UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica

Tanes Imamura de Lima

**Controle molecular da função mitocondrial pelos co-reguladores
transcrpcionais PGC-1 α e NCoR1 em células musculares**

Ribeirão Preto
2018

Tanes Imamura de Lima

**Controle molecular da função mitocondrial pelos co-reguladores
transcrpcionais PGC-1 α e NCoR1 em células musculares**

Versão original

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Reis
Silveira

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lima, Tanes Imamura de

Controle molecular da função mitocondrial pelos co-reguladores transcricionais PGC-1 α e NCoR1 em células musculares. Ribeirão Preto, 2018.

108 p. il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Silveira, Leonardo dos Reis.

1. Coreguladores. 2. PGC-1 α . 3. NCoR1. 4. mitocôndria. 5. Células musculares.

Nome: Lima, Tanes Imamura de

Título: Controle molecular da função mitocondrial pelos co-reguladores transcripcionais PGC-1 α e NCoR1 em células musculares.

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dra.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

A minha esposa Cybelle, com amor e gratidão por sua compreensão, carinho, e incansável apoio ao longo do período de desenvolvimento deste trabalho.

A minha filha Liz pelo amor descontraído.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira pela orientação, apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio Chain Bajgelman e à todos do Laboratório de Vetores Virais (LVV-LNBio) pelos ensinamentos em clonagem e produção de linhagens celulares geneticamente modificadas.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade de São Paulo USP-FMRP por me dar a oportunidade de realização do curso de doutorado. Em especial agradeço à todos os docentes do programa que contribuíram direta ou indiretamente para o meu aprendizado técnico e teórico em bioquímica.

Ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC, UNICAMP, Campinas) pelo apoio para a realização dos experimentos. Agradeço especialmente à todos os investigadores principais, equipes e apoio técnico do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo (LAPEM) e do Laboratório de Sinalização Celular (LSC).

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelo apoio para a realização dos experimentos. Agradeço especialmente os investigadores principais e equipes dos laboratórios: Laboratório de Vetores Virais, Laboratório de Modificação Genética, Laboratório de Espectrometria de Massas e Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria.

Aos investigadores prof. Dr. Andre Catic (Baylor College of Medicine, EUA), prof^a. Dr^a. Valentina Perissi (Universidade de Boston, EUA) e ao prof. Dr. Johan Auwerx (Ecole Polytechnique Fédérale, Suíça) pela colaboração neste trabalho. Agradeço também por já terem iluminado o caminho sobre o papel biológico do co-repressor NCoR1.

A todos os amigo(a)s e colaboradores que eu fiz ao longo do doutorado que compartilham o mesmo interesse pela ciência. Espero que todos alcancem seus objetivos e que tenham sucesso nesta árdua jornada.

Aos meus pais por apoiarem e por sempre ajudarem em momentos difíceis.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Lima, T. I. (2017). Controle molecular da função mitocondrial pelos co-reguladores transcricionais PGC-1 α e NCoR1 em células musculares. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A capacidade de sincronizar vias metabólicas a estímulos ambientais é um aspecto central da homeostase em mamíferos. Dentro desse contexto, o controle molecular da função mitocondrial representa um aspecto fundamental e defeitos na integridade desse sistema podem levar a severas perturbações à homeostase celular levando a um amplo espectro de doenças como a obesidade e o diabetes tipo 2. O controle transcricional do metabolismo energético é um processo dinâmico que depende da ação coordenada de fatores de transcrição, enzimas modificadoras de cromatina e co-reguladores transcricionais. Co-reguladores podem agir como interruptores transcricionais ativando ou reprimindo a atividade de receptores nucleares. Neste estudo, demonstramos que o co-ativador PGC-1 α e o co-repressor NCoR1 são importantes mediadores do metabolismo energético e da homeostase redox mitocondrial em células musculares. Nossos resultados sugerem que os efeitos desses co-reguladores são mediados pela transativação do elemento responsivo de PPAR (PPRE) em promotores de seletos grupos de genes. Ainda, a indução da capacidade oxidativa e da defesa antioxidante pelo silenciamento de NCoR1 ou pela expressão de PGC-1 α atenua a produção de espécies reativas de oxigênio e a morte celular induzida por estresse metabólico. Essas evidências sugerem que o equilíbrio entre a ativação e a repressão transcricional em promotores contendo PPREs exerce um papel central na função mitocondrial em células musculares esqueléticas. Coletivamente, os resultados deste estudo indicam que o antagonismo entre os co-reguladores PGC-1 α e NCoR1 é um componente central no controle da função mitocondrial representando uma interface promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento e prevenção da disfunção metabólica.

Palavras-chave: Coreguladores. PGC-1 α . NCoR1. Mitocôndria. Células musculares.

ABSTRACT

Lima, T. I. (2017). Molecular control of mitochondrial function by the transcriptional co-regulators PGC-1 α and NCoR1 in skeletal muscle cells. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The ability to synchronize metabolic pathways to environmental stimuli is a central aspect of mammalian homeostasis. Within this context, the molecular control of mitochondrial function represents a fundamental aspect and defects in the integrity of this system can lead to severe disturbances to cellular homeostasis causing a wide spectrum of pathologies such as obesity and type 2 diabetes. Transcriptional control of energy metabolism is a dynamic process that depends on the coordinated action of transcription factors, chromatin modifying enzymes, and transcriptional co-regulators. Co-regulators can act as transcriptional switches activating or repressing the activity of nuclear receptors. In this study, we demonstrated that the co-activator PGC-1 α and NCoR1 co-repressor are essential mediators of energy metabolism and mitochondrial redox homeostasis in muscle cells. Our results suggest that the effects of these co-regulators are mediated by the transactivation of the PPAR responsive elements (PPREs) in promoters of selected gene groups. Furthermore, the oxidative capacity and antioxidant defense induction by either NCoR1 knockdown or PGC-1 α overexpression attenuates the production of reactive oxygen species and cell death induced by metabolic stress. These evidence suggest that the balance between activation and transcriptional repression in promoters containing PPREs exert a central role in mitochondrial function in skeletal muscle cells. Collectively, the results of this study indicate that the antagonism between the co-regulators PGC-1 α and NCoR1 is a central component of mitochondrial function representing a promising interface for the development of novel therapeutic approaches for the treatment and prevention of metabolic dysfunction.

Key-words: Coregulators. PGC-1 α . NCoR1. Mitochondria. Muscle cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Mitocôndria	11
1.2 Integração transcricional da biogênese mitocondrial	12
1.3 Estrutura e função do co-repressor nuclear NCoR1	15
1.4 Papel do co-repressor NCoR1 no metabolismo energético	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.1 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Cultura das células C2C12	20
3.2 Cultura de células HEK 293T	20
3.3 Silenciamento gênico através de transfecção de RNA interferência (siRNA)	20
3.4 Transfecção de plasmídeos	21
3.5 Western Blotting	21
3.6 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	22
3.7 Consumo de oxigênio	23
3.8 Intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)	23
3.9 Concentração de lactato	23
3.10 Ensaio de Luciferase	24
3.11 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)	24
3.12 Co-imunoprecipitação de extrato nuclear (Co-IP)	24
3.13 Proteômica	25
3.13.1 Fracionamento subcelular	25
3.13.2 Preparação de amostra	27
3.13.3 Análise de espectrometria de massa	27
3.13.3.1 Nanoflow nLC-MS / MS	27
3.13.3.2 Análise de dados brutos LC-MS / MS	27
3.14 Ensaio de iodeto de propídio	28
3.15 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	28
3.16 Número de cópia de DNA mitocondrial	29
3.17 Análises in silico	29
3.18 Construção de vetor lentiviral e expressão estável de PGC-1 α em células C2C12	30
3.18.1 Clonagem do vetor lentiviral	30
3.18.2 Construção da partícula viral e produção da linhagem C2C12 PGC-1 α	32
3.19 Aprovação do estudo	33
3.20 Análise estatística	33

4. ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES	33
4.1 Introdução	33
4.2 Resultados	34
4.2.1 Biogênese mitocondrial durante a miogênese	34
4.2.1 Análise transcriptômica: Vias de sinalização enriquecidas durante a miogênese	37
4.2.2 Análise proteômica: Vias de sinalização enriquecidas durante a miogênese	41
4.2.3 Papel antagonístico dos co-reguladores PGC-1 α e NCoR1 na função mitocondrial durante a miogênese	44
4.2.4 NCoR1 reprime a função mitocondrial durante a miogênese	46
4.2.5 Compostos que induzem o metabolismo oxidativo reduzem os níveis de NCoR1	48
4.3 Discussão	49
4.4 Conclusão	52
5. OS CO-REGULADORES TRANSCRICIONAIS PGC-1α E NCOR1 SÃO MEDIADORES ESSENCIAIS DA HOMEOSTASE REDOX MITOCONDRIAL EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS	52
5.1 Introdução	52
5.2 Resultados	53
5.2.1 PGC-1 α estimula a defesa antioxidante em células do músculo esquelético	53
5.2.2 PGC-1 α é essencial para a detoxificação de ROS durante a diferenciação de C2C12	55
5.2.3 PPAR β regula a expressão das enzimas antioxidantes	57
5.2.4 PGC1 α é crucial para a resposta antioxidante sob níveis elevados de H ₂ O ₂	59
5.2.5 Silenciamento de NCoR1 induz a expressão de SOD2 e atenua os níveis de ROS mitocondrial	61
5.2.6 O tratamento com palmitato induz o ancoramento de PGC-1 α em PPREs de promotores de genes antioxidantes	64
5.2.7 Silenciamento de NCoR1 ou expressão de PGC-1 α atenua a produção de ROS induzida por lipídeos e a morte celular em células musculares	66
5.2.8 Efeito do AICAR em células musculares.	68
5.2.9 AICAR protege miotubos contra a morte celular induzida por lipídeos.	70
5.3 Discussão	74
5.4 Conclusão	76
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. APÊNDICES	88
8.1 APÊNDICE A - Tabelas e figuras	88
8.1.1 Tabelas	88

8.1.2 - Figuras	94
8.2 APÊNDICE B - Produção científica	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mitocôndria

A habilidade de sincronizar vias metabólicas em resposta às flutuações de energia intracelular é um aspecto central na homeostase em mamíferos. Dentro desse contexto, a mitocôndria desempenha um papel fundamental. Mitocôndrias são organelas que estão presentes em todas as nossas células, exceto em células vermelhas do sangue. Elas têm origem endossimbiótica e mantêm alguns vestígios de sua ancestralidade bacteriana incluindo seu genoma circular (mtDNA), a dupla membrana e a capacidade de sintetizar ATP. Interessantemente, durante a evolução, a maioria de seus genes foi transferida ao genoma nuclear conectando essas organelas às células eucarióticas (Vafai and Mootha 2012). Esse processo evolutivo resultou em um complexo sistema de transferência de informações entre o genoma nuclear e mitocondrial. Uma boa ilustração desse fato é que apesar da mitocôndria possuir mais de 1100 proteínas em seu compartimento, o DNA mitocondrial codifica apenas 13 proteínas enquanto o DNA nuclear codifica o restante. Dessa forma, a regulação da homeostase mitocondrial depende no controle fino entre os dois genomas adaptando a função mitocondrial à demanda celular (Quirós et al. 2016).

Apesar de ser comumente aceito que a produção de ATP proveniente da oxidação de substratos de carbonos é a função primária da mitocôndria, essa visão tem ofuscado outras importantes funções desta organela como, por exemplo, o controle da homeostase redox, regulação dos níveis de cálcio, síntese de purinas e pirimidinas e regulação do processo de morte celular programada (Dominy and Puigserver 2013). Assim, o controle molecular da função mitocondrial representa um aspecto fundamental na fisiologia em mamíferos e defeitos na integridade desse sistema podem levar a perturbações severas à homeostase celular levando a um amplo espectro de doenças como a obesidade e o diabetes tipo 2 (Patti and Corvera 2010).

O controle transcricional do metabolismo energético é um processo dinâmico que depende fortemente da ativação coordenada de fatores de transcrição, enzimas modificadoras de cromatina e co-reguladores nucleares (Mouchiroud et al. 2014). Evidências recentes têm demonstrado que co-reguladores podem agir como importantes interruptores metabólicos ativando ou reprimindo a atividade de receptores nucleares associados ao metabolismo oxidativo e à biogênese mitocondrial (Pérez-Schindler et al. 2012; Yamamoto et al. 2011; Mouchiroud et al. 2014). Essas evidências

sugerem que a regulação desses complexos em sequências cis-regulatórias localizadas em promotores e *enhancers* de genes mitocondriais é um componente crítico desse processo fornecendo à célula capacidade de regular prontamente a expressão de genes mitocondriais em resposta a estímulos ambientais. O papel emergente de co-ativadores e co-repressores no metabolismo energético celular destaca a atuação epigenética na homeostase metabólica e revela uma interessante oportunidade terapêutica para o tratamento e controle da disfunção metabólica.

1.2 Integração transcricional da biogênese mitocondrial

O número e a forma de mitocôndrias estão em constante mudança em resposta à demanda energética celular. Essas mudanças são influenciadas por uma complexa rede de vias moleculares que orquestra a expressão de genes mitocondriais. Avanços substanciais na área têm expandido nosso entendimento sobre a biogênese mitocondrial. Atualmente, é reconhecido que a biogênese mitocondrial é um processo dinâmico que depende da coordenação integrada de complexos transcricionais. Diversos fatores de transcrição que regulam a expressão de genes mitocondriais foram identificados expandindo nossa visão sobre as vias de sinalização que governam a biogênese mitocondrial.

Estudos pioneiros do promotor mitocondrial do gene citocromo c identificaram os fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) como reguladores cruciais de sua transcrição (Evans and Scarpulla 1989). Estudos posteriores demonstraram que ambos NRF-1 e NRF-2 controlam a expressão de outros complexos mitocondriais assim como proteínas de importação mitocondrial e biossíntese de heme (Carter et al. 1992; Gugneja et al. 1995; Scarpulla 2008). Ambos NRFs regulam a expressão do fator de transcrição A (TFAM) e fatores de transcrição B (TFBs) que são reguladores críticos da replicação e transcrição do DNA mitocondrial (Gleyzer et al. 2005).

Outro fator de transcrição que tem sido extensivamente estudado e associado ao metabolismo mitocondrial é o fator de transcrição ativado por AMP cíclico (CREB). O CREB promove a expressão de genes mitocondriais através da sua ligação e ativação do elemento responsivos à AMP cíclico (CRE) em promotores de genes mitocondriais (De Rasmo et al. 2009; Gopalakrishnan and Scarpulla 1994). Interessantemente, o promotor de um dos principais co-ativadores mitocondriais, o co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissomo (PGC-1 α) contém sítios CRE e é fortemente induzido pela ativação do CREB (Handschin et al.

2003). Ainda, além de seu papel nuclear, o CREB também se liga em CREs no DNA mitocondrial ativando a expressão de genes que codificam proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (De Rasmio et al. 2009). Interessantemente, um estudo recente demonstrou que a indução de genes mitocondriais mediado por CREB é regulado pelo *turnover* do corepressor NCoR1 nos promotores desses genes (Catic et al. 2013).

Além dos fatores de transcrição (TFs) mencionados, um seleto grupo de receptores nucleares (NRs) tem sido descrito como importantes sinalizadores para a regulação da biogênese mitocondrial. A classe dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) tem um papel crucial no metabolismo oxidativo em diversos tecidos. Especificamente, o PPAR α promove a expressão de genes envolvidos na beta-oxidação mitocondrial (Gulick et al. 1994). O PPAR γ promove a biogênese mitocondrial no tecido adiposo branco (Wilson-Fritch et al. 2004) e induz a expressão de genes envolvidos no programa termogênico do tecido adiposo marrom (Puigserver et al. 1998). Finalmente, a ativação do PPAR β causa o remodelamento de fibras musculares para fibras mais oxidativas através da expressão de genes mitocondriais (Narkar et al. 2008).

Os receptores do hormônio da tireoide (TRs) promovem a biogênese mitocondrial atuando em elementos responsivos da tireoide (TREs) no genoma nuclear e mitocondrial (Weitzel and Iwen 2011). Particularmente, observações prévias identificaram uma isoforma truncada de TR (p43) na mitocôndria que ancora em várias sequências TRE no genoma mitocondrial estimulando a transcrição (Casas et al. 1999). Outra classe de NRs que estimula fortemente a biogênese mitocondrial é a classe dos receptores relacionados ao estrogênio (ERRs). ERR α e ERR β induzem a expressão de genes mitocondriais, a oxidação de ácidos graxos e a mudança do perfil metabólico de fibras musculares tornando-as mais oxidativas (Narkar et al. 2008; Fan and Evans 2015; Rangwala et al. 2010). Interessantemente, esses NRs não possuem ligantes conhecidos sendo considerados receptores órfãos. O recrutamento de co-ativadores e co-repressores em ERRs parecem regular a sua atividade. Estudos prévios identificaram PGC-1 α e PGC-1 β como co-ativadores e o co-repressor nuclear 1 (NCoR1) e a proteína de interação ao receptor 140 (RIP140) como co-repressores de ERRs (Mootha et al. 2004; Seth et al. 2007; Schreiber et al. 2004; Yamamoto et al. 2011).

Co-ativadores transcricionais normalmente não se ligam diretamente ao DNA. Eles agem controlando a atividade de diversos NRs e TFs na cromatina favorecendo uma resposta transcricional unificada frente a desafios celulares. O co-ativador PGC-1 α é considerado um regulador crucial da biogênese e função mitocondrial. PGC-1 α induz a expressão de genes mitocondriais através da ativação de NRFs, ERR α e PPARs (Dominy and Puigserver 2013; Scarpulla 2008; Scarpulla et al. 2012). Dessa forma, o eixo de sinalização do PGC-1 α tem sido extensivamente explorado para o tratamento de doenças metabólicas (Viscomi et al. 2011; Arany et al. 2008). Proteínas que afetam a atividade do PGC-1 α como as deacetilases dependentes de NAD⁺, SIRT1 e SIRT3, podem indiretamente induzir a biogênese mitocondrial (Cantó et al. 2015).

Quinases que atuam como sensores energéticos representam uma importante camada de regulação da biogênese mitocondrial. A proteína quinase de AMP ativada (AMPK) é uma das mais estudadas envolvidas no metabolismo energético. A AMPK é ativada quando os níveis intracelulares de ATP diminuem. Uma vez ativada, a AMPK fosforila diversos alvos associados à biogênese mitocondrial como o PGC-1 α e SIRT1 (Kahn et al. 2005; Jäger et al. 2007) ativando vias de oxidação de ácidos graxos e transporte de glicose (Kahn et al. 2005). Similarmente à AMPK, a quinase dependente de cálcio calmodulina (CaMK) e a quinase ativada por mitógeno (p38 MAPK) também ativam o PGC-1 α e a expressão de genes mitocondriais sugerindo que são importantes elementos no controle da biogênese mitocondrial (Wu et al. 2002; Wright et al. 2007).

Coletivamente, essas evidências definem um panorama dinâmico e complexo dos principais componentes envolvidos na biogênese mitocondrial. As múltiplas camadas de regulação as quais sinais externos são amplificados e convertidos em ativação transcricional parecem depender de etapas orquestradas nas quais as quinases sentem o sinal, ativam co-reguladores transcricionais, que por sua vez estimulam a atividade de NRs e TFs em elementos regulatórios do genoma nuclear e mitocondrial e, por fim, induzem a transcrição de seletos grupos de genes mitocondriais (Fig. 1).

Figura 1. Ilustração da sinalização anterógrada envolvida na biogênese mitocondrial. Estímulos ambientais como, status energético, níveis de cálcio intracelular e ativação do receptor β -agonista, ativam quinases que atuam em vias de sinalização envolvidas na dissociação de co-repressores e indução de co-ativadores em fatores de transcrição e receptores nucleares. A programação transcricional da biogênese mitocondrial mediada pela co-ativação de complexos transcricionais ocorre através da transativação de elementos responsivos localizados em promotores nucleares de genes mitocondriais induzindo a expressão de genes mitocondriais e de fatores de transcrição envolvidos na transcrição do genoma mitocondrial.

