anti-inflamatório.

Dessa maneira, nosso objetivo foi avaliar se o componente inflamatório associado às alterações de expressão da PGC-1 α em células musculares potencializam as modulações na expressão do receptor PPAR γ no mesmo local.

METODOLOGIA:

Cultura de Células

A linhagem C2C12, células derivadas de músculo esquelético de camundongos, foi cultivada em meio DMEM contendo 10% de SFB a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

Transfecção do Plasmídeo

Para a transfecção do plasmídeo de superexpressão da PGC-1 α (p-CMV-PGC1- α), o reagente PEI (Polietilenoimina) foi empregado. Resumidamente: Misturamos 200 μ L de DMEM com 2,5 μ g de DNA e 17,5 μ L do reagente PEI e incubamos por 15 min. Placas de 6 poços contendo células a uma confluência de 80% receberam essa solução. Após 3 horas, o meio foi trocado por DMEM com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e as células incubadas por 48 horas.

Western Blotting

As proteínas das células foram extraídas usando um tampão de lise para Western Blot (Cell Signaling, USA). A concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de proteína de ácido bicinonínico (BCA) (Cell Signaling, USA). Os extratos com quantidade iguais de proteínas foram tratados com tampão Laemmli enriquecido. Entre 50 e 80 μ g de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12% em um aparelho para eletroforese. Após a eletroforese, as amostras no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (0.45 μ m por poro, Merck). O anticorpo primário utilizado foi o Anti-PGC1 alpha (Goat polyclonal, Abcam, USA) e o anticorpo secundário utilizado foi o Peroxidase AffinipureGoat Anti-Rabbit IgG (Goat polyclonal, Jackson Immunoresearch Laboratories, USA). Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Pierce ECL, ThermoFischer) e, em seguida, as imagens foram reveladas em um fotodocumentador (GBOX, Syngene). As intensidades das bandas foram quantificadas usando o seguinte programa: Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A expressão de beta-actina foi utilizada como controle positivo.

RTq-PCR em tempo real

A extração de RNA total da amostra foi realizada utilizando a técnica de extração com TRIzol (Invitrogen). O cDNA foi preparado a partir do RNA total através da transcrição reversa com o kit cDNA Synthesis (BioRad) conforme instruções do fabricante. A técnica de RTqPCR em tempo real foi feita com o equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) utilizando o sistema Syber Green (Fast SYBR Green Master Mix, Invitrogen). Os parâmetros para a realização do RTqPCR, foram: 1 ciclo à 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos a 95°C por 3 segundos e 60°C com duração de 30 segundos. A normalização dos resultados foi feita com GAPDH. O primers que foram utilizados para a realização da técnica estão descritos na tabela a seguir:

	Primer (5'-3')	Primer (Sequência Reversa 5'-3')	Referências
GAPDH	TTGATGGCAACAATCTCCAC	CGTCCCGTAGACAAAATGG	Graves et al., 2015

		T	
PGC -1 α	AAACTTGCTAGCGGTCCTCA	TGGCTGGTGCCAGTAAGAG	Li et al., 2011

Análise estatística

Para a análise da expressão gênica foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Quantificação da superexpressão de PGC-1 α em C2C12:

Após a transfecção das células, averiguamos o aumento da superexpressão de PGC-1 α através do Western Blotting. A PGC-1 α endógena dificilmente é detectada em condições basais em diversos tecidos de roedores (Gettys et al., 1966), o que está de acordo com os resultados obtidos, uma vez que, os grupos que não passaram pelo processo de transfecção do pCMV-PGC-1 α (grupos controle e GFP) não apresentaram marcações na membrana na altura correspondente à ~110 Kda. Já o grupo CMV-PGC-1 α apresenta uma marcação levemente mais acentuada se analisado qualitativamente em comparação aos outros grupos. Levando em consideração a dificuldade de detecção dessa proteína, podemos sugerir que houve um aumento da expressão da mesma.

