

INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE DNA MITOCONDRIAL NA RESPOSTA AO DESBALANÇO REDOX EM CÉLULAS HUMANAS

Caroline Moratto Rodrigues de Lima, Lais Y. M. Muta, Nadja C. de Souza Pinto

Depto. de Bioquímica, Instituto de Química

carolmoratto@usp.br

Objetivos

O DNA mitocondrial (mtDNA) codifica 13 polipeptídeos que são subunidades essenciais de 4 complexos da fosforilação oxidativa, de modo que mutações neste genoma resultam no comprometimento das funções mitocondriais e no aumento da produção de oxidantes. Para avaliar como a estabilidade do mtDNA afeta a homeostase celular, esse projeto propõe gerar linhagens celulares com diferentes níveis de mtDNA e analisar a sensibilidade destas a um agente oxidante, o H₂O₂.

Métodos e Procedimentos

Células HeLa, mantidas em DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, 1 mM piruvato e 50 µg/ml uridina, foram tratadas por 2 meses com diferentes concentrações de brometo de etídeo (EtBr), um inibidor específico da DNA polimerase mitocondrial, para induzir a depleção de mtDNA. As concentrações de EtBr foram 5 ng/ml (Bret1), 10 ng/ml (Bret2), 20 ng/ml (Bret3) e 40 ng/ml (Bret4). Ao final dos tratamentos, DNA total foi isolado utilizando o kit DNEasy (Qiagen)

segundo as instruções do fabricante. Os níveis de mtDNA foram quantificados por PCR, como descrito em Mori et al., (2017). A sensibilidade dessas linhagens ao estresse oxidativo foi medida pelo ensaio de sobrevivência clonogênica, com duas concentrações de H₂O₂. Quando indicado, as culturas foram pré-tratadas com o inibidor de p53, PFT-α, por 10 dias e submetidas ao mesmo protocolo de ensaio de sobrevivência.

Resultados

A quantidade de mtDNA nas células tratadas com EtBr foi avaliada pela amplificação relativa de um fragmento mitocondrial normalizado por um fragmento nuclear (Figura 1).

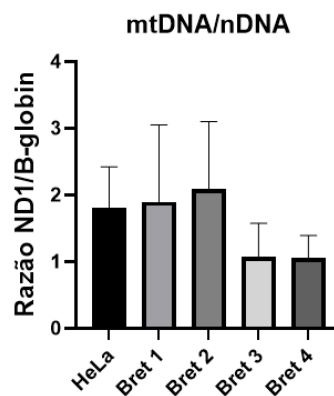


Figura 1. Medida dos níveis de mtDNA em células HeLa tratadas com concentrações crescentes de EtBr, como descrito em Métodos. Os resultados apresentados representam média \pm desvio da média de 2 experimentos independentes.

As concentrações de 5 e 10 ng/ml não induziram diminuição de mtDNA, enquanto as concentrações de 20 e 40 ng/ml causaram depleção de cerca de 50% da quantidade de mtDNA.

As linhagens foram, então, avaliadas para sensibilidade ao H₂O₂, medindo a sobrevivência clonogênica de células tratadas com 10 ou 25 μ M de H₂O₂. Os resultados, apresentados na Figura 2 mostram que todas as linhagens apresentaram sensibilidade dependente de dose. Na dose mais alta, as linhagens depletadas de mtDNA apresentaram menor sobrevivência.

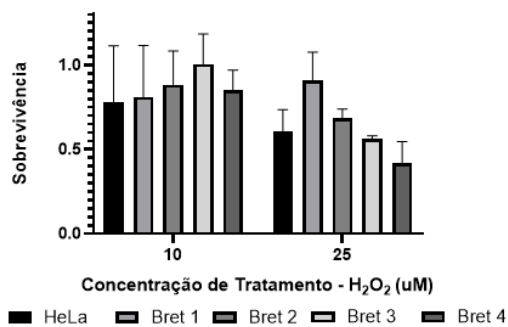


Figura 2. Sobrevivência das linhagens HeLa WT e HeLa Rho⁻ após tratamento 10 ou 25 μ M de H₂O₂. Os resultados são média \pm desvio da média de 3 experimentos independentes, em triplicata

Para verificar se o efeito da quantidade de mtDNA sobre a sobrevivência dependia de p53, as células foram tratadas com PFT- α e a sobrevivência avaliada. Os resultados, apresentados na Figura 3, indicam que o efeito de mtDNA sobre a sensibilidade a H₂O₂ não depende da atividade de p53.

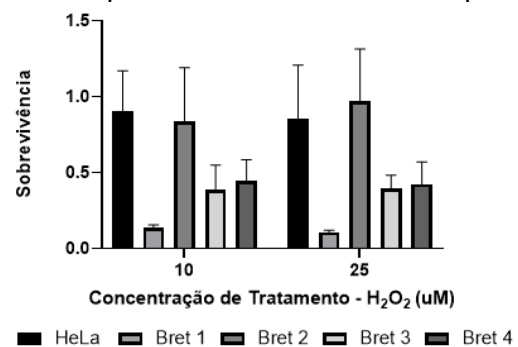


Figura 3. Efeito de PFT sobre a sobrevivência de células HeLa tratadas com 10 ou 25 μ M H₂O₂. Os resultados são média \pm desvio da média de 3 experimentos independentes, em triplicata.

Conclusão

Nossos resultados suportam a hipótese de que a quantidade de mtDNA modula a sobrevivência em condições de estresse redox.

Bibliografia

Mori et al. (2017). Scientific Reports, 7(1): 155.