1.3 Estrutura e função do co-repressor nuclear NCoR1

A mudança de repressão para ativação transcricional é temporalmente controlada pela associação de co-ativadores e dissociação de co-repressores em NRs e TFs. Co-reguladores normalmente agem como plataformas de ancoramento de enzimas modificadoras de cromatina

como as histonas acetil-transferases (HATs) que usualmente estimulam a transcrição e histonas deacetilases (HDACs) que reprimem a transcrição gênica. Este distinto interactoma funcional de co-reguladores é exemplificado pelo fato de co-ativadores estarem frequentemente associados à HATs e co-repressores à HDACs. Existe um mecanismo dinâmico de interações transientes entre TFs/NRs e co-reguladores sugerindo que TFs/NRs podem atuar como moléculas adaptadoras para co-reguladores que irão determinar o destino transcricional de seus genes alvos. O fato de NRs, após a interação do ligante, dissociarem de seus co-repressores para recrutar co-ativadores é uma ilustração apropriada desse conceito (Perissi and Rosenfeld 2005).

Do ponto de vista molecular, o corepressor nuclear NCoR1 é um dos co-repressores mais estudados. NCoR1 e seu homólogo SMRT foram descobertos através de estudos que buscavam entender o mecanismo de repressão de NRs já que havia sido demonstrado que esses co-repressores se associavam em receptores da tireoide e receptores de ácido retinóico reprimindo seus respectivos genes alvos (Chen and Evans 1995; Hörlein et al. 1995). Estudos posteriores demonstraram que esses co-repressores também podem reprimir fatores de transcrição como o FOXP1 (Jepsen et al. 2008), NFkb (Perissi et al. 2004) e CREB (Catic et al. 2013). Apesar do NCoR1 interagir com diversas HDACs, a atividade repressora de NCoR1 parece depender especificamente da HDAC3 já que ambos possuem forte associação (Li et al. 2000) e cistromas similares (Emmett et al. 2017). Ainda, a atividade catalítica da HDAC3 requer a associação direta com NCoR1 (Guenther et al. 2001).

A sequência consenso do NCoR1 tem aproximadamente 7.500 pares de base e codifica uma proteína grande composta por 2.500 aminoácidos contendo diversos domínios funcionais com poucas regiões enoveladas (Perissi et al. 2010). A região responsável pela atividade de repressão e de-acetilação de histonas consiste de 3 domínios repressores e domínios SANT (Jepsen and Rosenfeld 2002; Watson et al. 2012; Guenther et al. 2001). Na porção carboxi-terminal da proteína, existem 3 domínios que interagem com os domínios de associação com ligantes de NRs na ausência de ligantes (Webb et al. 2000). Esses domínios também contém motivos ricos em isoleucina chamados de CoRNR box que interagem com o bolso hidrofóbico no NR (Hu and Lazar 1999; Perissi et al. 1999). Quando há interação do ligante, ocorre uma alteração conformacional do NR causando a dissociação do co-repressor e usualmente a associação de um co-ativador sugerindo que essa mudança é mutuamente exclusiva.

Além de sua associação com HDAC3, TFs e NRs, outras proteínas interagem com NCoR1, como a TBL1 e sua homóloga TBLR1, as quais parecem estar envolvidas na degradação do NCoR1 através do recrutamento de proteínas da via ubiquitina proteassoma, e a proteína G supressora 2 (GPS2) (Webb et al. 2000; Zhang et al. 2002). Essas interações mais estáveis formam o complexo central do NCoR1. Entretanto, o amplo papel biológico desse co-repressor e a sua estrutura sugerem a existência de um mecanismo dinâmico envolvendo interações transientes de maneira contexto específicas. De fato, diversas interações transientes de TFs com NCoR1 foram reportadas e algumas delas possuem papéis importantes no metabolismo energético (Figura 2).

Figura 2. Interactoma funcional do co-repressor NCoR1 e de seus respectivos alvos. Imagem ilustrativa de rede de interação física de proteínas associadas ao NCoR1 produzida através do software BioGrid 3.4.

1.4 Papel do co-repressor NCoR1 no metabolismo energético

O NCoR1 reprime a maioria dos NRs envolvidos na biogênese mitocondrial. Pistas sobre o papel do NCoR1 no metabolismo energético foram inicialmente demonstradas pelo efeito de isoformas truncadas de NCoR1 no fígado. A expressão fígado-específica de uma isoforma mutada de NCoR1, a qual compete com a proteína endógena, bloqueia a repressão transcricional basal do receptor da tireóide (TR) causando indução da proliferação celular (Feng et al. 2001). Ainda, a deleção dos domínios de interação do NCoR1 com TR no fígado aumenta a expressão de genes alvos do TR (Astapova et al. 2008). Estudos posteriores demonstraram que esses camundongos apresentam aumento no gasto energético sugerindo indução na função mitocondrial, possivelmente pelo aumento da sensibilidade do TR ao hormônio da tireoide em diversos tecidos (Astapova et al. 2011). Estendendo esse conceito, um estudo recente demonstrou que a fosforilação do NCoR1 no resíduo de serina 1460 induz o recrutamento do NCoR1 aos elementos responsivos de PPAR e ERR causando a repressão de diversos genes mitocondriais controlados por $ERR\alpha$ e $PPAR\alpha$ (Jo et al. 2015). Ainda, a deleção fígado-específica de NCoR1 induziu a transcrição de genes da fosforilação oxidativa mitocondrial e genes relacionados às vias do $PPAR\alpha$ e $ERR\alpha$ confirmando o papel da de-repressão do NCoR1 na trans-ativação mediada pelos NRs (Jo et al. 2015). Similarmente ao fenótipo encontrado nos animais com a deleção do NCoR1 no fígado, a deleção do NCoR1 no músculo esquelético também causa de-repressão de $ERR\alpha$ e $PPAR\beta$, a isoforma predominante de PPAR no músculo esquelético, aumentando a capacidade oxidativa e a tolerância ao exercício físico (Yamamoto et al. 2011). Interessantemente, através da análise transcriptoma, outro estudo demonstrou uma sobreposição de genes do metabolismo de ácidos graxos induzidos pela deleção do NCoR1 ou expressão de PGC-1 α no músculo esquelético (Pérez-Schindler et al. 2012). Essas evidências sugerem um possível papel antagônico desses co-reguladores na regulação do metabolismo oxidativo no tecido muscular.

A atividade transcricional é finamente controlada pela proteólise de reguladores transcricionais mediada pelo sistema ubiquitina proteassoma (UPS) (Maneix and Catic 2016). Esse mecanismo dinâmico possui um papel crítico no recrutamento e dissociação de fatores de transcrição em promotores e *enhancers*. Assim como co-ativadores transcricionais, estudos prévios têm demonstrado que repressores são fortemente regulados pelo UPS (Lonard and O'Malley 2009; Perissi et al. 2004). Usando um ensaio para determinar regiões na cromatina onde

proteínas associadas ao DNA são marcadas para degradação, Catic *et al.* revelaram que a degradação de proteínas associadas ao DNA é altamente enriquecida em promotores nucleares de genes mitocondriais que correlaciona positivamente com os níveis de transcrição desses genes (Catic et al. 2013). Interessantemente, demonstraram que esse fenômeno é regulado pela degradação do NCoR1 e de-repressão do CREB em promotores de genes mitocondriais sugerindo um novo mecanismo no qual a degradação do NCoR1 possui um papel central na expressão de genes mitocondriais mediada pela proteólise (Catic et al. 2013).

Os efeitos antagônicos de co-ativadores e co-repressores no metabolismo oxidativo revelam como a regulação transcricional precisa ser finamente sincronizada para atender ao requerimento energético celular. Esse mecanismo provavelmente evoluiu para fornecer uma rápida e eficiente resposta transcricional às flutuações agudas de energia. Proporciona um sofisticado sistema com forças opostas que agem sinergicamente para regular a transcrição. Nesse contexto, o corepressor NCoR1 parece ser um componente fundamental no controle molecular do metabolismo energético. Entretanto, o seu papel na função mitocondrial em células do músculo esquelético ainda não foi elucidado. Ainda não se sabe, por exemplo, qual o papel do NCoR1 em um contexto dinâmico onde há um alto requerimento da função mitocondrial como, por exemplo, durante a diferenciação de células musculares. Ainda, não há estudos sobre o papel do NCoR1 na homeostase redox mitocondrial apesar de seus respectivos alvos, incluindo PPAR e ERR, terem papéis importantes na regulação da defesa antioxidante. Finalmente, o mecanismo de ativação transcricional da biogênese mitocondrial mediado pela dissociação de co-repressores e associação de co-ativadores em sequências regulatórias de promotores de genes mitocondriais ainda não está estabelecido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Investigar o papel do co-ativador PGC-1 α e do co-repressor NCoR1 na função mitocondrial em células musculares.

2.1 Objetivos específicos

- ❖ Investigar as vias de sinalização envolvidas na função mitocondrial durante a diferenciação de células musculares;
- ❖ Investigar o papel do co-ativador PGC-1 α e do co-ativador NCoR1 na função mitocondrial durante a diferenciação de células musculares;
- ❖ Investigar o papel do co-ativador PGC-1 α e do co-ativador NCoR1 na homeostase redox mitocondrial em células musculares;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura das células C2C12

As células C2C12 foram cultivadas em meio DMEM contendo soro fetal bovino (10%). As células foram plaqueadas em placas de 6, 12, ou 96 poços com uma confluência de 70% e a diferenciação realizada através da troca do meio DMEM, para DMEM contendo 2% de soro de cavalo, durante 5 dias. Após este período, os experimentos foram realizados.

3.2 Cultura de células HEK 293T

As células 293T de rim embrionário humano (HEK 293T) foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal. Para os experimentos, 2×10^5 células por poço foram plaqueadas em placas de 6 poços.

3.3 Silenciamento gênico através de transfecção de RNA interferência (siRNA)

Mioblastos foram transfectados com oligos de siRNA específicos contra a sequência de mRNA de PGC-1 α , PPAR β , PPAR α , e PPAR γ (Sigma-Aldrich). As células foram semeadas em placas de 12 poços a 200×10^3 células / poço. 48 h antes da diferenciação, o meio celular foi alterado para 800 μ L de meio OPTIMEM. 120 pmol - oligonucleótidos de siRNA específicos foram misturados com 5 μ L de Lipofectamine 3000 (Life Technologies, EUA) em meio OPTMEM (200 μ L) e adicionados às células no início do processo de diferenciação. Após 12 h, as células

foram lavadas com PBS e foi adicionado soro de cavalo contendo DMEM (2%). Os experimentos foram realizados após a diferenciação em miotubos.

3.4 Transfecção de plasmídeos

Mioblastos foram transfectados através do reagente Lipofectamina 3000 em meio Opti-MEM de acordo com o fabricante (Life Technologies). O complexo DNA/lipossomo foi adicionado à cultura celular (~60% de confluência). 12 horas após a transfecção, as células foram lavadas com PBS e o meio contendo HS (2%) foi adicionado. Os experimentos foram realizados após 5 dias de diferenciação. As células do grupo controle foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3 ou pCDNA-FLAG.GFP.

Tabela 1. Lista de plasmídeos usados no estudo.

Plasmídeo	Uso
pCDNA-3.1	Controle
pCDNA-GFP	Controle
pCMV-NCoR1	Expressão de NCoR1
pLKO-shScrambled	Controle
pLKO-shNCoR1	Silenciamento de NCoR1
pCDNA-HA-PGC-1 α	Expressão de PGC-1 α
pGL3 tk-PPRE-Luc	Repórter PPRE
pGL3 sv40 Renilla	Controle de Luciferase

3.5 Western Blotting

As proteínas foram coletadas com tampão RIPA na presença de inibidores de fosfatases e proteases. As concentrações de proteínas foram determinadas através do reagente de Bradford (Bio-Rad) ou BCA (Invitrogen). O preparo das amostras foi realizado com adição de 25 μ L do tampão de amostra 5x (Glicerol 50%, Tris 312,5 mM, DTT 250 mM, SDS 10%, Azul de Bromofenol 0,05%) em 100 μ L de proteína total obtida. Logo após, as amostras foram incubadas por 5 min à 95 °C no aparelho Thermomixer Comfort (Eppendorf). O tampão utilizado para a corrida eletroforética foi o Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3,

Sigma Aldrich). 30 µg de proteína isolada de células C2C12 e 100 µg de células de cultura primária de miócitos de rato foram aplicadas e separadas por eletroforese em gel de acrilamida (10%) em equipamento Mini-Transblot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) e, logo em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose ou PVDF (GE Healthcare Life Sciences) usando o aparelho Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). O bloqueio de ligações não específicas foi feito em tampão TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween®20) com 10% de leite durante 60 min. As membranas foram incubadas por 16 horas a 4 °C com o anticorpo primário: PGC-1alfa (Calbiochem, ST1202), PGC-1alfa (Santa Cruz, H300), NCoR1 (Cell signaling), PPARβ (Santa Cruz), SOD2 (Santa Cruz, H), GPx1 (Cell Signaling, 9272), GPx1 (Abcam, ab22604), catalase (Cell signaling), pAMPK (Cell signaling), pCAMKII (Abcam), Cleaved Caspase 3 (Cell signaling), CREB (Cell signaling), pCREB (Cell signaling, 87G3), AMPK (Cell signaling) e β-actina, Sc-47778). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP durante 60 min à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o reagente ECL da fornecedora Amersham (GE Healthcare Life Sciences) como descrito pelo fabricante. As imagens foram obtidas utilizando o sistema de imagem ChemiDoc (Bio Rad) e a densitometria de banda de proteína foi determinada utilizando o software ImageLab (BioRad).

3.6 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com o fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para análises de PCR em tempo real, o RNA foi reversamente transcrito utilizando reagente Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). A expressão relativa de mRNAs foi determinada após normalização utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001). A PCR quantitativa foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems). A tabela das sequências senso e antisense dos genes analisado pode ser encontrada no Apêndice D.

3.7 Consumo de oxigênio

As células foram mantidas em placas de 6 poços ou garrafas de 75 cm² após transfecção como descrito anteriormente. Após seleção e tratamento com ácido palmítico (500 µM), as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.000 g, 25° C durante 5 min. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 5,6 mM de glicose, pH 7,3 e contados. O consumo de oxigênio foi monitorado através do pacote de software Oroboros Oxygraph-2K e DatLab (OROBOROS, Innsbruck, Áustria) para a aquisição de dados (intervalos de tempo de 2 segundos) e análises.

3.8 Intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

Como células C2C12, com uma densidade de 2×10^5 células/poço, foram cultivadas em placas de cultura de células de 6 poços. Após uma diferença, como as células foram recolhidas com uma adição de ácido perclórico (0,5 M) e depois centrifugadas a 7.000 g durante 10 min. O pH de cada amostra foi ajustado para 7,3 com KHCO₃. Para uma detecção de citrato, utilizou-se tampão Tris-EDTA (pH 8) a 25° C em reação na presença do substrato NADH (450 µM) diluído em tampão carbonato (pH 9), citrato liase (8,8 mU/mL) e malato desidrogenase (260 mU/mL) diluído em PBS sem cálcio (pH 7,3). Para detectar α-cetoglutarato, utilizou-se tampão fosfato em pH 6,8 e 25° C em reação na presença de glutamato desidrogenase (9 U/mL), amônia (36 mM), ADP (2 mM) e NADH (450 µM). Para detectar o malato, utilizou-se tampão hidrazina-glicina (pH 9) a 37° C em reação na presença de malato desidrogenase (0,6 U/ mL) e NAD⁺ (15 mM). Para detecção de oxaloacetato, utilizou-se tampão fosfato (pH 6,8) a 25° C em reação na presença de malato desidrogenase (0,22 U/mL) e substrato de NADH (450 µM). Como curvas padrões de construções de acordo com consumo/produção de NADH, de acordo com a emissão em 360 nm e excitação em 460 nm.

3.9 Concentração de lactato

O meio DMEM foi retirado e as células foram incubadas com PBS a 37°C durante 3 minutos. O PBS foi recolhido e a concentração de lactato foi determinada utilizando enzima lactato desidrogenase (1 µg/0,2 mL) em Tris-HCl 100 mM pH 7,2 na presença de NAD⁺ 15 mM. A fluorescência de NADH foi determinada com o comprimento de onda de excitação de 360 e o comprimento de onda de emissão de 460 nm. Como controle positivo, rotenona (1 µM) foi

utilizada para inibir a ATP sintase e conseqüentemente a produção de energia oxidativa. A concentração de lactato foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações crescentes de lactato.

3.10 Ensaio de Luciferase

Os ensaios de Luciferase foram realizados em placas de 24 poços utilizando células C2C12 (miócitos e miotubos) e HEK 293. As células a 80% de confluência foram transfectadas usando Lipofectamina 3000 (Invitrogen) com 0,02 µg de pRL-SV40 (E2231; Promega), 0,2 µg de pPPRE X3-TK-luc (1015; Dr. Bruce Spiegelman; Addgene), 0,3 µg de promotor de pCMV-NCoR1 (doação de Dr. Mitchell Lazar) (23), 0,3 µg pCDNA3.1 HA PGC-1α (doação Dr. Jorge Ruas). A quantidade total de DNA plasmidial foi mantida constante a 0,8 µg por poço utilizando o plasmídeo de controle pCDNA 3.1 (Addgene). 24 h depois das células de transfecção foram lisadas com 100 µL de tampão de lise passivo 1 × (Promega) e a atividade de luciferase foi medida em 20 µL de lisado em placa branca de 96 poços (costar) utilizando o sistema de ensaio Dual luciferase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A atividade da luciferase Renilla (pRL-SV40) foi utilizada para a normalização.

3.11 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Para avaliar o recrutamento de NCoR1 ou PGC-1α nos promotores murinos de SOD2, GPx1, UCP3, catalase e PDK4 realizamos um ensaio de imunoprecipitação de cromatina de acordo com o fabricante (MAGnify Chromatin Immunoprecipitation System, ThermoFisher) utilizando 200 µg de cromatina por IP. Todos os primers utilizados neste trabalho foram projetados para flanquear os picos de ligação PPAR/RxR e NCoR1 sobrepostos nos promotores SOD2, GPx1, UCP3, catalase e PDK4 através de análises prévias de ChIPseq dos receptores nucleares e co-repressor.

3.12 Co-imunoprecipitação de extrato nuclear (Co-IP)

Para estudos de Co-IP, a imunoprecipitação foi realizada com 2 g de anticorpo de PPARβ (Santa Cruz F10), e os imunoprecipitados resultantes foram utilizados para análises de Western Blot. As células (5×10^6) foram raspadas de placas de 10 cm, transferidas para tubos de 1,5 mL e

centrifugadas por 1.500 RPM/5min. Após o descarte do sobrenadante o pellet foi ressuspensionado em 300 µL de buffer STM frio contendo 250 mM sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM MgCl₂. Foi realizado a lise celular através de 10 passagens através de uma agulha calibre 22. O lisado foi mantido no gelo por 30 min e centrifugado a 1000g por 15 min. O pellet foi ressuspensionado em 300 µL de tampão STM e centrifugado a 1.000 g durante 15 min. O pellet nuclear foi ressuspensionado em 200-500 µL de tampão de lise passiva contendo 50 mM Tris HCl, pH 7,4, 1% NP 40 , 50 mM NaCl, 10% glycerol , 1 mM EDTA. O extrato foi mantido em constante agitação durante 30 minutos a 4° C. Em seguida, foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 RPM. O sobrenadante foi transferido e a quantificação de proteínas foi realizado pelo método de Pierce (Smith et al. 1985). 1 mg de lisado foi utilizado por reação de imunoprecipitação diluído em PBS ou diretamente no tampão de lise NP40 mais inibidores de protease. Os lisados foram previamente pré-incubados com 20 µl de 50% de proteína A-sepharose/proteína G-agarose por 1 mL de lisado para limpar o extrato de ligações inespecíficas. Essa incubação foi realizada a 4°C por 1 hora em agitação com subsequente centrifugação a 14.000 RPM/4°C por 10 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL. Alíquotas de 5% do volume total foram guardadas como *Input*. Para cada reação de IP, foi adicionado 2µg de anticorpo. O extrato/anticorpo foi incubado a 4°C durante 16 horas em agitação. Para as reações controles foram adicionados anti-IgG da mesma espécie do anticorpo primário. Em seguida, foram adicionados 20 µl de proteína A/G mais Agarose (SC-2003) ou 20 µL de 50% de proteína A-sepharose/proteína G-agarose. Foi incubado em agitação por 2 horas a 4°C e, em seguida, centrifugado por 4.000 RPM/5 min por 4°C. O extrato foi lavado 5x com PBS com centrifugações de 4.000 RPM/5 min por 4°C a cada lavagem. Finalmente, foi adicionado 15-20 µl de tampão de amostra redutora 2x (Laemmli) no extrato e fervido por 10 minutos. As amostras foram congeladas em -80 ou usadas para western blotting imediatamente.