Figura 1 – Análise da superexpressão de PGC-1 α

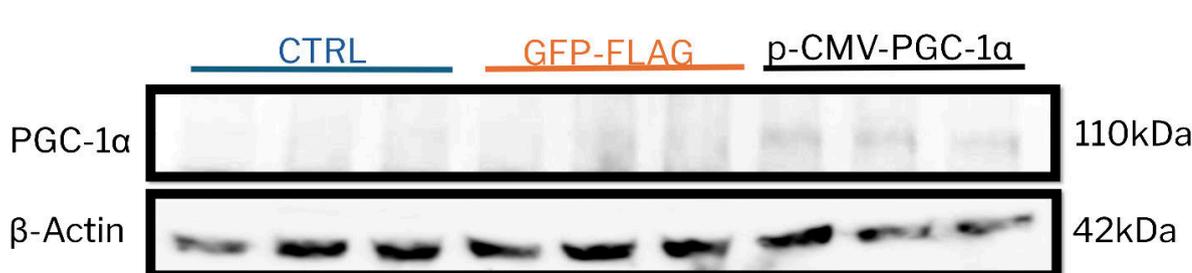


Fig 1. A técnica de Western Blotting mostrou que a transfecção do plasmídeo CMV-PGC-1 α nas células C2C12 é mais acentuada quando comparado ao grupo controle e GFP-FLAG (n=3).

Para confirmação do resultado anterior, realizamos o PCR quantitativo (qRT-PCR) para confirmar a superexpressão do mRNA dessa proteína. Inicialmente, foi feito um teste com duas réplicas técnicas que confirmaram os resultados observados anteriormente, ou seja, que há aumento da expressão da PGC-1 α nos grupos superexpressão (Figura 2). Contudo, o experimento precisa ser repetido com um “n” amostral maior para permitir a realização de teste estatístico, para enfim, confirmarmos a eficácia do plasmídeo p-CMV-PGC-1 α .

Figura 2 – Análise da superexpressão de mRNA de PGC-1 α

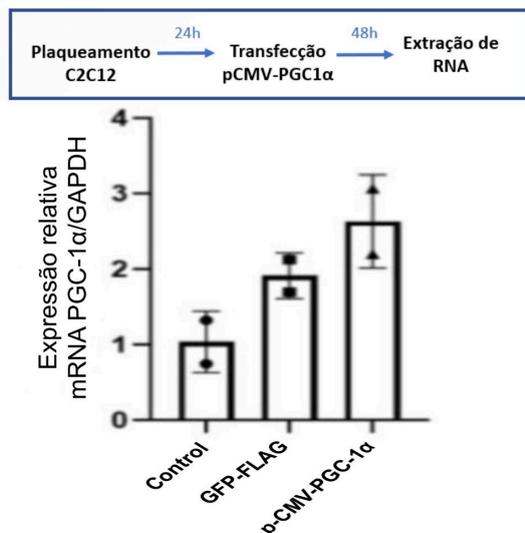


Fig 2. RTq-PCR da expressão relativa mRNA PGC-1alfa/GAPDH. Há aumento do mRNA de PGC-1 α em células C2C12 no grupo p-CMV-PGC-1 α quando comparado aos grupos Controle e GFP-FLAG (n=2).

CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos até o momento não permitem responder se o componente inflamatório associado às alterações de expressão da PGC-1 α em células musculares potencializam as modulações na expressão do receptor PPAR γ no mesmo local.

BIBLIOGRAFIA

MACHADO, Luciana AC et al. Prevalence of pain and associated factors in Brazilian civil servants: an introductory analysis using baseline data from the ELSA-Brasil cohort. *Pain Reports*, v. 4, n. 6, p. e797, 2019.

DE AZAMBUJA, Graciana et al. Regular swimming exercise prevented the acute and persistent mechanical muscle hyperalgesia by modulation of macrophages phenotypes and inflammatory cytokines via PPAR γ receptors. *Brain, behavior, and immunity*, v. 95, p. 462-476, 2021.

GRANATA, Cesare et al. Forty high-intensity interval training sessions blunt exercise-induced changes in the nuclear protein content of PGC-1 α and p53 in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 318, n. 2, p. E224-E236, 2020.

GETTYS, Thomas W.; CHANG, Ji Suk. An Optimized Immunoblotting Protocol for Accurate Detection of Endogenous PGC-1 α Isoforms in Various Rodent Tissues. *Nuclear Receptors: Methods and Experimental Protocols*, p. 7-16, 2019.

GRAVES, Joan P. et al. Quantitative polymerase chain reaction analysis of the mouse Cyp2j subfamily: tissue distribution and regulation. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 43, n. 8, p. 1169-1180, 2015.

LI, Ling et al. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes*, v. 60, n. 1, p. 157-167, 2011.