3.13 Proteômica

3.13.1 Fracionamento subcelular

As células completamente diferenciadas (suplementar 1) foram lavadas com PBS frio, raspadas das garrafas de cultura e transferidas para um tubo frio de 1,5 mL. As amostras foram sedimentadas por centrifugação a 250 g durante 10 minutos a 40 ° C. Os pellets foram ressuspensos

em 300 μ L de tampão STM contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, sacarose 250 mM e inibidores de fosfatase e protease (Sigma-Aldrich). As células foram lisadas com 10 passagens através de uma agulha calibre 22 e mantidas em gelo por 30 minutos. Durante este tempo, o homogeneizado foi inspecionado para a lise celular através de coloração com azul de tripan. As células lisadas foram submetidas a vórtex à velocidade máxima durante 10 segundos e centrifugadas a 1.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante contendo a fração citosólica foi transferido para um tubo frio e mantido em gelo enquanto o pellet contendo a fração de núcleos foi ressuspensa em tampão STM de 300 μ L, submetido a vórtex à velocidade máxima durante 10 segundos e centrifugado a 500 g durante 15 minutos. O sobrenadante contendo detritos celulares foi descartado. Este passo foi repetido duas vezes para eliminar resíduos de células. O extrato nuclear foi ressuspensa em 200 μ L de tampão NE contendo NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, HEPES 20 mM pH 7,9, glicerol a 10% e inibidores de protease e fosfatase.

O homogeneizado nuclear foi lisado com 10 passagens através de uma agulha calibre 22 seguido por 3 rodadas de sonicação de 10 segundos em amplitude de 31% (Vibracell sonicator) com pausas de 1 minuto no gelo. O lisado foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos (4° C). O sobrenadante foi transferido para um tubo frio e armazenado a -80°C para posterior quantificação e digestão protéica. O sobrenadante contendo a fração citosólica foi centrifugado a 800 g durante 10 minutos para a purificação de proteínas citosólicas. O sobrenadante foi transferido para um tubo frio de 1,5 mL. O sobrenadante foi então centrifugado a 11.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante contendo a fração citosólica foi transferido para um tubo frio de 1,5 mL. O pellet resultante foi descartado. As proteínas citosólicas foram precipitadas pela adição de 4 volumes de 100% de acetona na fração citosólica e incubação a -20 ° C por 12 horas. Os extratos proteicos precipitados foram centrifugados a 12.000 g durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensa em 150 μ L de tampão STM e submetido à sonicação uma vez a uma amplitude de 31% durante 10 segundos. Este homogeneizado contendo as proteínas citosólicas foi congelado e armazenado a -80°C para posterior quantificação e digestão de proteínas. Todos os buffers e procedimentos foram modificados de (Dimauro et al. 2012), (Cox and Emili 2006) e (Paulo et al. 2013).

3.13.2 Preparação de amostra

As proteínas (20 µg) foram digeridas com tripsina durante 16 h a 37 ° C. As amostras foram reduzidas com TDT e alquiladas com iodoacetamida para análises de espectrometria de massa como descrito por Villén e Gygi (Villén and Gygi 2008). Os peptídeos derivados das amostras digeridas com tripsina foram dessalinizados por pontas de fase (Rappsilber et al. 2007), secos num concentrador de vácuo e reconstituídos em ácido fórmico a 0,1%.

3.13.3 Análise de espectrometria de massa

3.13.3.1 Nanoflow nLC-MS / MS

Uma alíquota de 4,5 µL foi analisada em um espectrômetro de massa Orbitrap Velos habilitado para ETD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conectado ao sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, EUA) através de uma fonte de íon *nanoelectrospray Proxeon*. Os peptídeos foram separados por um gradiente de acetonitrilo de 2-90% (2-30% ao longo de 40 minutos) em ácido fórmico a 0,1% usando uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x ID75 µm, tamanho de partícula de 5 µm, Novo Objetivo) a uma taxa de fluxo de 300 nL/min durante 27 minutos. A tensão de *nanoelectrospray* foi ajustada para 2,2 kV e a temperatura da fonte foi de 275 °C. Todos os métodos do instrumento foram configurados no modo de aquisição dependente de dados. Os espectros de MS de varredura completa (m/z 300-1.600) foram adquiridos no analisador Orbitrap após acumulação para um valor alvo de 1×10^6 . A resolução no Orbitrap foi ajustada para $r = 60,000$ e os 20 íons peptídicos mais intensos com carga Os estados ≥ 2 foram isolados sequencialmente para um valor alvo de 5.000 e fragmentados na armadilha de íons linear usando CID de baixa energia (energia de colisão normalizada de 35%). O limite de sinal para desencadear um evento MS/MS foi definido para 1.000 contagens. A exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de tamanho de exclusão de 500, duração de exclusão de 60 s e uma contagem de repetição de 1. Foi utilizada uma ativação $q = 0,25$ e tempo de ativação de 10 ms (Kawahara et al. 2014).

3.13.3.2 Análise de dados brutos LC-MS / MS

A identificação das proteínas foi realizada com MaxQuant v.1.3.0.3 (Kawahara et al. 2014) contra o banco de dados do banco de dados Human UniProt (versão 17 de março de 2016, 91,974

seqüências, 36,693,332 resíduos) usando busca Andromeda (Cox and Mann 2008). Como parâmetros de busca, foi considerada uma tolerância de 20 ppm para íons precursores (MS search) e 0,5 Da para íons fragmentados (search MS / MS), com um máximo de 2 clivagens perdidas. A carbamidometilação da cisteína foi considerada como modificação fixa e oxidação da acetilação de metionina e proteína N-terminal como modificações variáveis. Um máximo de 1% da taxa de descoberta falsa (FDR) foi definido para a identificação de proteínas e peptídeos. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o algoritmo de quantificação livre de etiqueta (LFQ) implementado no ambiente MaxQuant, com 1 contagem de razão mínima e uma janela de 2 min para correspondência entre corridas. A análise estatística foi realizada com o software Perseus v1.2.7.4 (Cox et al. 2011), disponível no pacote MaxQuant. Primeiro, o reverso e apenas identificados pelas entradas do site foram excluídos de uma análise posterior. A quantificação livre de etiqueta foi realizada utilizando as intensidades de proteína espectral. Os dados obtidos de quatro experimentos independentes de cada fração subcelular foram anotados em grupos. Para a análise de proteínas expressas diferencialmente, foram considerados 3 valores válidos em cada grupo e o teste t foi aplicado em grupos.

3.14 Ensaio de iodeto de propídio

Todos os experimentos foram feitos com células C2C12 totalmente diferenciadas em uma placa de 96 poços (Nest, EUA). As células previamente tratadas foram lavadas com PBS 1x e adicionados 100 µL de meio PI contendo PBS, glicose 25 mM e PI a 10 µg/mL (Invitrogen, EUA). Em meio fresco, as células foram incubadas durante 15 min a 37 ° C, 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e adicionado 100 µL de tampão de ensaio contendo PBS com glicose 25 mM seguido por uma medição do ponto final da fluorescência PI num leitor de microplacas (SpectraMax M3, Molecular devices, USA) a 530 emissões e excitação de 620. Após a medição fluorescente, as imagens foram imediatamente adquiridas com um microscópio fluorescente (Floyd, Invitrogen, EUA).

3.15 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A quantificação dos níveis de ROS mitocondrial foi realizada utilizando-se a sonda Mitosox (ThermoFisher). Para quantificação de ROS citosólico foi utilizado a sonda DHE (ThermoFisher)

e para a quantificação de H_2O_2 total foi utilizado a sonda Amplex red (ThermoFisher). Todos esses ensaios foram realizados em células aderidas usando leitor de placa com aquisição de fluorescência (Molecular Devices) conforme as recomendações do fabricante.

3.16 Número de cópia de DNA mitocondrial

O DNA total foi extraído através do kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen). O DNA purificado foi ressuspensionado de tampão TE e diluído a 5 ng/ μ L. Foi realizado qPCR para o gene codificado pelo genoma mitocondrial Cox2 o gene codificado pelo genoma nuclear Rsp18 usando 10ng de DNA. Os valores de Cts de ambos foram usados para determinação do conteúdo de DNA mitocondrial através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Rooney et al. 2015).

3.17 Análises *in silico*

Dados de transcriptoma foram extraídos do repositório GeoDatasets (NCBI) e analisados usando o software GEO2R (NCBI). Foi considerado como expressão diferencial diferenças relativas acima de 2 *fold change* e valor de $P < 0,05$. Esses dados foram então importados para o programa DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8) e avaliados o enriquecimento das vias KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e o enriquecimento de ontologia de genes por componentes celulares através da GOterms-CC (<http://www.geneontology.org>). Os resultados dessas análises foram apresentados em *-log Fold Change*. Utilizamos também o software Venn diagram para a análise de genes exclusivos e co-regulados. O enriquecimento das vias de sinalização dos genes sobrepostos foi avaliado pelo DAVID para vias KEGG e GOtermsCC. A lista de alvos preditos de PPAR foi extraída do software PPARgene. A lista de alvos de NCoR1 foi extraída do estudo de (Catic et al. 2013). Os picos de ligação de NCoR1, PPAR γ e RXR nos promotores murinos de SOD2, catalase, GPx1, e UCP3 foram analisados usando Genome Browser UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>).

Tabela 2. Lista de softwares usados no estudo.

Softwares	Uso	Acesso
PPARGene	Lista de alvos de PPAR	http://www.ppargene.org/
Dragon PPRE Spotter	Identificação de PPRES em promotores	http://www.cbrc.kaust.edu.sa/ppre/

Eukaryotic Promoter Database (EPD)	Identificação de PPREs em promotores	http://epd.vital-it.ch/index.php
GEO datasets (NCBI)	Extração de dados de transcriptoma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/
GEO2R (NCBI)	Análise de dados de transcriptoma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/
Perseus Maxquant	Análise de dados de proteômica	http://www.coxdocs.org/doku.php?id=perseus:start
Genome Browser UCSC	Análise de picos de associação co-reguladores na cromatina	https://genome.ucsc.edu/
Venn Diagram	Diagrama de Venn	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/
DAVID	Análise de vias KEGG e ontologia de genes (GO)	https://david.ncifcrf.gov/
oPOSSUM	Análise de sítios conservados de ancoramento de fatores de transcrição	http://opossum.cisreg.ca/oPOSSUM3/

3.18 Construção de vetor lentiviral e expressão estável de PGC-1 α em células C2C12

A produção da linhagem de células C2C12 com expressão estável de PGC-1 α foi realizada através da transdução do vetor lentiviral pBABE-PGC1 α . Os vetores retrovirais e lentivirais utilizados são defectivos, não se replicam, não são patogênicos e nem infecciosos. Foram utilizados os plasmídeos c1-EGFP-PGC-1 α e pBABEpuro para a clonagem do vetor lentiviral pBABE-PGC1 α .

3.18.1 Clonagem do vetor lentiviral

O vetor molde para construção do pBABE-PGC-1 α foi o vetor lentiviral pBABEpuro (addgene) e para a subclonagem do inserto utilizamos o vetor c1-EGFP-PGC-1 α (addgene). A clonagem do inserto PGC-1 α no vetor pBABE foi realizada em 2 etapas:

- 1- Inserção de sítios de restrição para BamHI nas extremidades do gene PGC-1 α
- 2- Clonagem do PGC-1 α em vetor lentiviral pBABEpuro

Etapa 1

Inicialmente para verificação do plasmídeo c1-EGFP-PGC-1 α (Apêndice A, Fig. 1A, B, C) foi realizado um mapa de restrição com as enzimas BamHI, BglII e BamHI + BglII (Neb) e

visualização das bandas por eletroforese em gel de agarose. (Apêndice A, Fig. 1D). Foi desenhado e sintetizado oligos fosforilados em 5' contendo sequências de restrição para Xho, Sall e BamHI (Apêndice A, Fig. 1E). Esses oligos quando anelados formam extremidades coesivas para Xho e Sall (Apêndice A, Fig. 1E) que posteriormente foram ligados no c1-EGFP-PGC-1 α . Para a ligação dos oligos ao vetor c1-EGFP-PGC-1 α , foi realizado a digestão do vetor com as enzimas Sall e XhoI (2h/37⁰C) e logo em seguida a desfosforilação através da adição da fosfatase alcalina CIP (Neb) (1h/37⁰C). O vetor digerido e desfosforilado foi isolado por eletroforese em gel de agarose e extraído de gel através de kit de extração (Gel extraction kit Qiagen). Foi realizado o anelamento dos oligos (95⁰C/5 min e resfriamento até temperatura ambiente) e em seguida foi realizada a ligação do oligo anelado ao inserto PGC-1 α usando a enzima T4 DNA ligase (overnight/16⁰C) (Neb). Após a reação de ligação, o plasmídeo resultante foi transformado em bactéria DH-5 α e posteriormente colônias positivas foram inoculadas para a midipreparação (Midiprep kit Qiagen). Esquema de clonagem indicada na figura 1F. O plasmídeo resultante clonado foi o vetor c1-EGFP-PGC-1 α contendo sítios de restrição para BamHI nas duas extremidades do gene PGC-1 α (Apêndice A, Fig. 1G).

Oligos utilizados para clonagem:

- (5'>3') fosforilados na 5'
- Xho/Bam/Sal-F TCGAGGGGATCCG
- Xho/Bam/Sal-R TCGACGGATCCC

Etapas 2

Nessa etapa realizamos a clonagem do inserto PGC-1 α no vetor pBABEpuro (Apêndice A, Fig. 2A) através de clonagem por restrição e ligação dos fragmentos (Apêndice A, Fig. 2B). Para a clonagem do PGC-1 α no vetor pBABEpuro foi realizado a digestão do pBABE com a enzima BamHI (2h/37⁰C), em seguida o vetor foi desfosforilado através da adição de fosfatase alcalina CIP (1h/37⁰C) (Neb). O vetor digerido e desfosforilado foi isolado por eletroforese em gel de agarose e extraído de gel através de kit de extração (Gel extraction kit Qiagen) (Apêndice A, Fig. 2B). Para o isolamento do fragmento PGC-1 α foi realizado digestão do plasmídeo c1-EGFP-PGC-1 α previamente clonado contendo sítios de restrição em ambas as extremidades de PGC-1 α com a enzima BamHI (2h/37⁰C) e em seguida o isolamento do fragmento por eletroforese em gel de

agarose. O DNA foi extraído do gel através de kit de extração de gel (Gel extraction Kit Qiagen) (Apêndice A, Fig. 2B). Após o isolamento do inserto e do vetor, foi realizada a ligação dos fragmentos em proporção 3:1 através da enzima T4 DNA ligase (neb) 1h/TA. Em seguida, a reação de ligação foi transformada em bactéria DH-5 α (16h/37⁰C). Foi preparado inóculos (16h/37⁰C/300 RPM) de 70 colônias para “screening” de clones positivos. Tamanho esperado dos fragmentos para clones positivos indicado na figura 2C. Após inóculos foi feito uma minipreparação para extração de DNA plasmidial. Foi realizado “screening” dos clones através de PCR de colônia (Apêndice A, Fig. 2D) e através de mapa de restrição utilizando as enzimas BamHI (Apêndice A, Fig. 2D) e EcoRI (Apêndice A, Fig. 2E). Foi verificado 5 clones positivos para pBABE-PGC-1 α para orientação correta (Apêndice A, Fig. 2F). Foi escolhido 2 clones positivos e realizado pré-inóculo (5mL) e inóculo (100mL) desses clones para posterior midipreparação e confirmação por mapa de restrição (Apêndice A, Fig. 2G) e PCR (Apêndice A, Fig. 2H). O plasmídeo clonado obtido foi o pBABE-PGC-1 α com sítios de restrição em ambas as extremidades do gene PGC-1 α (Apêndice A, Fig. 2I).

3.18.2 Construção da partícula viral e produção da linhagem C2C12 PGC-1 α

Células C2C12 (mioblastos) foram transduzidos com o gene repórter GFP ou PGC-1 α utilizando vetores lentivirais em uma MOI pré-estabelecido após titulação. Para a produção das partículas virais, culturas de células da linhagem HEK293T (Invitrogen) foram estabelecidas em cultura até alcançarem uma confluência de 40 – 60%. Para a transfecção, foram plaqueadas 5 x 10⁶ células. A solução de transfecção continha: CaCl₂ (2,5 M), DNA plasmidial (7 μ g) e HBS 2X (pH 7). A partir da transfecção o meio foi retirado das placas no período de 24h, filtrado (filtro 0,22 μ m) e ultracentrifugado a 19000 x g por 2 horas. O pellet foi ressuspendido em PBS. Para a titulação foram usadas linhagens de células 293T. A transdução do PGC-1 α foi realizada em mioblastos mantidos em cultura em meio contendo soro fetal bovino. Após 24 horas as células transduzidas foram selecionadas através do tratamento com puromicina [1 μ M]. A concentração de puromicina foi previamente estipulada através da análise da curva de morte com puromicina em células C2C12 (Apêndice A, Fig. 3A). Após a seleção e confirmação de clones positivos, fizemos a caracterização fenotípica e molecular das células PGC-1 α .

3.19 Aprovação do estudo

Todos os experimentos do presente estudo foram realizados *in vitro* em linhagens imortalizadas de células musculares C2C12 no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). O estudo foi aprovado pela Comissão de Biossegurança do CNPEM (CIBio) sob o número 2015-47.

3.20 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o teste t de Student para amostras independentes. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, e os valores de p menores de 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos. A significância estatística é exibida como * (p < 0,05).

4. ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES

4.1 Introdução

O músculo esquelético é caracterizado como um tecido com alta plasticidade. A habilidade de alterar o seu tamanho, força, e principalmente seu metabolismo permite sua adaptação a desafios agudos e crônicos. Eventos que causam mudanças adaptativas no músculo esquelético incluem exercício físico, envelhecimento, desuso, doenças degenerativas e desnutrição (Powers et al. 2007; Powers et al. 2011; Powers and Jackson 2008; Lieber et al. 2017; Salmons 2017). O crescimento e o reparo do tecido muscular são regulados pela ação de um grupo de células precursoras (Gosker et al. 2002; Flück 2006; Narici et al. 2004). Quando ativadas, essas células proliferam e diferenciam e, finalmente, se fundem formando miotubos (Anderson 2006). Essa transição irreversível de mioblastos à miotubos multinucleados é chamada de miogênese e acontece durante o desenvolvimento e a regeneração (Le Grand and Rudnicki 2007).

A miogênese é acompanhada pela reorganização do metabolismo (Kraft et al. 2006; Remels et al. 2010; Wagatsuma and Sakuma 2013). Durante a diferenciação, as células convertem a preferência pelo metabolismo glicolítico à fosforilação oxidativa como fonte de ATP. A mitocôndria possui um papel fundamental nesse processo. Durante a miogênese há um rápido

aumento no conteúdo mitocondrial, juntamente com expressão e a atividade de enzimas mitocondriais (Wagatsuma and Sakuma 2013). A biogênese mitocondrial requer uma ativação coordenada de genes que codificam enzimas da fosforilação oxidativa, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA), e da oxidação de ácidos graxos. Essa regulação depende da atividade sincronizada de fatores de transcrição e receptores nucleares atuando no genoma nuclear e mitocondrial. Estudos prévios demonstraram que os fatores de transcrição NRF-1, NRF-2, TFAM e CREB são essenciais na regulação de genes mitocondriais durante a miogênese (Kraft et al. 2006; Remels et al. 2010; Franko et al. 2008). Ainda, nesse processo os níveis transcricionais de PGC-1 α , o principal regulador de biogênese mitocondrial, aumentam (Wagatsuma and Sakuma 2013). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que o PGC-1 α não é o único responsável pela coordenação molecular da biogênese mitocondrial no músculo esquelético (Rowe et al. 2012; Leick et al. 2008). Já foi demonstrado que os níveis proteicos do PGC-1 α reduzem durante a miogênese devido a sua susceptibilidade à degradação mediada pelo sistema ubiquitina proteassoma (Adamovich et al. 2013). Essas evidências sugerem que outros co-reguladores transcricionais podem estar envolvidos no processo de biogênese e função mitocondrial durante a miogênese incluindo co-repressores nucleares.

Muitos componentes do circuito molecular responsável pela biogênese mitocondrial são induzidos durante a miogênese. Neste estudo, através de análise transcriptômica e proteômica nós investigamos as vias de sinalização que regulam a função mitocondrial durante a diferenciação de mioblastos. Avaliamos ainda, o papel antagônico dos co-reguladores transcricionais PGC-1 α e NCoR1 nesse processo.

4.2 Resultados

4.2.1 Biogênese mitocondrial durante a miogênese

O presente estudo objetivou identificar as vias moleculares envolvidas no controle do metabolismo oxidativo e da biogênese mitocondrial em células musculares utilizando o modelo de diferenciação em linhagem de células C2C12. Durante a diferenciação, acontece uma transição de mioblastos a miotubos multinucleados e expressão de importantes fatores miogênicos (Flynn et al. 2010; Anderson 2006). Observamos por microscopia e pela expressão de miogenina e MEF2c, dois importantes fatores de transcrição miogênicos, a formação completa de miotubos a partir de

5 dias de diferenciação (Fig. 1A). Corroborando com estudos prévios, observamos uma indução expressiva da função mitocondrial durante a diferenciação de mioblastos conforme demonstrado pelo aumento do consumo de oxigênio e dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) em miotubos (Fig. 1B e 1C). Também observamos redução dos níveis de lactato do meio de cultura de miotubos sugerindo maior atividade de fosforilação oxidativa em detrimento a via glicolítica (Fig. 1C). O aumento da função mitocondrial durante a miogênese foi acompanhada de uma maior densidade mitocondrial visualizada pela marcação de mitocôndrias usando a sonda mitotracker em miotubos quando comparados com mioblastos (Fig.1D).

Figura 1 Biogênese mitocondrial durante a diferenciação de C2C12. (A) Imagens de campo claro de células com 0 e 5 dias de diferenciação. Expressão gênica de miogenina (MyoG) e MEF2c em mioblastos e miotubos (n=6). (B) Consumo de oxigênio em células com 0, 3 e 5 dias de diferenciação (n=6). (C) Dosagens dos níveis de intermediários do ciclo de krebs e produção de lactato em mioblastos e miotubos (n=6). (D) Imagens capturadas por microscopia confocal de mitocôndria (mitotracker) e núcleo (DAPI) em mioblastos e miotubos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

4.2.1 Análise transcriptômica: Vias de sinalização enriquecidas durante a miogênese

Durante a miogênese ocorre uma significativa reprogramação transcricional (Trapnell et al. 2010). Para avaliar as possíveis vias enriquecidas durante esse processo analisamos dados de RNAseq (acesso GEO: GSE20846) de mioblastos *vs* miotubos em linhagem C2C12. Após o alinhamento das *reads* e das análises de expressão diferencial, usamos a lista de genes positivamente regulados em miotubos para avaliar as vias metabólicas enriquecidas e redes de interação usando o software Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 (DAVID) (Huang et al. 2009b; Huang et al. 2009a). Através da integração dos resultados anotados com o banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) observamos enriquecimento de diversas vias metabólicas incluindo as vias de fosforilação oxidativa, sinalização da insulina, metabolismo de ácidos graxos e ciclo do ácido tricarboxílico (Fig. 2A até 2C), corroborando com o aumento da capacidade oxidativa. Interessantemente, a única via de sinalização enriquecida associada a receptores nucleares foi da classe dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). Ainda, através da análise de motivos conservados de fatores de transcrição (oPOSSUM 3.1) nos promotores dos genes mitocondriais positivamente regulados em miotubos, identificamos o sítio de PPAR como um dos mais enriquecidos (Fig. 1D, Apêndice A Tabela 2). Os genes mitocondriais positivamente expressos foram selecionados através da análise de termos GO para o componente celular mitocondrial utilizando o software DAVID (Apêndice A Fig. 4). Considerando que a classe de PPARs exerce um papel crucial no metabolismo oxidativo, esses resultados sugerem que a atividade do PPAR pode ter um papel importante no aumento da capacidade oxidativa durante a diferenciação de células musculares.

Para identificar quais grupos de genes e redes regulatórias poderiam ser controlados pelo PPAR durante a miogênese, nós integramos os resultados de genes positivamente regulados em miotubos com genes alvos de PPAR (Fig. 2D). A lista de genes alvos de PPAR foram extraídos

do banco de dados PPARgene database (<http://www.ppargene.org/index.php>) (Fang et al. 2016). Através da análise de diagrama de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) nós identificamos a sobre-posição de 170 genes entre genes alvos de PPAR e genes enriquecidos durante a miogênese (Fig. 2D). Em seguida usamos esses 170 genes para avaliar a ontologia de componente celulares (GOterm CC) e de vias KEGG através do software DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>). Essa análise revelou que os grupos de genes mais enriquecidos são associados a componentes mitocondriais (Fig. 2E, Apêndice A Tabela 5). Para validar os resultados de RNAseq nós avaliamos a expressão de genes mitocondriais e genes associados a biogênese mitocondrial por qPCR. Nossos resultados confirmaram o aumento na expressão de genes mitocondriais e de importantes mediadores da biogênese mitocondrial, incluindo PGC-1 α , PPAR β , ESRA α , NRF-1 e SIRT1 (Fig. 2F e 2G). Esses resultados e as análises *in silico* sugerem que o aumento dos genes mitocondriais durante a miogênese é controlado, em parte, pela atividade do PPAR.

Figura 2. Análise transcriptômica de mioblastos e miotubos. (A eB) *Heat map* de genes diferencialmente expressos associados ao ciclo do ácido tricarboxílico, fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial (acesso GEO: GSE20846). (C) Análise de enriquecimento de vias por KEGG de genes positivamente regulados em miotubos. (D) Diagrama de Venn mostrando genes exclusivos e sobrepostos entre os genes positivamente regulados e alvos preditos de PPAR. (E) Análise de ontologia de genes por componentes celulares de alvos sobrepostos. Ordem decrescente

de componentes enriquecidos por valor de P . (F e G) Análise de expressão de genes associados fosforilação oxidativa, ciclo do ácido tricarboxílico, beta-oxidação e biogênese mitocondrial em mioblastos e miotubos ($n=6$). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

4.2.2 Análise proteômica: Vias de sinalização enriquecidas durante a miogênese

Para avaliar o perfil de proteínas enriquecidas durante a diferenciação de células musculares realizamos uma análise proteômica por espectrometria de massas de mioblastos vs miotubos em frações subcelulares mitocondriais, citosólicas e nucleares. Realizamos o fracionamento subcelular para aumentar a sensibilidade de identificação dos peptídeos. Os resultados do proteoma revelaram uma distinta distribuição nos níveis de proteínas entre mioblastos e miotubos nas três frações sub-celulares (Apêndice A Fig. 5). Para avaliar as vias de sinalização e redes regulatórias enriquecidas, integramos os dados de fracionamento para cada grupo experimental (mioblastos vs miotubos) para obter uma cobertura maior de análise. A análise de expressão diferencial revelou a indução de diversas proteínas associadas à função mitocondrial incluindo a fosforilação oxidativa, fissão, sinalização de cálcio e homeostase redox durante a miogênese (Fig. 2A). Através da visualização das vias KEGG usando o software DAVID observamos um alto enriquecimento das vias de fosforilação oxidativa, ciclo de krebs, metabolismo de ácidos graxos, sinalização da insulina e da via PPAR (Fig. 3D), similarmente aos resultados de transcriptoma. Através da análise de motivos conservados para fatores de transcrição (oPOSSUM 3.1) também identificamos o sítio de PPAR como um dos mais enriquecidos nos promotores dos genes que codificam as proteínas mitocondriais positivamente expressas em miotubos (Fig 2B, Apêndice A Tabela 3). Os genes mitocondriais positivamente expressos foram selecionados através da análise de termos GO para o componente celular mitocondrial (DAVID) (Apêndice A Fig. 4). Em seguida, integramos os dados de proteínas positivamente reguladas com alvos preditos de PPAR através da análise de diagrama de Venn (bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn). Esta análise resultou em uma sobreposição de 55 alvos (Fig. 3C). Através da análise de ontologia de componentes celulares (GOterm-CC) e de vias de sinalização KEGG identificamos um alto enriquecimento para proteínas mitocondriais (Fig 3D e Apêndice A Tabela 4). De fato, através de western blotting confirmamos um aumento de proteínas da fosforilação oxidativa mitocondrial (Fig. 3E). Esses resultados sugerem que o PPAR é um importante mediador do processo de biogênese mitocondrial durante a diferenciação de células musculares.

Figura 3. Análise transcriptômica de mioblastos e miotubos. (A) *Heat map* de proteínas diferencialmente expressas em mioblastos e miotubos (n=4). (B) Análise de enriquecimento de vias por KEGG de proteínas positivamente regulados em miotubos. (C) Diagrama de Venn mostrando proteínas exclusivas e sobrepostas entre as positivamente reguladas e alvos preditos de PPAR. (D) Análise de ontologia por componentes celulares dos alvos sobrepostos. Ordem decrescente de componentes enriquecidos por valor de *P*. (E) Níveis proteicos de citrato sintase e

proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial em mioblastos e miotubos foram avaliados por western blotting. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

4.2.3 Papel antagônico dos co-reguladores PGC-1 α e NCoR1 na função mitocondrial durante a miogênese

Coletivamente, os resultados de transcriptoma e proteoma sugerem que a via de sinalização mediada por PPAR possui um papel importante na organização mitocondrial durante a miogênese. Isso implica que a atividade do PPAR pode estar sendo induzida pela ação de seus co-reguladores. O principal co-ativador de PPAR é o PGC-1 α e, estudos recentes têm demonstrado que o co-repressor NCoR1 reprime a atividade de PPAR no músculo esquelético (Yamamoto et al. 2011; Pérez-Schindler et al. 2012). Dessa forma, resolvemos testar a hipótese de que o PGC-1 α e NCoR1 poderiam estar controlando a atividade de PPAR durante a miogênese. Através de análises *in silico*, avaliamos genes co-regulados positivamente pela miogênese, pelo silenciamento de NCoR1 e pela expressão de PGC-1 α . Extraímos dados de transcriptoma do silenciamento do NCoR1 e expressão de PGC-1 α no músculo esquelético através do GeoR (acesso GEO: GSE40439), filtramos para genes positivamente regulados e integramos esses dados com os genes positivamente regulados durante a miogênese através da análise de diagrama de Venn (Fig. 4A). Essa análise revelou uma sobreposição de 64 genes. Através da avaliação desses 64 genes em vias do KEGG observamos um alto enriquecimento da fosforilação oxidativa, ciclo do ácido tricarboxílico e de PPAR (Fig. 4B). Ainda, observamos um enriquecimento de componentes mitocondriais dos genes sobrepostos do diagrama de Venn através da análise de ontologia de componentes celulares (Fig. 1C). Esses resultados sugerem que os co-reguladores PGC-1 α e NCoR1 são mediadores da expressão dos genes mitocondriais durante a miogênese, possivelmente pela regulação da atividade de PPAR.

Curiosamente, os níveis proteicos de PGC-1 α reduzem dramaticamente durante a miogênese (Fig. 4D). Similarmente, os níveis proteicos de NCoR1 também estão reduzidos em miotubos. Ensaios de co-imunoprecipitação demonstraram que apesar da redução dos níveis globais de PGC-1 α , a sua interação com PPAR β , a principal isoforma de PPAR no músculo, se mantém (Fig. 4E). Entretanto, os níveis do co-repressor NCoR1 parecem estar reduzidos no extrato da imunoprecipitação de PPAR sugerindo a de-repressão do receptor (Fig. 4F). Neste caso, a atividade de PPAR em promotores de genes mitocondriais poderia estar sendo regulada pela

dissociação do co-repressor sem a necessidade de aumento dos níveis proteicos de PGC- α além do nível basal. De fato, através da análise de transativação do PPRe por ensaio de luciferase observamos maior atividade de PPAR em miotubos (Fig. 4G).

Figura 4. Antagonismo dos co-reguladores PGC-1 α e NCoR1 na função mitocondrial durante a miogênese. (A) Diagrama de Venn mostrando genes exclusivos e sobrepostos de genes positivamente regulados e pela miogênese, expressão de PGC-1 α e silenciamento NCoR1 (GEO). (B) Análise de enriquecimento de vias por KEGG dos genes sobrepostos avaliados pelo diagrama de Venn. (C) Análise de ontologia por componentes celulares dos alvos sobrepostos. Ordem decrescente de componentes enriquecidos por valor de *P*. (D) Níveis proteicos de PGC-1 α e NCoR1 em mioblastos e miotubos foi avaliado por western blotting. (E e F) Co-imunoprecipitação de PPAR β e imunoblotting de PGC-1 α e NCoR1 em mioblastos e miotubos. (G) Ensaio de transativação de PPARE em mioblastos e miotubos (n=6). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

4.2.4 NCoR1 reprime a função mitocondrial durante a miogênese

Em células do músculo esquelético a atividade do PPAR possui um papel fundamental na oxidação de ácidos graxos (Fan and Evans 2015; Narkar et al. 2008). Nossos resultados demonstraram que durante a miogênese há uma ativação da via PPAR concomitante ao aumento na função mitocondrial. Entretanto, o principal co-ativador de PPAR, PGC-1 α , não parece ser o único responsável pela atividade de PPAR. A possível de-repressão da via pela dissociação do co-repressor NCoR1 parece ser uma hipótese plausível devido aos genes positivamente regulados pelo silenciamento do NCoR1 no músculo esquelético serem primordialmente mitocondriais. Isso

sugere que os promotores regulados pelo NCoR1 devem ser enriquecidos de sequências consenso de PPRE. Para testar essa hipótese *in silico* extraímos dados de ChIPseq de NCoR1 (acesso GEO: GSE33821) e sobrepomos esses resultados com os alvos preditos de PPAR e com os genes positivamente regulados pela miogênese. Este experimento revelou um alto enriquecimento de vias mitocondriais nos genes sobrepostos, como o ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa (Fig. 5A). Para validar o efeito dos co-reguladores na atividade do PPAR *in vitro*, realizamos experimentos de transativação de PPRE em células musculares transfectadas com NCoR1 e PGC-1 α . A expressão de NCoR1 reduziu a transativação do PPRE enquanto a expressão do PGC-1 α teve efeito oposto aumentando a atividade de PPRE em células musculares, demonstrando que que esses co-reguladores agem de maneira antagônica regulando a atividade de PPAR (Fig. 5C). Ainda, a expressão de NCoR1 em células musculares teve um forte impacto negativo na função mitocondrial conforme indicado pela redução no consumo de oxigênio, diminuição nos níveis dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e aumento na produção de lactato (Fig 5D até 5G).

Figura 5. NCoR1 reprime a função mitocondrial durante a miogênese. (A) Diagrama de Venn de proteínas positivamente reguladas em miotubos e alvos de PPAR. Análise de enriquecimento de vias por KEGG dos alvos sobrepostos avaliados pelo diagrama de Venn. (B) Diagrama de Venn de genes regulados pelo NCoR1 e alvos de PPAR (GEO). Análise de enriquecimento de vias por KEGG dos alvos sobrepostos avaliados pelo diagrama de Venn. (C) Ensaio de transativação de PPRE em células musculares transfectadas com pCDNA, pCDNA-NCoR1 e PGC-1 α (n=6). (D) Nível transcricional de NCoR1 em células musculares transfectadas com pCMV-GFP ou pCMV-NCoR1 avaliado por qPCR. (F e G) Níveis de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e produção de lactato de células musculares transfectadas com pCMV-GFP ou pCMV-NCoR1 (n=6). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

4.2.5 Compostos que induzem o metabolismo oxidativo reduzem os níveis de NCoR1

Os mecanismos que regulam a atividade dos co-ativadores transcricionais de PPAR já estão bem descritos. Entretanto, ainda não está claro quais são as vias de sinalização que regulam a atividade do co-repressor NCoR1 em células musculares. Para entender melhor esta questão, tratamos células musculares com diversos compostos que induzem distintas vias de sinalização, incluindo CAMK, AMPK e PKA/CREB. Interessantemente, o tratamento com GW 501516, AICAR, cafeína, isoproterenol e oleato todos reduziram os níveis proteicos de NCoR1 (Fig. 6A) e muitos desses compostos induziram o metabolismo oxidativo conforme demonstrado pela

quantificação dos níveis de intermediários do ciclo de krebs e produção de lactato (Fig. 6B). Esses resultados revelam que uma ampla gama de vias de sinalização regulam os níveis de NCoR1 e ressaltam a importância da repressão transcricional no controle molecular no metabolismo energético em células musculares.

Figura 6. Compostos que induzem o metabolismo oxidativo reduzem os níveis de NCoR1. (A) Níveis proteicos de PGC-1α, NCoR1, pCAMKII, pAMPK, pCREB, AMPK, CREB e β-actina em células musculares tratadas com compostos. Níveis de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e produção de lactato de células musculares tratadas com compostos (n=6). Os dados são expressos como média ± SEM.

4.3 Discussão

A homeostase celular é transcricionalmente controlada através da interação entre fatores de transcrição, co-reguladores e proteínas da maquinaria transcricional. Co-reguladores, que podem funcionar tanto como repressores e/ou ativadores são estritamente regulados para sincronizar vias metabólicas a estímulos ambientais (Mouchiroud et al. 2014). Nesse estudo nós mostramos que a repressão transcricional envolvida na regulação de processos metabólicos é mediada em parte, pelo co-repressor do receptor nuclear NCoR1. Ainda, a regulação da biogênese

mitocondrial durante a diferenciação de células musculares é controlada pela de-repressão de PPAR β e ativação transcricional de genes mitocondriais.

O tecido muscular constitui o maior tecido sensível à insulina no corpo humano sendo considerado o principal sítio de captação de glicose estimulado pela insulina. Dessa forma, a manipulação de vias metabólicas no tecido muscular apresenta uma potencial abordagem na terapia contra obesidade e diabetes. O presente estudo objetivou identificar as vias de sinalização que participam do controle do metabolismo oxidativo, em particular, da biogênese mitocondrial em células musculares. Utilizamos um modelo clássico de mudança de fenótipo metabólico. Durante a diferenciação de células musculares há uma re-organização do metabolismo (Kraft et al. 2006; Remels et al. 2010; Wagatsuma and Sakuma 2013). As células convertem o seu metabolismo glicolítico à fosforilação oxidativa como fonte da ATP. A mitocôndria possui um papel crucial nesse processo.

Observamos um aumento substancial na densidade mitocondrial e na função oxidativa durante a miogênese. Para avaliar as vias de sinalização envolvidas nesse processo realizamos uma análise de transcriptoma e proteoma em mioblastos e miotubos. Observamos que o fenótipo mais oxidativo em miotubos foi acompanhado de um enriquecimento de vias associadas à biogênese mitocondrial incluindo fosforilação oxidativa e ciclo do ácido tricarboxílico conforme demonstrado pelas vias enriquecidas de KEGG. Interessantemente, a via mais enriquecida de receptores nucleares nas análises de transcriptoma e proteoma foi do receptor PPAR. Ainda, miotubos apresentaram maior transativação do elemento responsivo de PPAR. A classe de PPARs tem um papel crucial no metabolismo oxidativo. PPAR γ promove a biogênese mitocondrial no tecido adiposo branco (Wilson-Fritch et al. 2004) e induz a expressão de genes envolvidos no programa termogênico do tecido adiposo marrom (Puigserver et al. 1998). A ativação do PPAR β no músculo esquelético causa o remodelamento de fibras musculares para fibras mais oxidativas através da expressão de genes mitocondriais (Narkar et al. 2008). A regulação do metabolismo oxidativo mediada por PPAR sugere que a ativação do PPAR pode ser um importante mediador da função mitocondrial durante a miogênese. Corroborando com essa hipótese, a análise de diagrama de Venn com subsequente avaliação da ontologia de componentes celulares revelou que a sobreposição dos genes positivamente regulados pela miogênese com alvos do PPAR são essencialmente enriquecidos para genes mitocondriais.

Co-reguladores transcricionais normalmente não se ligam diretamente no DNA mas regulam a atividade de diversos fatores de transcrição e receptores nucleares em escala genômica. O co-ativador PGC-1 α é considerado um regulador crucial da biogênese e função mitocondrial. PGC-1 α induz a expressão de genes mitocondriais através da ativação de NRFs, ERR α e PPARs (Dominy and Puigserver 2013; Scarpulla 2008; Scarpulla et al. 2012). Estudos recentes têm demonstrado que o co-repressor NCoR1 também é um importante mediador da função oxidativa celular. Estes estudos reportaram que o recrutamento do NCoR1 aos elementos responsivos de PPAR e ERR causa repressão de diversos genes oxidativos controlados por ERR α e PPAR α no fígado e por ERR α e PPAR β no músculo esquelético (Jo et al. 2015). Essas evidências sugerem um possível papel antagônico desses co-reguladores na regulação do metabolismo oxidativo no músculo esquelético. Assim, hipotetizamos que a ativação da via de sinalização de PPAR durante a diferenciação de células musculares poderia estar sendo mediada pela ação do co-ativador PGC-1 α e de-repressão do co-repressor NCoR1. De fato, análises *in silico* de transcriptoma obtidos do silenciamento do NCoR1 e expressão do PGC-1 α revelaram que os genes co-regulados entre os tratamentos e alvos de PPAR são enriquecidos de componentes mitocondriais e de vias associadas à função oxidativa. Ainda, usando dados extraídos de ChIPseq de NCoR1 observamos que a sobreposição de alvos do NCoR1 com proteínas positivamente reguladas durante a miogênese revelaram alto enriquecimento de vias mitocondriais. Confirmando essas análises *in vitro*, a expressão de PGC-1 α transativa PPRE enquanto a expressão de NCoR1 atenua a transativação de PPRE em células musculares.

Curiosamente, os níveis proteicos de PGC-1 α são reduzidos durante a miogênese supostamente mediado pela ação da via ubiquitina proteassoma (Adamovich et al. 2013). Esses resultados sugerem que o aumento da atividade de PPAR durante a miogênese pode estar sendo regulado pela de-repressão do co-repressor independente dos níveis do co-ativador. Nossos resultados suportam essa hipótese visto que miotubos apresentaram níveis basais de NCoR1 reduzidos e maior dissociação de NCoR1 ao PPAR. A expressão de NCoR1 ainda atenuou a transativação de PPRE e diminuiu a função mitocondrial. Corroborando com essas evidências, estudos prévios demonstraram que o silenciamento do NCoR1 no músculo esquelético em camundongos aumentou a capacidade oxidativa e a tolerância ao exercício físico (Yamamoto et al. 2011; Pérez-Schindler et al. 2012). Estudos posteriores serão necessários para desvendar os mecanismos que causam a dissociação do co-repressor no PPAR. Entretanto, a redução nos níveis

de NCoR1 mediado pelo tratamento com GW 501516, AICAR, cafeína, isoproterenol e oleato em células musculares sugerem que diversas vias de sinalização contribuem para a de-repressão transcricional incluindo CREB, AMPK e CAMK. Interessantemente essas vias também estão enriquecidas durante a diferenciação de células musculares (Franko et al. 2008; Tang et al. 2004; Fu et al. 2013) sugerindo um possível mecanismo de modulação do NCoR1 por vias sensíveis ao status energético.

4.4 Conclusão

Coletivamente nossos resultados sugerem um papel antagônico do co-ativador PGC-1 α e do co-repressor NCoR1 na ativação do metabolismo oxidativo e na função mitocondrial de células musculares durante a diferenciação. Esses resultados implicam que o co-repressor NCoR1 representa um componente central na ativação transcricional do metabolismo energético representando uma interface promissora para o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas para o tratamento e prevenção da disfunção metabólica.

5. OS CO-REGULADORES TRANSCRICIONAIS PGC-1 α E NCOR1 SÃO MEDIADORES ESSENCIAIS DA HOMEOSTASE REDOX MITOCONDRIAL EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

5.1 Introdução

As mitocôndrias são organelas densas de membrana dupla conhecida por sua capacidade de produzir ATP a partir da oxidação de substratos de carbono. Elas também têm um papel crucial na manutenção da homeostase redox, gerenciando níveis de vazamento de elétrons e espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidos a partir da oxidação de NADH e FADH na cadeia de transporte de elétrons (Handy and Loscalzo 2012). Esse mecanismo sugere que as vias de sinalização do metabolismo oxidativo mitocondrial e status redox devem ser sincronizadas para adaptar a função mitocondrial em resposta às flutuações da homeostase celular. Estudos prévios demonstraram o papel do coativador PGC-1 α e do corepressor NCoR1 no metabolismo oxidativo do músculo esquelético (Pérez-Schindler et al. 2012; Yamamoto et al. 2011). No entanto, o mecanismo pelo qual esses co-reguladores agem sobre a homeostase redox mitocondrial é pouco conhecido. Pesquisas recentes relataram um papel essencial do PGC-1 α na defesa antioxidante em células neuronais, endoteliais e cancerígenas através da indução da enzima antioxidante

mitocondrial SOD2 (St-Pierre et al. 2006; Vazquez et al. 2013; Olmos et al. 2009). No entanto, não está claro se o NCoR1 possui um papel importante na homeostase redox mitocondrial. Aqui mostramos que ambos PGC-1 α e NCoR1 governam a defesa antioxidante mitocondrial em células do músculo esquelético atuando respectivamente como ativador e repressor da expressão de SOD2. Este mecanismo é essencial para a resposta antioxidante celular ao aumento dos níveis de ROS, para a indução antioxidante durante a diferenciação de mioblastos e proteção celular contra a sobrecarga de nutrientes.

5.2 Resultados

5.2.1 PGC-1 α estimula a defesa antioxidante em células do músculo esquelético

O co-ativador PGC-1 α é caracterizado como um regulador crucial da biogênese mitocondrial no músculo esquelético, ativando efetores importantes como PPARs e ERRs (Cantó and Auwerx 2009; Kang and Li Ji 2012; Dominy and Puigserver 2013). Embora o PGC-1 α regule a expressão de enzimas antioxidantes em células neuronias e endoteliais, não está claro o papel do PGC-1 α no estado redox nas células do músculo esquelético. Para investigar isso, expressamos PGC-1 α através da transdução adenoviral em miotubos e avaliamos os níveis de RNA das enzimas antioxidantes mitocondriais SOD2, GPX1 e catalase, e da proteína desacopladora mitocondrial, UCP3, que também está envolvida no controle dos níveis de ROS mitocondrial (Brand and Esteves 2005). Curiosamente, observamos apenas a indução SOD2 e UCP3 (Fig. 7B). A transfecção transiente de PGC-1 α por método baseado em lipossomos também mostrou resultados semelhantes (Fig. 7B). Importaneamente, a expressão de PGC-1 α reduziu a produção de H₂O₂ e foi capaz de diminuir os níveis de ROS mitocondrial e citosólico (Fig. 7C), sugerindo que o PGC-1 α é um indutor importante da defesa antioxidante nas células do músculo esquelético. Ainda, a expressão de PGC-1 α induz a transativação de PPRE em células musculares sugerindo uma ação direta do PGC-1 α na atividade de PPAR (Fig. 7A e 7D).

Figura 7. O PGC-1α estimula a defesa antioxidante nas células do músculo esquelético. (A e B) A expressão gênica de enzimas antioxidantes, PGC-1α e proteína desacopladora 3 UCP3 foi medida por qRT-PCR em células musculares (C2C12) infectadas com Ad-GFP ou Ad-PGC-1α e transfectadas com pCDNA ou pCDNA-PGC-1α HA. (C) Os níveis de ROS mitocondrial, ROS citosólico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram medidos em células musculares infectadas com Ad-GFP ou Ad-PGC-1α (n = 6). (D) A transativação de PPRE foi avaliada pela atividade de Luciferase em células musculares transfectadas com pCDNA ou pCDNA-PGC-1α HA (n = 5). Os dados são expressos como média ± SEM.

5.2.2 PGC-1 α é essencial para a detoxificação de ROS durante a diferenciação de C2C12

A forma e o número mitocondrial estão em constante mudança em resposta às necessidades energéticas. Durante a diferenciação, a célula deve aumentar drasticamente a produção de ATP, aumentando o número de mitocôndrias, um processo conhecido como biogênese mitocondrial (Wagatsuma and Sakuma 2013). Resultados anteriores mostraram que o PGC-1 α é crucial para a ativação da biogênese mitocondrial que ocorre durante a diferenciação de células musculares esqueléticas. Com base no fato de que a defesa antioxidante também é induzida durante esse processo (D'Errico et al. 2011; Baldelli et al. 2014), investigamos se o PGC-1 α também poderia estar envolvido na regulação da homeostase redox durante a diferenciação de células musculares. Para testar esta hipótese, realizamos uma análise de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) de PGC-1 α nos promotores de SOD2, Catalase, GPx1 e UCP3 em mioblastos e miotubos. Esses experimentos revelaram que PGC-1 α ancora fortemente no promotor de todos esses genes durante a diferenciação celular (Fig. 8B). Apoiando esses dados, os resultados de qPCR mostraram uma ativação transcricional significativa desses genes, com exceção da catalase (Fig. 8A). Ainda, os níveis de proteína SOD2 foram aumentados em extratos mitocondriais de miotubos (Fig. 8C). A análise de ChIP revelou o aumento da associação de PGC-1 α no promotor de PDK4 que correlaciona com a indução da transativação de PPRE (Fig. 8D) sugerindo que a atividade de PGC-1 α é dirigida ao promotor em miotubos possivelmente induzindo genes associados a capacidade oxidativa e a detoxificação de ROS.

Para obter uma visão da consequência funcional desse mecanismo silenciámos o PGC-1 α no estágio inicial de diferenciação. O silenciamento de PGC-1 α em mioblastos impediu a indução de níveis de proteína SOD2 e GPX1 em miotubos causando um aumento significativo nos níveis de H₂O₂, ROS mitocondrial e citosólico (Fig. 8E e 8F). Em conjunto, esses resultados sugerem que o PGC-1 α é um indutor crucial da defesa antioxidante, possivelmente controlando a expressão dos genes antioxidantes ao nível da cromatina.

Figura 8. PGC-1 α controla a indução de enzimas antioxidantes durante a miogênese. (A) A

expressão de genes de enzimas antioxidantes e proteína desacopladora 3 (UCP3) foi medida por qRT-PCR em mioblastos ou miotubos. (n = 6). (B) A ligação PGC-1 α no PPRE dos promotores murinos de SOD2, GPx1, catalase e UCP3 foi determinada por ChIP em mioblastos ou miotubos (n = 4). (C) Os níveis de proteína SOD2 em extratos mitocondriais de mioblastos ou miotubos foram determinados por Western Blot. (D) A ligação PGC-1 α no PPRE dos promotores murino de PDK4 foi determinada por ChIP em mioblastos ou miotubos (n = 4). A transativação de PPRE foi medida pela atividade de Luciferase através da transfecção do plasmídeo repórter PPRE-Luc em mioblastos ou miotubos (n = 5). (E) Níveis proteicos de SOD2, catalase e GPx1 em células musculares transfectadas com siScrambled ou siPGC-1 α foram determinados por Western Blot. (F) Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de ROS mitocondrial e citosólico foram medidos em células C2C12 transfectadas com siScrambled ou siPGC-1 α (n = 6). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

5.2.3 PPAR β regula a expressão das enzimas antioxidantes

PGC-1 α coactiva vários receptores nucleares (NRs) e fatores de transcrição (TFs) controlando circuitos transcricionais envolvidos no metabolismo energético e na homeostase mitocondrial (Kang and Li Ji 2012; Scarpulla et al. 2012; Dominy and Puigserver 2013; Puigserver et al. 1998). No entanto, os efetores envolvidos na defesa antioxidante mitocondrial induzidos por PGC-1 α nas células do músculo esquelético são desconhecidos. Visto que o PGC-1 α é o principal coativador de PPAR e que a sinalização de PPAR β induz a expressão de enzimas antioxidantes (Kim and Yang 2013) em outros tipos celulares, nós hipotetizamos que a PGC-1 α poderia estar mediando a ativação de PPAR β nos promotores de enzimas antioxidantes em células musculares. Primeiro, testamos essa hipótese *in silico* através das análises dos promotores antioxidantes. Usando o software Dragon PPRe spotter e o banco de dados do *Eukaryotic Promoter Database-EPD* (Dreos et al. 2015) identificamos diversos elementos responsivos de PPAR (PPRE) nos promotores de SOD2, GPx1, Catalase e UCP3 (Fig. 9A-B). Ao analisar os dados públicos disponíveis do ChIP seq, identificamos uma alta sobreposição entre RXR e PPAR γ nesses promotores sugerindo que os PPRES localizados nos principais promotores desses genes são funcionais (Fig. 9A). Nós ainda avaliamos a ativação do eixo PGC-1 α /PPARs co-expressando esses genes e realizando experimentos de luciferase para transativação de PPRE. Demonstramos que o PGC-1 α ativa todas as 3 isoformas de PPAR (Fig. 9C). Importaneamente, ao silenciar essas isoformas usando RNA de interferência (siRNA), demonstramos que tanto o silenciamento de PPAR β quanto PPAR α atenuam os níveis proteicos de SOD2 (Fig. 9F). Além disso, os agonistas de PPAR β , GW501516 e GW0742, mostraram um aumento acentuado na expressão das enzimas antioxidantes em células musculares (Fig. 9D e 9E). Esses achados sugerem que o PPRES

encontrado em muitos genes envolvidos na regulação redox é funcional e que PPAR β pode ser um importante mediador da indução de SOD2.

Figura 9. PPARs regulam a expressão das enzimas antioxidantes. (A e B) A identificação *in silico* de PPREs nos promotores SOD2, GPx1, CAT e UCP3 foi realizada usando o *software* Dragon PPRE Spotter e o *software* de banco de dados *Eucaryotic Promoter* (EPD). (C) Os níveis de transativação de PPRE foi avaliado através da atividade de Luciferase (PPRE-Luc) em células HEK293 transfectadas com PPAR α , PPAR β , PPAR γ individualmente ou co-transfectadas com PGC-1 α (n = 6). (D e E) A expressão de genes de enzimas antioxidantes foi medida por qRT-PCR em células musculares tratadas com GW501516, GW7042 ou DMSO durante 6 horas (n = 6). (F) Os níveis de proteína SOD2 de células musculares transfectadas com siRNA para PPAR α , PPAR β , PPAR γ foram determinados por Western Blot. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

5.2.4 PGC1 α é crucial para a resposta antioxidante sob níveis elevados de H₂O₂

Para testar se a sinalização de PGC-1 α é sensível aos níveis de ROS, tratamos células musculares com uma concentração fisiológica *in vitro* mas alta de H₂O₂ (1 μ M). Esta concentração de H₂O₂ foi capaz de induzir rapidamente os níveis de transcrição de PGC-1 α , SOD2, GPx1 e catalase detectados após 1 h de exposição a H₂O₂ (Fig. 10A). Hipotetizamos que PGC-1 α poderia mediar esta resposta por associação direta na cromatina, assim, induzindo os respectivos promotores de genes antioxidantes. Como esperado, usando a análise de ChIP, demonstramos que a exposição a H₂O₂ causou um enriquecimento de PGC-1 α nos promotores da SOD2, GPx1 e catalase (Fig. 10B). Curiosamente, houve redução da associação do PGC-1 α no promotor da UCP3 após o tratamento com ROS o que se correlacionou com a diminuição dos níveis transcricionais

de UCP3 (Fig. 10B e 10A). Esses dados levantaram um aspecto inexplorado da atividade de PGC-1 α sugerindo que o PGC-1 α pode ser conduzido seletivamente para promotores específicos visto que o promotor UCP3 também possui PPRES funcionais. Para confirmar a importância do PGC-1 α na resposta antioxidante a ROS, silenciámos PGC-1 α e tratamos estas células com H₂O₂. Embora H₂O₂ tenha sido capaz de aumentar a expressão de GPx1 e catalase em células silenciadas para PGC-1 α , a indução de SOD2 por H₂O₂ foi completamente abolida pelo silenciamento (Fig. 10C), mostrando uma influência proeminente de PGC-1 α no gene da SOD2.

Figura 10. O PGC-1 α é crucial para a resposta antioxidante induzida por H₂O₂. (A) A expressão de genes de enzimas antioxidantes e UCP3 foi medida por qRT-PCR em células musculares tratado com 0 μ M ou 1 μ M de H₂O₂ durante 1 hora (n = 6). (B) A ligação PGC-1 α em

PPREs do promotor SOD2, GPx1, catalase e UCP3 murino foi determinada por ChIP em células musculares tratadas com H₂O₂ durante 1 hora (n = 4). (C) A expressão de genes de enzimas antioxidantes foi medida por qRT-PCR em células musculares transfectadas com siRNA para PGC-1 α e tratadas com 0 μ M ou 1 μ M de H₂O₂ durante 1 hora (n = 6). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

5.2.5 Silenciamento de NCoR1 induz a expressão de SOD2 e atenua os níveis de ROS mitocondrial

Com base no fato de que o eixo PPAR β está envolvido na ativação do gene antioxidante, é plausível suspeitar que NCoR1 também poderia afetar a homeostase redox mitocondrial visto que PPAR β é um dos alvos do co-repressor no músculo esquelético (Yamamoto et al. 2011; Pérez-Schindler et al. 2012). No entanto, o papel de NCoR1 na regulação redox mitocondrial é desconhecido. Para testar esta hipótese, primeiro examinamos os picos de ligação NCoR1 nos promotores antioxidantes usando dados ChIPseq de um banco de dados público disponível (GEO). Esta análise mostrou que o NCoR1 é altamente enriquecido nos promotores dos genes SOD2, GPx1, catalase e UCP3 (Fig. 11A). Além disso, os picos NCoR1 se sobrepõem fortemente com os picos PPAR e RXR nestes promotores sugerindo que PPAR/RxR é um alvo direto de NCoR1 (Fig. 11A) nos promotores das enzimas antioxidantes sugerindo a ação repressiva do NCoR1 na defesa antioxidante mitocondrial. Confirmando essa hipótese o silenciamento estável do NCoR1 em células musculares reduz os níveis de ROS mitocondrial (Fig. 11B). Em seguida, avaliamos se o silenciamento de NCoR1 poderia afetar a expressão dos genes antioxidantes previamente identificados pelos picos de ligação de NCoR1. Interessantemente, o silenciamento de NCoR1 em células musculares induziu SOD2, exclusivamente, (Fig. 11C). Usando células MEF que proporcionam uma maior eficiência de transfecção, conseguimos demonstrar que SOD2 é, de fato, um alvo direto de NCoR1, uma vez que o silenciamento e a expressão de NCoR1 induziram e reprimiram a expressão de SOD2, respectivamente (Fig. 11D). Estes resultados sugerem que NCoR1 possui um papel essencial na geração de ROS mitocondrial e o mecanismo envolvido parece depender da regulação de PPAR β no promotor de SOD2. Avaliamos ainda se a expressão de diferentes co-reguladores causaria variações correlacionadas na produção de ROS mitocondrial. Interessantemente, a expressão de PGC-1 α e o silenciamento de NCoR1 reduzem os níveis de ROS mitocondrial, enquanto a expressão de NCoR1 e o silenciamento de PGC-1 induzem a produção de ROS mitocondrial (Fig. 11E) sugerindo que esses co-reguladores possuem papéis antagônicos no estado redox mitocondrial similarmente como na função oxidativa do músculo esquelético.

Além disso, a co-expressão de NCoR1 e PPAR β aumentou ainda mais a produção de ROS sugerindo maior recrutamento de NCoR1 nos genes alvo de PPAR β , aumentando assim a repressão antioxidante (Fig. 11E). Finalmente, a co-expressão de PGC-1 α , NCoR1 e PPAR β reduziu a produção de ROS em comparação com a co-expressão de NCoR1 e PPAR β , indicando uma competição entre o recrutamento de co-reguladores pelo PPAR β (Fig. 11E). Este mecanismo está de acordo com estudos anteriores, mostrando que co-ativadores e co-repressores atuam no mesmo bolso hidrofóbico em receptores nucleares, sugerindo que a troca de co-reguladores é mutuamente exclusiva (Perissi et al. 2010).

Para testar a importância fisiológica do mecanismo de repressão mediado por NCoR1 à resposta antioxidante, celular tratamos células musculares com H₂O₂ [1 μ M] e realizamos experimentos de ChIP imunoprecipitando NCoR1. Ao contrário dos resultados de PGC-1 α (Figura 2), o tratamento com H₂O₂ reduziu a interação de NCoR1 nos promotores da SOD2, GPx1 e catalase (Fig. 11F) indicando um estado de-reprimido nessas regiões da cromatina. Esses resultados sugerem que a de-repressão mediada pela atividade de NCoR1 em promotores de enzimas antioxidantes mitocondriais é crucial para a manutenção dos níveis de ROS e suporta a hipótese de papéis antagônicos de NCoR1 e PGC-1 α na homeostase redox mitocondrial.

Figura 11. O silenciamento de NCoR1 induz a expressão de SOD2 e reduz os níveis de ROS mitocondrial. (A) Análise de picos de ligação PPAR γ , RxR e NCoR1 de ChIPseq em células 3T3. (B) Os níveis de ROS foram medidos em linhagens C2C12-shLuc ou C2C12-shNCoR1 (n = 6). (G) (C) A expressão gênica de SOD2, GPx1 e catalase foram medidas por qRT-PCR em linhagens C2C12-shLuc ou C2C12-shNCoR1 (n = 6). (D) A expressão gênica de SOD2 foi medida por qRT-PCR em células MEF transfectadas com pCDNA, pCDNA-PGC1 α , pCDNA-NCoR1, pLko-shNCoR (n = 6). (E) Os níveis de ROS mitocondrial foram medidos em células musculares transfectadas com pCDNA, pCDNA-PPAR β , pCDNA-PGC1 α , pCDNA-NCoR1, pLko-shNCoR, ou com as combinações representadas na figura. (F) A ligação de NCoR1 no PPARE nos promotores murinos de SOD2, GPx1 e de catalase foi determinada por ChIP em células musculares tratados com H₂O₂ durante 1 hora (n = 4). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

5.2.6 O tratamento com palmitato induz o ancoramento de PGC-1 α em PPRES de promotores de genes antioxidantes

O aumento da ingestão de nutrientes é uma das principais causas da obesidade e diabetes tipo 2 (Koliaki and Roden 2016). Estudos prévios revelaram que o excesso de lipídios intracelulares promove a disfunção mitocondrial, levando à produção de ROS e morte celular (Tumova et al. 2015). Em células musculares, o tratamento com palmitato, um ácido graxo saturado, induziu um fenótipo similar (Apêndice A Fig. 6). A redução dos níveis de PGC-1 α , considerado o regulador chave da biogênese mitocondrial, parece desempenhar um papel central neste processo (Besseiche et al. 2015). No entanto, a atividade de PGC-1 α em locais específicos da cromatina e sua regulação em células sob estresse metabólico não estão bem definidos. Buscamos, portanto, estudar o papel do PGC-1 α na resposta celular a níveis elevados de lipídios

em células musculares esqueléticas. Curiosamente, embora os níveis transcricionais e protéicos de PGC-1 α diminuam com a exposição crônica ao palmitato (Fig. 12B e 12C), houve indução de vários genes envolvidos na biogênese mitocondrial e defesa antioxidante, juntamente com aumento da transativação de PPRE (Fig. 12A, 12B e 12D). Ainda, o conteúdo proteico de SOD, catalase e GPx1 aumentou quando as células foram expostas ao ácido palmítico em concentrações variando de 250 a 500 μ M (Fig. 12E). Esses resultados nos levaram a investigar se o PGC-1 α poderia estar regulando a expressão dos genes antioxidantes apesar dos seus níveis reduzidos. Interessantemente, através de experimentos de ChIP, demonstramos que o PGC-1 α é altamente enriquecido nos promotores de SOD2, GPx1, catalase e UCP3 em células tratadas com palmitato (Fig. 12F). Este mecanismo indica que as células sob o estresse metabólico ainda são capazes de dirigir o PGC-1 α para promotores específicos induzindo a expressão de genes envolvidos na função mitocondrial e na detoxificação de ROS, independentemente do nível protéico de PGC-1 α , e sugere que genes antioxidantes induzidos por PGC-1 α são essenciais para a viabilidade celular. Ainda, de-repressão de NCoR1 parece ter um papel importante nesse contexto visto que o tratamento com palmitato causou a redução dos níveis proteicos de NCoR1 (Fig. 12C).

Figura 12. O tratamento com palmitato induz a associação de PGC-1α e a transativação de promotores de genes antioxidantes. (A) Os níveis de transativação de PPRE foram avaliados através da atividade de Luciferase (PPRE-Luc) em células musculares tratadas com 250 e 500 μM de palmitato ou BSA por 24 horas (n = 5). (B) A expressão gênica de PGC-1α, NRF-1, CytC e Tfam foi medida por qRT-PCR em células musculares tratadas com 500 μM de palmitato ou BSA durante 24 horas (n = 6). (C) Os níveis de proteína PGC-1α e NCoR1 em células musculares tratadas com BSA ou palmitato foram determinados por Western Blot. (D) A expressão gênica de enzimas antioxidantes e UCP3 foi medida por qRT-PCR em células musculares tratadas com BSA ou palmitato (n = 6). (E) Os níveis de proteína SOD2, GPx1 e catalase foram determinados por Western Blot em células musculares tratadas com BSA ou palmitato. (F) A ligação PGC-1α no PPRE dos promotores da SOD2, GPx1, catalase e UCP3 foi determinada por ChIP em células musculares tratadas com BSA ou palmitato (n = 4). Os dados são expressos como média ± SEM.

5.2.7 Silenciamento de NCoR1 ou expressão de PGC-1α atenua a produção de ROS induzida por lipídeos e a morte celular em células musculares

Baseados em nossos resultados, nós hipotetizamos que os efeitos de NCoR1 e PGC-1α poderiam ter um impacto significativo em condições que envolvem disfunção mitocondrial e estresse oxidativo devido ao seu duplo efeito no metabolismo celular e na defesa antioxidante.

Para testar essa hipótese incubamos células estavelmente silenciadas para NCoR1 e células PGC-1 α positivas com palmitato [500 μ M] durante 24h. Interessantemente, ambas as células transduzidas atenuaram a produção de ROS mitocondrial, a morte celular e a apoptose em células musculares tratadas com palmitato (Fig. 13A, 13B, 13C, 13D, 13I e 13J; Apêndice A Fig. 7, e Fig. 8 e Fig. 9) sugerindo que ambos os co-reguladores têm efeitos significativos no estresse metabólico causado pela sobrecarga de lipídios. Não podemos excluir a possibilidade de que o impacto desses co-reguladores no metabolismo celular possa ser a principal causa desses resultados. No entanto, os efeitos da expressão de catalase, uma das principais enzimas detoxificadoras de H₂O₂ e o tratamento com antioxidante mitocondrial, mitoTEMPO, mostraram resultados semelhantes em células tratadas com palmitato, destacando o papel crucial da homeostase redox na viabilidade celular (Fig. 13E até 13H).

Figura 13. O silenciamento de NCoR1 ou expressão de PGC-1 α atenua a produção de ROS induzida por lipídeos e a morte celular. (A e B) A produção de ROS mitocondrial e os níveis de fluorescência de iodeto de propídio foram medidos em células musculares infectadas com Ad-GFP ou Ad-PGC-1 α tratados com palmitato ou BSA (n = 6). (C e D) A produção de ROS mitocondrial e níveis de fluorescência de iodeto de propídio foram determinados em linhagens C2C12-shLuc ou C2C12-shNCoR1 tratadas com palmitato ou BSA (n = 6). (E e F) Os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os níveis de fluorescência de iodeto de propídio foram medidos em células musculares tratadas com mitoTEMPO ou DMSO e tratados com palmitato ou BSA (n = 6). (G e H) Níveis de H₂O₂ e níveis de fluorescência de iodeto de propídio foram medidos em células musculares transfectadas com pCDNA ou pCDNA-Catalase tratados com palmitato ou BSA (n = 6). (I) Os níveis de proteína de caspase 3 clivados foram determinados por Western blot em linhagens C2C12-shLuc ou C2C12-shNCoR1 tratados com palmitato ou BSA. (J) Os níveis protéicos de caspase 3 clivados foram determinados por Western blot a partir em linhagens C2C12-pBABE ou C2C12-pBABE-PGC-1 α tratadas com palmitato a 250 e 500 μ M ou BSA. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

5.2.8 Efeito do AICAR em células musculares.

5-Aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) é um análogo da adenosina monofosfato (AMP) capaz de estimular a atividade da AMPK. Tem sido mostrado que a ativação da AMPK induz o metabolismo oxidativo no músculo esquelético (Narkar et al. 2008). Nós demonstramos que o tratamento com AICAR em miotubos induziu a atividade do ciclo TCA

conforme indicado pelo aumento nos níveis de malato, oxaloacetato e α -cetoglutarato (Fig. 14A) atenuando a produção de lactato (Fig. 14B). Esses resultados sugerem que o tratamento com AICAR intensifica o metabolismo oxidativo em células musculares assim como demonstrado em outros estudos (Narkar et al. 2008; Fan et al. 2017). Há evidências de que o AICAR aumenta o metabolismo oxidativo através da ativação de mediadores essenciais para a biogênese mitocondrial como o PGC-1 α e PPAR β (Fan et al. 2017). A ativação de PGC-1 α mediada por AMPK no músculo esquelético parece ser regulada a nível transcricional e pós-traducional já que AMPK fosforila e regula a expressão PGC-1 α (Jäger et al. 2007; Irrcher et al. 2008). Para testar esse fenômeno em nosso modelo, avaliamos a expressão de PGC-1 α por qPCR, e a transativação do elemento responsivo de PPAR (PPRE) através de ensaio de luciferase. Esses experimentos revelaram que o tratamento com AICAR induz a transcrição de PGC-1 α e a transativação de PPAR como demonstrado pela indução de PPRE (Fig. 14C and 14D) sugerindo uma ativação dependente do eixo AMPK/PGC-1 α . Visto que PGC-1 α e PPAR estão envolvidos na regulação do status redox (Kim and Yang 2013; St-Pierre et al. 2006) avaliamos o efeito do tratamento com AICAR na defesa antioxidante em células musculares. AICAR reduziu a produção de ROS e induziu a expressão das enzimas antioxidantes mitocondriais SOD2, GPx1 e catalase (Fig. 14E). Esses resultados indicam que AICAR regula ambos o metabolismo oxidativo e a defesa antioxidante, possivelmente pela indução da via de sinalização PGC-1 α /PPAR.

A

Figura 14. AICAR induz o metabolismo oxidativo e a expressão de genes das enzimas antioxidantes nas células do músculo esquelético. (A) Níveis de malato, oxaloacetato e alfa-cetoglutarato em miotubos tratados com AICAR (n = 6). (B) Níveis de lactato em miotubos tratados com AICAR (n = 6). (C) A expressão de gene de PGC-1α foi medida por qRT-PCR em miotubos tratados com AICAR (n = 6). (D) Atividade de Luciferase usando plasmídeos repórter de PPRE-Luc em células miotubos tratados com AICAR (n = 5). (E) A expressão de SOD2, GPx1 e catalase (CAT) foi medida por qRT-PCR em miotubos tratados com AICAR (n = 6). Os dados são expressos como média ± SEM.

5.2.9 AICAR protege miotubos contra a morte celular induzida por lipídeos.

Nossas evidências e outros estudos (Fan et al. 2017; Rabinovitch et al. 2017) sugerem que o AICAR tem um potencial efeito terapêutico em condições deletérias no músculo esquelético. No entanto, não está claro se o tratamento com AICAR atenua as alterações redox e metabólicas causadas pelo excesso de nutrientes em células musculares, uma condição que se assemelha a obesidade e diabetes tipo 2 (Fisher-Wellman and Neuffer 2012). Portanto, investigamos o impacto do AICAR na produção de ROS celular, função mitocondrial e viabilidade celular em células

musculares esqueléticas expostas a 500 μ M de palmitato. Como esperado, o tratamento com palmitato foi suficiente para causar disfunção mitocondrial como evidenciado pelas taxas reduzidas de consumo de oxigênio e capacidade de reserva mitocondrial (Fig. 15A e 15B). O tratamento com AICAR protegeu a célula contra os efeitos do palmitato na respiração mitocondrial (Fig. 15A e 15B). Importaneamente, o tratamento com AICAR impediu a indução nos níveis de ROS pelo tratamento com palmitato (Fig. 15D). Os níveis de ROS estão fortemente relacionados à viabilidade celular. Portanto, investigamos se a remoção de ROS por AICAR poderia proteger as células musculares contra a morte induzida por palmitato. Ao medir a fluorescência de iodeto de propídio (PI), mostramos que o tratamento com AICAR atenua a morte celular induzida pelo palmitato nas células do músculo esquelético (Fig. 15E). Esses resultados sugerem que os efeitos do tratamento com AICAR protegem as células contra o estresse metabólico, indicando a existência de uma via de sinalização unificada que converte a ativação do AMPK na expressão de genes associados ao metabolismo oxidativo e status redox. O PGC-1 α parece ser um potencial candidato, pois é um regulador crucial da biogênese mitocondrial e também está envolvido na expressão das enzimas antioxidantes mitocondriais (St-Pierre et al. 2003; St-Pierre et al. 2006; Kang and Li Ji 2012; Baldelli et al. 2014; Dominy and Puigserver 2013). A análise de qPCR de PGC-1 α revelou que o AICAR induz a expressão de PGC-1 α em células tratadas com palmitato e não tratadas, refletindo os efeitos fenotípicos de AICAR na função mitocondrial e no estado redox (Fig. 15E). Esses achados sugerem que os efeitos mediados por AICAR no estado metabólico e antioxidante em miotubos dependem da atividade da PGC-1 α .

Figura 15. AICAR previne a produção de ROS e morte celular induzida por lipídeos. (A) A taxa de consumo de oxigênio foi medida em miotubos tratados com AICAR, palmitato ou AICAR com palmitato (n = 6). (B e C) A capacidade de reserva e a taxa de consumo de oxigênio acoplado a síntese de ATP foram medidas em miotubos tratados com AICAR, palmitato ou AICAR com

palmitato ($n = 6$). (D e E) A produção de ROS e os níveis de fluorescência de iodeto de propídio foram medidos em miotubos tratados com AICAR, palmitato ou AICAR com palmitato ($n = 6$). (F) A expressão de gene de PGC-1 α foi medida em miotubos tratados com AICAR, palmitato ou AICAR com palmitato ($n = 6$). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

Figura 16. Figura ilustrativa demonstrando o efeito dos co-reguladores PGC-1 α e NCoR1 na homeostase redox mitocondrial.

5.3 Discussão

A capacidade de responder às flutuações de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um aspecto central da fisiologia dos mamíferos. Este processo dinâmico depende da ação coordenada de fatores transcricionais desencadeados para promover a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes. Neste trabalho, demonstramos que as células musculares esqueléticas respondem rapidamente aos aumentos nos níveis de ROS, conduzindo o coativador PGC-1 α e dissociando NCoR1 nos promotores das principais enzimas antioxidantes mitocondriais que, por sua vez, impacta nos níveis de expressão desses genes. Mostramos ainda que esses co-reguladores atuam coordenando a ativação de PPAR β em elementos responsivos de PPAR (PPRE) localizados no promotor de SOD2 e de outras enzimas antioxidantes. Importaneamente, a expressão de PGC-1 α e o silenciamento de NCoR1 induzem a expressão de SOD2 e reduzem os níveis de ROS atenuando a morte celular causada por sobrecarga de lipídios, fornecendo uma perspectiva terapêutica interessante para o tratamento de condições associadas a disfunção metabólica e níveis excessivos de ROS.

Estudos prévios revelaram que o excesso de lipídios intracelulares promove a disfunção mitocondrial, levando à produção de ROS e morte celular (Tumova et al. 2015; Martins et al. 2012). A redução dos níveis de PGC-1 α parece desempenhar um papel central neste processo (Besseiche et al. 2015; Kang and Li Ji 2012). No entanto, o mecanismo envolvido neste processo não está bem definido. Através dos ensaios ChIP, demonstramos que as células tratadas com altos níveis de ácidos graxos saturados são capazes de conduzir o PGC-1 α a todos os promotores de enzimas antioxidantes, apesar dos níveis reduzidos de proteína PGC-1 α , sugerindo que o PGC-1 α é um elemento essencial da resposta antioxidante ao estresse metabólico. De fato, o PGC-1 α parece desempenhar um papel crucial na defesa antioxidante mitocondrial nas células do músculo esquelético, pois induz a expressão de SOD2, a principal enzima antioxidante mitocondrial, é essencial para a detoxificação de ROS durante a diferenciação de células musculares e é crucial para a resposta antioxidante a níveis elevados de H₂O₂.

PGC-1 α coactiva diversos fatores de transcrição envolvidos no metabolismo energético e na homeostase mitocondrial (Kang and Li Ji 2012; Puigserver et al. 1998; Wu et al. 1999; Dominy and Puigserver 2013). No entanto, os efetores induzidos por PGC-1 α da defesa antioxidante mitocondrial em células do músculo esquelético são desconhecidos. Visto que PGC-1 α coativa

PPARs e estudos prévios demonstrarem que PPARs podem regular a expressão de enzimas antioxidantes (Kim and Yang 2013), hipotetizamos que o PGC-1 α poderia estar mediando a expressão de enzimas antioxidantes em células musculares através da ativação de PPAR. Vários resultados apresentados neste trabalho suportam essa hipótese. Nossas análises *in silico* identificaram diversas sequências de PPREs nos promotores SOD2, GPx1, catalase e UCP3. Ao analisar dados públicos disponíveis do ChIP seq, identificamos uma alta sobreposição entre RXR e PPAR γ nesses promotores sugerindo que o PPRE localizado nos principais promotores desses genes são funcionais. Além disso, ao silenciar essas isoformas usando RNA de interferência (siRNA), demonstramos que o silenciamento de PPAR β e PPAR α atenuam os níveis proteicos de SOD2. Experimentos de transativação de PPRE mostraram que PGC-1 α ativa todas as 3 isoformas de PPARs. Além disso, os agonistas de PPAR β , GW501516 e GW0742, e o agonista de AMPK, AICAR, que também induz a ativação de PPAR induziram a expressão de genes de enzimas antioxidantes. Esses achados sugerem que o PPRE encontrado em muitos genes envolvidos na regulação redox é funcional e que o eixo PGC-1 α /PPAR β é um mediador primário da indução de SOD2.

A integração transcricional da biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo depende da ação sincronizada de vários fatores de transcrição e co-reguladores (Scarpulla et al. 2012). Evidências recentes colocaram o NCoR1 como um modulador essencial da função oxidativa (Mottis et al. 2013; Yamamoto et al. 2011). Através de experimentos de luciferase, mostramos que NCoR1 reprime a transativação de PPRE, o que implica que a ativação de PPAR depende da dissociação de NCoR1. De fato, o PPAR β é um dos principais alvos do NCoR1 envolvido na indução do metabolismo oxidativo no músculo esquelético (Yamamoto et al. 2011). Baseado no fato de que o eixo PPAR β está envolvido na ativação de genes antioxidantes, hipotetizamos que NCoR1 também poderia afetar a homeostase redox mitocondrial. Usando dados ChIPseq, identificamos uma alta sobreposição entre os picos de NCoR1 e PPAR-RXR nos promotores dos genes SOD2, GPx1, catalase e UCP3 sugerindo que PPAR/RxR é um alvo a jusante de NCoR1 nesses sítios. Apoiando essa visão, o silenciamento de NCoR1 induziu a expressão de SOD2 e diminuiu a produção de ROS mitocondrial sugerindo que SOD2 é um alvo direto de NCoR1. Além disso, a co-expressão de NCoR1 e PPAR β aumentou ainda mais a produção de ROS indicando a indução do recrutamento de NCoR1 nos genes alvo PPAR β , aumentando assim a repressão antioxidante mediada por NCoR1. Esses achados sugerem que NCoR1 tem um papel

essencial na produção de ROS mitocondrial e o mecanismo envolvido parece depender da regulação de PPAR no promotor de SOD2. Esta via de sinalização fornece um mecanismo não explorado para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de condições patológicas associadas ao estresse oxidativo e metabólico. De fato, nossos resultados revelaram que a ativação de PPAR β através do silenciamento de NCoR1 ou expressão de PGC-1 α atenua a produção de ROS induzida por lipídeos, a apoptose e a morte celular em células musculares esqueléticas.

5.4 Conclusão

Em resumo, demonstramos que os co-reguladores transcricionais PGC-1 α e NCoR1 são mediadores essenciais da homeostase redox mitocondrial em células musculares esqueléticas. Nossos achados revelaram que estes possuem papéis antagônicos na indução antioxidante mitocondrial mediada por PPAR β através da transativação PPARE no promotor de SOD2. Esta rede regulatória pela qual o balanço entre co-ativador e co-repressor determina a capacidade antioxidante mitocondrial e conecta a regulação redox da célula ao controle energético por uma via de sinalização unificada oferecendo novas oportunidades terapêuticas para o tratamento de doenças metabólicas, como obesidade e diabetes tipo 2.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A complexidade envolvida nos circuitos regulatórios da função mitocondrial ilustra como as células possuem diversas camadas de regulação finamente sincronizadas para atender aos requisitos celulares. Embora o controle molecular da função mitocondrial esteja longe de ser totalmente definido, achados recentes e resultados deste trabalho colocam os co-reguladores de receptores nucleares como mediadores importantes de vias de sinalização envolvidas no controle metabólico e na homeostase redox mitocondrial. A identificação e caracterização do co-repressor NCoR1 como um ator central e evolutivamente conservado no metabolismo mitocondrial representa um interessante nível de regulação intracelular na qual o balanço dos efeitos opostos de co-ativadores e co-repressores determinam a atividade transcricional de genes mitocondriais. No entanto, as vias de sinalização que culminam na dissociação de co-repressores para a associação de co-ativadores em receptores nucleares e fatores de transcrição ainda são relativamente desconhecidos. Será crucial para a área identificar os componentes moleculares que impulsionam a dissociação e/ou a degradação de NCoR1 em promotores e *enhancers* mitocondriais conectando

esse processo a sensores energéticos conhecidos como AMPK e CaMK. Interessantemente, a ativação do eixo AMPK causa efeitos similares ao silenciamento de NCoR1 e expressão de PGC-1 α na defesa antioxidante e na capacidade oxidativa em células musculares. Além disso, é provável que o NCoR1 tenha um papel significativo na indução β -adrenérgica de genes mitocondriais, uma vez que a expressão de genes alvos de CREB parece depender da degradação dependente da ubiquitinação de NCoR1 nos promotores desses genes (Catic et al. 2013) e o tratamento com isoproterenol causar reduções drásticas nos níveis de NCoR1 em células musculares.

Embora a maioria dos estudos prévios tenham abordado o papel de NCoR1 em tecidos hepáticos (Jo et al. 2015), musculares (Yamamoto et al. 2011) e adiposos (Li et al. 2011), será essencial investigar de que forma o NCoR1 regula a homeostase mitocondrial em outros tecidos, incluindo o pâncreas, o sistema nervoso central (SNC) e o tecido cardíaco. Esses estudos serão cruciais para expor as diferenças e semelhanças da contribuição NCoR1 ao metabolismo energético em diferentes tecidos e para o desenvolvimento de abordagens farmacológicas com intuito de potencializar a função mitocondrial localizada. Outra pesquisa deve visar a investigação do interactoma funcional do NCoR1 buscando identificar e caracterizar outros fatores de transcrição e proteínas regulatórias envolvidas na função mitocondrial e no metabolismo oxidativo. Além disso, avaliar o interactoma do NCoR1 em diferentes contextos fisiológicos e localizações subcelulares irá proporcionar uma melhor compreensão da função e regulação do co-repressor. Vários métodos bioquímicos poderiam ser aproveitados para este propósito, tais como métodos baseados em rotulagem de proximidade acoplado à espectrometria de massas e o uso de CRISPR/Cas9 para inserção de *tags* em proteínas endógenas para posterior imunoprecipitação seguida de análise proteômica. A integração desses estudos com a identificação do cistroma por ChIP-seq juntamente com dados de sequenciamento de nova geração (RNAseq) fornecerá uma visão completa das redes regulatórias coordenadas por NCoR1. Além disso, abordar a regulação espacial e temporal da mudança de co-reguladores em promotores de genes mitocondriais, fornecerá uma visão mais detalhada da dinâmica de ligação e dissociação na cromatina. A definição do mecanismo de troca de co-reguladores em receptores nucleares e fatores de transcrição ajudará a determinar se a natureza da ligação de co-repressores e co-ativadores na cromatina é cíclica (Métivier et al. 2003), combinatória (Mikkelsen et al. 2007; Wang et al. 2009) ou unidirecional (Pascual et al. 2005).

Estudos em andamento em nosso laboratório têm sugerido que o co-repressor NCoR1

possui uma natureza combinatória de interação na cromatina e é fortemente regulado pela via ubiquitina proteassoma em células musculares (Apêndice A Fig. 10). Nossos dados preliminares têm demonstrado, ainda, que o NCoR1 possui funções em eventos biológicos não abordados em estudos prévios, incluindo fissão mitocondrial (Apêndice A Fig 12) e vias associadas a processos anabólicos (Apêndice A Fig 11). Atualmente, estamos otimizando ensaios de ChIPseq e de interactoma funcional do NCoR1 para, em breve, obter mais informações sobre o papel do NCoR1 na homeostase celular. Esperamos que os resultados gerados por esses experimentos abram novas perspectivas no entendimento do controle molecular do metabolismo energético e da função mitocondrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamovich, Y., Shlomai, A., Tsvetkov, P., Umansky, K.B., Reuven, N., Estall, J.L., Spiegelman, B.M. and Shaul, Y. 2013. The protein level of PGC-1 α , a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1. *Molecular and Cellular Biology* 33(13), pp. 2603–2613.

Anderson, J.E. 2006. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *The Journal of Experimental Biology* 209(Pt 12), pp. 2276–2292.

Arany, Z., Wagner, B.K., Ma, Y., Chinsomboon, J., Laznik, D. and Spiegelman, B.M. 2008. Gene expression-based screening identifies microtubule inhibitors as inducers of PGC-1 α and oxidative phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(12), pp. 4721–4726.

Astapova, I., Lee, L.J., Morales, C., Tauber, S., Bilban, M. and Hollenberg, A.N. 2008. The nuclear corepressor, NCoR, regulates thyroid hormone action in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(49), pp. 19544–19549.

Astapova, I., Vella, K.R., Ramadoss, P., Holtz, K.A., Rodwin, B.A., Liao, X.-H., Weiss, R.E., Rosenberg, M.A., Rosenzweig, A. and Hollenberg, A.N. 2011. The nuclear receptor corepressor (NCoR) controls thyroid hormone sensitivity and the set point of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Molecular Endocrinology* 25(2), pp. 212–224.

Baldelli, S., Aquilano, K. and Ciriolo, M.R. 2014. PGC-1 α buffers ROS-mediated removal of mitochondria during myogenesis. *Cell death & disease* 5, p. e1515.

Besseiche, A., Riveline, J.P., Gautier, J.F., Bréant, B. and Blondeau, B. 2015. Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 41(5), pp. 347–357.

Brand, M.D. and Esteves, T.C. 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism* 2(2), pp. 85–93.

Cantó, C. and Auwerx, J. 2009. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current opinion in lipidology* 20(2), pp. 98–105.

Cantó, C., Menzies, K.J. and Auwerx, J. 2015. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism* 22(1), pp. 31–53.

Carter, R.S., Bhat, N.K., Basu, A. and Avadhani, N.G. 1992. The basal promoter elements of murine cytochrome c oxidase subunit IV gene consist of tandemly duplicated ets motifs that bind to GABP-related transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 267(32), pp. 23418–23426.

Casas, F., Rochard, P., Rodier, A., Cassar-Malek, I., Marchal-Victorion, S., Wiesner, R.J., Cabello, G. and Wrutniak, C. 1999. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA α 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology* 19(12), pp. 7913–7924.

Catic, A., Suh, C.Y., Hill, C.T., Daheron, L., Henkel, T., Orford, K.W., Dombkowski, D.M., Liu, T., Liu, X.S. and Scadden, D.T. 2013. Genome-wide map of nuclear protein degradation shows NCoR1 turnover as a key to mitochondrial gene regulation. *Cell* 155(6), pp. 1380–1395.

Chen, J.D. and Evans, R.M. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548), pp. 454–457.

Cox, B. and Emili, A. 2006. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nature Protocols* 1(4), pp. 1872–1878.

Cox, J. and Mann, M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* 26(12), pp. 1367–1372.

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V. and Mann, M. 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of Proteome Research* 10(4), pp. 1794–1805.

De Rasmio, D., Signorile, A., Roca, E. and Papa, S. 2009. cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *The FEBS Journal* 276(16), pp. 4325–4333.

Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D. and Jackson, M.J. 2012. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Research Notes* 5, p. 513.

Dominy, J.E. and Puigserver, P. 2013. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(7).

Dreos, R., Ambrosini, G., Périer, R.C. and Bucher, P. 2015. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Research* 43(Database issue), pp. D92–6.

- D'Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Lo Sasso, G., Latorre, D., Martelli, N., Egorova, A.V., Polishuck, R., Madeyski-Bengtson, K., Lelliott, C., Vidal-Puig, A.J., Seibel, P., Villani, G. and Moschetta, A. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(16), pp. 6603–6608.
- Emmett, M.J., Lim, H.-W., Jager, J., Richter, H.J., Adlanmerini, M., Peed, L.C., Briggs, E.R., Steger, D.J., Ma, T., Sims, C.A., Baur, J.A., Pei, L., Won, K.-J., Seale, P., Gerhart-Hines, Z. and Lazar, M.A. 2017. Histone deacetylase 3 prepares brown adipose tissue for acute thermogenic challenge. *Nature* 546(7659), pp. 544–548.
- Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. 1989. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *The Journal of Biological Chemistry* 264(24), pp. 14361–14368.
- Fan, W. and Evans, R. 2015. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Current Opinion in Cell Biology* 33, pp. 49–54.
- Fan, W., Waizenegger, W., Lin, C.S., Sorrentino, V., He, M.-X., Wall, C.E., Li, H., Liddle, C., Yu, R.T., Atkins, A.R., Auwerx, J., Downes, M. and Evans, R.M. 2017. Ppar δ promotes running endurance by preserving glucose. *Cell Metabolism* 25(5), p. 1186–1193.e4.
- Fang, L., Zhang, M., Li, Y., Liu, Y., Cui, Q. and Wang, N. 2016. Ppargene: A database of experimentally verified and computationally predicted PPAR target genes. *PPAR Research* 2016, p. 6042162.
- Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P. and Yen, P.M. 2001. Transgenic targeting of a dominant negative corepressor to liver blocks basal repression by thyroid hormone receptor and increases cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry* 276(18), pp. 15066–15072.
- Fisher-Wellman, K.H. and Neuffer, P.D. 2012. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23(3), pp. 142–153.
- Flück, M. 2006. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The Journal of Experimental Biology* 209(Pt 12), pp. 2239–2248.
- Flynn, J.M., Meadows, E., Fiorotto, M. and Klein, W.H. 2010. Myogenin regulates exercise capacity and skeletal muscle metabolism in the adult mouse. *Plos One* 5(10), p. e13535.
- Franko, A., Mayer, S., Thiel, G., Mercy, L., Arnould, T., Hornig-Do, H.-T., Wiesner, R.J. and Goffart, S. 2008. CREB-1alpha is recruited to and mediates upregulation of the cytochrome c promoter during enhanced mitochondrial biogenesis accompanying skeletal muscle differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 28(7), pp. 2446–2459.
- Fu, X., Zhao, J.-X., Liang, J., Zhu, M.-J., Foretz, M., Viollet, B. and Du, M. 2013. AMP-activated protein kinase mediates myogenin expression and myogenesis via histone deacetylase 5. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 305(8), pp. C887–95.

- Gleyzer, N., Vercauteren, K. and Scarpulla, R.C. 2005. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and Cellular Biology* 25(4), pp. 1354–1366.
- Gopalakrishnan, L. and Scarpulla, R.C. 1994. Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 269(1), pp. 105–113.
- Gosker, H.R., van Mameren, H., van Dijk, P.J., Engelen, M.P.K.J., van der Vusse, G.J., Wouters, E.F.M. and Schols, A.M.W.J. 2002. Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The European Respiratory Journal* 19(4), pp. 617–625.
- Guenther, M.G., Barak, O. and Lazar, M.A. 2001. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Molecular and Cellular Biology* 21(18), pp. 6091–6101.
- Gugneja, S., Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. 1995. Four structurally distinct, non-DNA-binding subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. *Molecular and Cellular Biology* 15(1), pp. 102–111.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D.D. and Kelly, D.P. 1994. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(23), pp. 11012–11016.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T. and Spiegelman, B.M. 2003. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12), pp. 7111–7116.
- Handy, D.E. and Loscalzo, J. 2012. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants & Redox Signaling* 16(11), pp. 1323–1367.
- Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M. and Glass, C.K. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548), pp. 397–404.
- Hu, X. and Lazar, M.A. 1999. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402(6757), pp. 93–96.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 37(1), pp. 1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4(1), pp. 44–57.

- Irrcher, I., Ljubicic, V., Kirwan, A.F. and Hood, D.A. 2008. AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1 α promoter in skeletal muscle cells. *Plos One* 3(10), p. e3614.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B.M. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(29), pp. 12017–12022.
- Jepsen, K., Gleiberman, A.S., Shi, C., Simon, D.I. and Rosenfeld, M.G. 2008. Cooperative regulation in development by SMRT and FOXP1. *Genes & Development* 22(6), pp. 740–745.
- Jepsen, K. and Rosenfeld, M.G. 2002. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *Journal of Cell Science* 115(Pt 4), pp. 689–698.
- Jo, Y.S., Ryu, D., Maida, A., Wang, X., Evans, R.M., Schoonjans, K. and Auwerx, J. 2015. Phosphorylation of the nuclear receptor corepressor 1 by protein kinase B switches its corepressor targets in the liver in mice. *Hepatology* 62(5), pp. 1606–1618.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D.G. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism* 1(1), pp. 15–25.
- Kang, C. and Li Ji, L. 2012. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271, pp. 110–117.
- Kawahara, R., Lima, R.N., Domingues, R.R., Pauletti, B.A., Meirelles, G.V., Assis, M., Figueira, A.C.M. and Paes Leme, A.F. 2014. Deciphering the role of the ADAM17-dependent secretome in cell signaling. *Journal of Proteome Research* 13(4), pp. 2080–2093.
- Kim, T. and Yang, Q. 2013. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. *World journal of cardiology* 5(6), pp. 164–174.
- Koliaki, C. and Roden, M. 2016. Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus. *Annual review of nutrition* 36(1), pp. 337–367.
- Kraft, C.S., LeMoine, C.M.R., Lyons, C.N., Michaud, D., Mueller, C.R. and Moyes, C.D. 2006. Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 290(4), pp. C1119-27.
- Le Grand, F. and Rudnicki, M.A. 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 19(6), pp. 628–633.
- Leick, L., Wojtaszewski, J.F.P., Johansen, S.T., Kiilerich, K., Comes, G., Hellsten, Y., Hidalgo, J. and Pilegaard, H. 2008. PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 294(2), pp. E463-74.
- Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J. and Wong, J. 2000. Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *The EMBO*

Journal 19(16), pp. 4342–4350.

Li, P., Fan, W., Xu, J., Lu, M., Yamamoto, H., Auwerx, J., Sears, D.D., Talukdar, S., Oh, D., Chen, A., Bandyopadhyay, G., Scadeng, M., Ofrecio, J.M., Nalbandian, S. and Olefsky, J.M. 2011. Adipocyte NCoR knockout decreases PPAR γ phosphorylation and enhances PPAR γ activity and insulin sensitivity. *Cell* 147(4), pp. 815–826.

Lieber, R.L., Roberts, T.J., Blemker, S.S., Lee, S.S.M. and Herzog, W. 2017. Skeletal muscle mechanics, energetics and plasticity. *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation* 14(1), p. 108.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), pp. 402–408.

Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. 2009. Emerging roles of the ubiquitin proteasome system in nuclear hormone receptor signaling. *Progress in molecular biology and translational science* 87, pp. 117–135.

Maneix, L. and Catic, A. 2016. Touch and go: nuclear proteolysis in the regulation of metabolic genes and cancer. *FEBS Letters* 590(7), pp. 908–923.

Martins, A.R., Nachbar, R.T., Gorjao, R., Vinolo, M.A., Festuccia, W.T., Lambertucci, R.H., Cury-Boaventura, M.F., Silveira, L.R., Curi, R. and Hirabara, S.M. 2012. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in health and disease* 11, p. 30.

Métivier, R., Penot, G., Hübner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F. 2003. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115(6), pp. 751–763.

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C. and Bernstein, B.E. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448(7153), pp. 553–560.

Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P.J., Schulman, I.G., Heyman, R.A., Lander, E.S. and Spiegelman, B.M. 2004. Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(17), pp. 6570–6575.

Mottis, A., Mouchiroud, L. and Auwerx, J. 2013. Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes & Development* 27(8), pp. 819–835.

Mouchiroud, L., Eichner, L.J., Shaw, R.J. and Auwerx, J. 2014. Transcriptional coregulators: fine-tuning metabolism. *Cell Metabolism* 20(1), pp. 26–40.

- Narici, M.V., Reeves, N.D., Morse, C.I. and Maganaris, C.N. 2004. Muscular adaptations to resistance exercise in the elderly. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 4(2), pp. 161–164.
- Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Embler, E., Wang, Y.-X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R.J. and Evans, R.M. 2008. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 134(3), pp. 405–415.
- Olmos, Y., Valle, I., Borniquel, S., Tierrez, A., Soria, E., Lamas, S. and Monsalve, M. 2009. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *The Journal of Biological Chemistry* 284(21), pp. 14476–14484.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. 2005. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437(7059), pp. 759–763.
- Patti, M.-E. and Corvera, S. 2010. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 31(3), pp. 364–395.
- Paulo, J.A., Gaun, A., Kadiyala, V., Ghouli, A., Banks, P.A., Conwell, D.L. and Steen, H. 2013. Subcellular fractionation enhances proteome coverage of pancreatic duct cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1834(4), pp. 791–797.
- Pérez-Schindler, J., Summermatter, S., Salatino, S., Zorzato, F., Beer, M., Balwierz, P.J., van Nimwegen, E., Feige, J.N., Auwerx, J. and Handschin, C. 2012. The corepressor NCoR1 antagonizes PGC-1 α and estrogen-related receptor α in the regulation of skeletal muscle function and oxidative metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 32(24), pp. 4913–4924.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W. and Rosenfeld, M.G. 2004. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116(4), pp. 511–526.
- Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. 2010. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nature Reviews. Genetics* 11(2), pp. 109–123.
- Perissi, V. and Rosenfeld, M.G. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6(7), pp. 542–554.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. 1999. Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes & Development* 13(24), pp. 3198–3208.
- Powers, S.K. and Jackson, M.J. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews* 88(4), pp. 1243–1276.
- Powers, S.K., Kavazis, A.N. and McClung, J.M. 2007. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology* 102(6), pp. 2389–2397.

- Powers, S.K., Smuder, A.J. and Criswell, D.S. 2011. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxidants & Redox Signaling* 15(9), pp. 2519–2528.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B.M. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92(6), pp. 829–839.
- Quirós, P.M., Mottis, A. and Auwerx, J. 2016. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17(4), pp. 213–226.
- Rabinovitch, R.C., Samborska, B., Faubert, B., Ma, E.H., Gravel, S.-P., Andrzejewski, S., Raissi, T.C., Pause, A., St-Pierre, J. and Jones, R.G. 2017. AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell reports* 21(1), pp. 1–9.
- Rangwala, S.M., Wang, X., Calvo, J.A., Lindsley, L., Zhang, Y., Deyneko, G., Beaulieu, V., Gao, J., Turner, G. and Markovits, J. 2010. Estrogen-related receptor gamma is a key regulator of muscle mitochondrial activity and oxidative capacity. *The Journal of Biological Chemistry* 285(29), pp. 22619–22629.
- Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y. 2007. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* 2(8), pp. 1896–1906.
- Remels, A.H.V., Langen, R.C.J., Schrauwen, P., Schaart, G., Schols, A.M.W.J. and Gosker, H.R. 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 315(1–2), pp. 113–120.
- Rooney, J.P., Ryde, I.T., Sanders, L.H., Howlett, E.H., Colton, M.D., Germ, K.E., Mayer, G.D., Greenamyre, J.T. and Meyer, J.N. 2015. PCR based determination of mitochondrial DNA copy number in multiple species. *Methods in Molecular Biology* 1241, pp. 23–38.
- Rowe, G.C., El-Khoury, R., Patten, I.S., Rustin, P. and Arany, Z. 2012. PGC-1 α is dispensable for exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Plos One* 7(7), p. e41817.
- Salmons, S. 2017. The adaptive response of skeletal muscle: What is the evidence? *Muscle & Nerve*.
- Scarpulla, R.C. 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews* 88(2), pp. 611–638.
- Scarpulla, R.C., Vega, R.B. and Kelly, D.P. 2012. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23(9), pp. 459–466.
- Schreiber, S.N., Emter, R., Hock, M.B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E.J. and Kralli, A. 2004. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(17), pp. 6472–6477.

- Seth, A., Steel, J.H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M.K., Fritah, A., Mobberley, M., Ryder, T.A., Rowlerson, A., Scott, J., Poutanen, M., White, R. and Parker, M. 2007. The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metabolism* 6(3), pp. 236–245.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1), pp. 76–85.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R. and Spiegelman, B.M. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2), pp. 397–408.
- St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B. and Spiegelman, B.M. 2003. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278(29), pp. 26597–26603.
- Tang, H., Macpherson, P., Argetsinger, L.S., Cieslak, D., Suhr, S.T., Carter-Su, C. and Goldman, D. 2004. CaM kinase II-dependent phosphorylation of myogenin contributes to activity-dependent suppression of nAChR gene expression in developing rat myotubes. *Cellular Signalling* 16(5), pp. 551–563.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. and Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* 28(5), pp. 511–515.
- Tumova, J., Andel, M. and Trnka, J. 2015. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*.
- Vafai, S.B. and Mootha, V.K. 2012. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491(7424), pp. 374–383.
- Vazquez, F., Lim, J.-H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M. and Puigserver, P. 2013. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* 23(3), pp. 287–301.
- Villén, J. and Gygi, S.P. 2008. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature Protocols* 3(10), pp. 1630–1638.
- Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., Schon, E.A., Lamperti, C. and Zeviani, M. 2011. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metabolism* 14(1), pp. 80–90.

- Wagatsuma, A. and Sakuma, K. 2013. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *The scientific world journal* 2013, p. 593267.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W. and Zhao, K. 2009. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138(5), pp. 1019–1031.
- Watson, P.J., Fairall, L. and Schwabe, J.W.R. 2012. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348(2), pp. 440–449.
- Webb, P., Anderson, C.M., Valentine, C., Nguyen, P., Marimuthu, A., West, B.L., Baxter, J.D. and Kushner, P.J. 2000. The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Molecular Endocrinology* 14(12), pp. 1976–1985.
- Weitzel, J.M. and Iwen, K.A. 2011. Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 342(1–2), pp. 1–7.
- Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M.A., Chui, P.C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M.P. and Corvera, S. 2004. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *The Journal of Clinical Investigation* 114(9), pp. 1281–1289.
- Wright, D.C., Geiger, P.C., Han, D.-H., Jones, T.E. and Holloszy, J.O. 2007. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry* 282(26), pp. 18793–18799.
- Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R. and Williams, R.S. 2002. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296(5566), pp. 349–352.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C. and Spiegelman, B.M. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98(1), pp. 115–124.
- Yamamoto, H., Williams, E.G., Mouchiroud, L., Cantó, C., Fan, W., Downes, M., Héligon, C., Barish, G.D., Desvergne, B., Evans, R.M., Schoonjans, K. and Auwerx, J. 2011. NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. *Cell* 147(4), pp. 827–839.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T. and Roeder, R.G. 2002. The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Molecular Cell* 9(3), pp. 611–623.

8. APÊNDICES

8.1 APÊNDICE A - Tabelas e figuras

8.1.1 Tabelas

Tabela 1. Lista de *primers* com as sequências *forward* e *reverse* usadas neste estudo.

Gene	Forward	Reverse
SOD 2	ACTGAAGTTCAATGGTGGGG	GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
CAT	GCAGATACCTGTGAAGTGTGTC	GTAGAATGTCCGCACCTGAG
GPX 1	CCTCAAGTACGTCCGACCTG	CAATGTCGTTGCGGCACACC
PGC-1α	TGAACGCACCTTAAGTGTGGAA	GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATGA
GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCTTA	GCCCCACGGCCATCACGCCA
ATP5 a	CTGTACTGCATCTACGTCGC	TTGTCGGGTTCCAAGTTCAG
COX 5a	TGTTGGCTATGATCTGGTTCC	TTATGAGGTCCTGCTTTGTCC
CS	GTGTCAGATGAGAAGTTACGAGAC	TCCTTAGGCAGATGTTTCAG
CYC	AGGCAAGCATAAGACTGGAC	ACTCCATCAGGGTATCCTCTC
NRF1	TGCCCAAGTGAATTACTCTGC	TCGTCTGGATGGTCATTTTAC
PDK4	GGATTACTGACCGCCTCTTTAG	GTAACCAAAACCAGCCAAAGG
PGC1α	CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT	CACACTTAAGGTTGCTCAAAAGT
PGC1β	TCCTGTAAAAGCCCGGAGTAT	GCTCTGGTAGGGGCAGTGA
UCP3	ATGAGTTTTGCCTCCATTGCG	GGCGTATCATGGCTTGAAAT

Tabela 2. Lista de fatores de transcrição enriquecidos durante a miogênese utilizando dados de RNAseq. Dados analisados pelo *software* oPOSSUM 3.1.

TF	JASPAR ID	Class	Family	Target gene hits	Z-score	Fisher score
Pax4	MA0068.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	3	17.282	4.593
NFYA	MA0060.1	Other Alpha-Helix	NFY CCAAT-binding	49	12.302	7.853
Esrrb	MA0141.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	86	12.259	11.78
Nkx3-2	MA0122.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	121	10.357	19.589
Tcfcp2l1	MA0145.1	Other	CP2	83	9.965	9.806

Zfx	MA0146.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	71	9.404	8.528
PPARG	MA0066.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	2	9.047	2.825
RREB1	MA0073.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	16	8.13	5.044
RORA_1	MA0071.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	76	7.893	11.42
NR4A2	MA0160.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	110	7.725	14.536
Egr1	MA0162.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	48	7.226	7.18
ZNF354C	MA0130.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	124	6.858	13.949
PPARG::RXRA	MA0065.2	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	54	6.365	9.482
Ddit3::Cebpa	MA0019.1	Zipper-Type	Leucine Zipper	49	6.222	8.154
RORA_2	MA0072.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	33	5.859	6.801
NR1H2::RXRA	MA0115.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	2	5.477	2.148
Sox2	MA0143.1	Other Alpha-Helix	High Mobility Group	21	5.315	3.237
CREB1	MA0018.2	Zipper-Type	Leucine Zipper	70	5.128	6.668
Pax5	MA0014.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	10	4.942	2.139
INSM1	MA0155.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	53	4.879	5.268
Ar	MA0007.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	6	4.786	2.742
MEF2A	MA0052.1	Other Alpha-Helix	MADS	60	4.737	10.662
SP1	MA0079.2	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	90	4.652	9.52
Pax6	MA0069.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	13	4.651	4.488
MIZF	MA0131.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	19	4.646	4.386
NR2F1	MA0017.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	31	4.477	4.056
SRF	MA0083.1	Other Alpha-Helix	MADS	10	4.45	3.976
Myb	MA0100.1	Helix-Turn-Helix	Myb	100	4.079	10.043
CTCF	MA0139.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	25	3.895	4.456
NHLH1	MA0048.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	43	3.77	5.551
Klf4	MA0039.2	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	103	3.692	13.679
Spz1	MA0111.1	Other	Other	47	3.556	2.626
NR3C1	MA0113.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	18	3.286	2.415
HIF1A::ARNT	MA0259.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	82	3.027	9.371
RXR::RARDR5	MA0159.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	13	2.844	3.512
MYC::MAX	MA0059.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	29	2.756	4.59

ESR2	MA0258.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	22	2.713	4.741
ZEB1	MA0103.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	120	2.659	11.169
YY1	MA0095.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	127	2.541	17.596
GABPA	MA0062.2	Winged Helix-Turn-Helix	Ets	76	2.354	11.977
NFE2L2	MA0150.1	Zipper-Type	Leucine Zipper	48	2.347	6.729
RUNX1	MA0002.2	Ig-fold	Runt	101	2.343	7.37
Myf	MA0055.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	74	2.138	6.277
Evi1	MA0029.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	15	1.94	2.749
AP1	MA0099.2	Zipper-Type	Leucine Zipper	117	1.867	10.304
E2F1	MA0024.1	Winged Helix-Turn-Helix	E2F	58	1.849	6.034
Zfp423	MA0116.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	41	1.53	3.88
Tal1::Gata1	MA0140.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	45	1.527	3.149
TAL1::TCF3	MA0091.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	49	1.499	2.694
EBF1	MA0154.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	83	1.497	6.932
HNF4A	MA0114.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	50	1.391	4.749
Gfi	MA0038.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	103	1.121	10.197
NFKB1	MA0105.1	Ig-fold	Rel	25	1.044	2.772
SPI1	MA0080.2	Winged Helix-Turn-Helix	Ets	117	0.848	13.922
TEAD1	MA0090.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	35	0.8	2.212
SOX9	MA0077.1	Other Alpha-Helix	High Mobility Group	93	0.505	9.713
znf143	MA0088.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	11	0.443	2.154

Tabela 3. Lista de fatores de transcrição enriquecidos durante a miogênese utilizando dados de proteômica. Dados analisados pelo *software* oPOSSUM 3.1.

TF	JASPAR ID	Class	Family	Target gene hits	Z-score	Fisher score
IRF2	MA0051.1	Winged Helix-Turn-Helix	IRF	9	8.514	4.781
Spz1	MA0111.1	Other	Other	47	8.064	5.659
znf143	MA0088.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	11	7.834	3.039
Evi1	MA0029.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	14	7.062	3.264

Pou5f1	MA0142.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	21	6.395	3.318
ESR1	MA0112.2	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	4	6.293	2.72
RXR::RAR_ DR5	MA0159.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	13	5.737	4.726
RORA_1	MA0071.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	59	5.286	6.075
Esrrb	MA0141.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	63	5.115	3.922
INSM1	MA0155.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	43	4.62	3.633
PPARG::RX RA	MA0065.2	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	40	4.591	4.516
CREB1	MA0018.2	Zipper-Type	Leucine Zipper	62	4.401	7.338
TLX1::NFIC	MA0119.1	Helix-Turn-Helix::Other	Homeo::Nuclear Factor I-CCAAT-binding	9	3.906	3.243
PPARG	MA0066.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	1	3.744	1.262
Gata1	MA0035.2	Zinc-coordinating	GATA	92	3.691	8.555
FOXF2	MA0030.1	Winged Helix-Turn-Helix	Forkhead	26	3.035	3.241
MZF1_5-13	MA0057.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	86	3.004	9.566
NFE2L2	MA0150.1	Zipper-Type	Leucine Zipper	38	2.707	4.291
Nkx3-2	MA0122.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	100	2.503	13.007
HNF4A	MA0114.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	40	2.468	3.049
Tal1::Gata1	MA0140.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	40	2.289	3.569
USF1	MA0093.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	65	2.067	8.719
SPIB	MA0081.1	Winged Helix-Turn-Helix	Ets	105	1.874	10.776
TEAD1	MA0090.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	35	1.826	4.35
Pax5	MA0014.1	Helix-Turn-Helix	Homeo	7	1.738	1.146
NR1H2::RXR A	MA0115.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	1	1.63	0.936
MAX	MA0058.1	Zipper-Type	Helix-Loop-Helix	55	1.499	7.004
GABPA	MA0062.2	Winged Helix-Turn-Helix	Ets	50	1.187	2.261
Nr2e3	MA0164.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	40	1.147	2.651
Egr1	MA0162.1	Zinc-coordinating	BetaBetaAlpha-zinc finger	34	0.95	2.707
NR4A2	MA0160.1	Zinc-coordinating	Hormone-nuclear Receptor	86	0.893	6.242
SRF	MA0083.1	Other Alpha-Helix	MADS	6	0.705	1.587
ELK4	MA0076.1	Winged Helix-Turn-Helix	Ets	33	0.633	1.749
RELA	MA0107.1	Ig-fold	Rel	44	0.437	4.371

SPI1	MA0080.2	Winged Helix-Turn-Helix	Ets	95	0.308	7.656
Foxa2	MA0047.2	Winged Helix-Turn-Helix	Forkhead	77	0.291	6.939

Tabela 4. Lista de vias enriquecidas (KEGG) da sobreposição de proteínas positivamente reguladas em miotubos com alvos de PPAR. Resultados de proteínas referentes à análise proteômica por espectrometria de massas.

Category	Term	Count	%	PValue
KEGG_PATHWAY	Huntington's disease	9	16.36	5.05E-06
KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of antibiotics	9	16.36	8.97E-06
KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	19	34.55	1.46E-05
KEGG_PATHWAY	Citrate cycle (TCA cycle)	5	9.09	1.81E-05
KEGG_PATHWAY	Carbon metabolism	7	12.73	2.20E-05
KEGG_PATHWAY	Alzheimer's disease	8	14.55	2.45E-05
KEGG_PATHWAY	Parkinson's disease	7	12.73	9.01E-05
KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation	6	10.91	6.20E-04
KEGG_PATHWAY	Peroxisome	5	9.09	7.67E-04
KEGG_PATHWAY	Fatty acid degradation	3	5.45	0.025189
KEGG_PATHWAY	Fatty acid metabolism	3	5.45	0.027137
KEGG_PATHWAY	Valine, leucine and isoleucine degradation	3	5.45	0.031211
KEGG_PATHWAY	Central carbon metabolism in cancer	3	5.45	0.041190
KEGG_PATHWAY	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	4	7.27	0.044235
KEGG_PATHWAY	Cardiac muscle contraction	3	5.45	0.057397
KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	3	5.45	0.061409
KEGG_PATHWAY	2-Oxocarboxylic acid metabolism	2	3.64	0.091845
KEGG_PATHWAY	HIF-1 signaling pathway	3	5.45	0.096602

Tabela 5. Lista de vias enriquecidas (KEGG) da sobreposição de genes positivamente regulados em miotubos com alvos de PPAR. Resultados referentes à análise transcriptômica por RNAseq.

Category	Term	Count	%	PValue
KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	10	5.9	2.32E-07
KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5	2.9	2.17E-04
KEGG_PATHWAY	Carbon metabolism	8	4.7	3.13E-04
KEGG_PATHWAY	Citrate cycle (TCA cycle)	5	2.9	4.25E-04
KEGG_PATHWAY	AMPK signaling pathway	8	4.7	5.42E-04
KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	28	16.5	5.75E-04
KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of antibiotics	10	5.9	6.43E-04
KEGG_PATHWAY	Pyruvate metabolism	5	2.9	9.16E-04
KEGG_PATHWAY	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	6	3.5	0.001896
KEGG_PATHWAY	Dilated cardiomyopathy	6	3.5	0.002359
KEGG_PATHWAY	Fatty acid metabolism	5	2.9	0.002512
KEGG_PATHWAY	Propanoate metabolism	4	2.4	0.003326
KEGG_PATHWAY	Peroxisome	5	2.9	0.014077
KEGG_PATHWAY	Valine, leucine and isoleucine degradation	4	2.4	0.023808
KEGG_PATHWAY	HIF-1 signaling pathway	5	2.9	0.029518
KEGG_PATHWAY	Fatty acid elongation	3	1.8	0.034250
KEGG_PATHWAY	Glycolysis / Gluconeogenesis	4	2.4	0.038041
KEGG_PATHWAY	Adherens junction	4	2.4	0.047274
KEGG_PATHWAY	Cardiac muscle contraction	4	2.4	0.055734
KEGG_PATHWAY	FoxO signaling pathway	5	2.9	0.064187
KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation	5	2.9	0.071419
KEGG_PATHWAY	Insulin signaling pathway	5	2.9	0.072914

Figura. 1 Clonagem de sítios de restrição para BamHI nas extremidades do gene PGC-1 α . (A) Mapa simplificado do plasmídeo pEGFP-PGC1 α fornecido pela addgene. (B) Mapa completo do plasmídeo pEGFP-PGC-1 α feito com o software snapgene. (C) Sítios de restrição de clonagem no polylinker do plasmídeo. (D) Verificação do plasmídeo por mapa de restrição. Digestão com BamHI e Bgl II e visualização com eletroforese em gel de agarose 1%. (E) Oligos contendo sítios de restrição para BamHI. (G) Esquema de clonagem do sítio de restrição BamHI no plasmídeo pEGFP-PGC-1 α (F). Plasmídeo clonado pEGFP-PGC-1 α .

Figura. 2 Clonagem do gene **PGC-1 α** no vetor lentiviral **pBABEpuro**. (A) Mapa completo do plasmídeo pBABEpuro feito com o software snapgene. (B) Esquema de clonagem do PGC-1 α no vetor pBABE e verificação da digestão do PGC-1 α e pBABE com BamHI por eletroforese em gel de agarose. (C) Visualização dos sítios de restrição BamHI, Sall e EcoRI no vetor clonado e os respectivos tamanhos de fragmento clivado. (D) *Screening* de clones positivos para o inserto por PCR de colônia. (E) *Screening* de clones positivos para o inserto por mapa de restrição com a enzima BamHI. (E) *Screening* de clones positivos para orientação do inserto por mapa de restrição com a enzima EcoRI. (F e G) Conformação de clones positivos por mapa de restrição e PCR. (H) Plasmídeo clonado pBABE-PGC-1 α .

Figura 3. Determinação da concentração mínima de puromicina para seleção de células C2C12 (Curva de morte de Puromicina). (A) Tabela de curva de morte de células C2C12 por concentração de puromicina. Foram utilizadas as concentrações de 0, 0.5, 1, 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina por 5 dias seguidos. (B) Imagens das células incubadas por 96 horas com as respectivas concentrações de puromicina.

Figura 4. Análise *in silico* de enriquecimento de receptores nucleares durante a miogênese. Genes positivamente expressos durante a miogênese foram triados para componentes celulares através da análise de ontologia de genes (DAVID). Todos os genes associados a componentes mitocondriais foram usados para a análise de sítios conservados para fatores de transcrição em promotores (2 kb) (oPOSSUM 3.1). Os receptores nucleares foram selecionados e ordenados através de *Z-score*.

Figura 5. Análise proteômica em frações subcelulares de mioblastos e miotubos. (A) *Heat map* de proteínas diferencialmente expressas em mioblastos e miotubos (n=4). (B) Níveis proteicos

de laminina e α -tubulina em frações nucleares e citosólicas (n=2). (C) Diagrama de Venn das proteínas identificadas por espectrometria de massas nas frações nucleares e citosólicas (n=4). (D e E) Enriquecimento de vias de ontologia de genes para componentes celulares (GO term CC) em frações nucleares e citosólicas (n=4).

A

B

E

Figura 3. Palmitato induz disfunção mitocondrial, produção de ROS e morte celular em células musculares. (A) Análise de necrose celular através da avaliação da fluorescência da sonda Iodeto de Propídeo (PI) em células tratadas com concentrações crescentes de palmitato por 24h. Imagens foram adquiridas através de microscopia de fluorescência (Floyd, Invitrogen) e a quantificação foi realizada usando um leitor de placa com emissão de 530 e excitação de 630 nm (SpectraMax M3, Molecular devices) (n=6). (B) Quantificação dos níveis de superóxido mitocondrial, citosólico e H₂O₂ utilizando as sondas mitotracker, DHE e amplex red, respectivamente, em células aderidas tratadas com palmitato (n=6). (C) Níveis proteicos de Chop, caspase clivada e β-actina em células musculares tratadas com 500 μM de palmitato foram avaliados por western blotting. (D e E) Consumo de oxigênio acoplado a fosforilação oxidativa e níveis de *proton leak* mitocondrial em células musculares tratadas com palmitato (n=4). (F) Níveis de NAD⁺, NADH e razão NADH/NAD⁺ em células tratadas com 500 μM de palmitato (n=6). Os dados são expressos como média ± SEM.

Figura 7. Caracterização da expressão estável de PGC-1 α em células C2C12. (A) Níveis de mRNA de PGC-1 α em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α (PGC-1 α) (n = 4). (B) Níveis proteicos de PGC-1 α , ATP-5 α , SDH β e β -actina em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α . (C) Consumo de oxigênio em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α (n = 4). (D) Respiração acoplada à fosforilação oxidativa em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α (n = 4). (E) Número de cópia de DNA mitocondrial em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α (n = 6). (F) Capacidade de reserva mitocondrial em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α (n = 4). (G) Níveis proteicos de SOD2, catalase (CAT), GPx1 e β -actina em linhagem controle (pBABE) ou com expressão de PGC-1 α . Os dados são expressos como média $\pm$ SEM.

Figura 8. Expressão de PGC-1 α protege células musculares contra morte celular e produção de ROS. (A) Imagens representativas de morte celular foram adquiridas através da marcação de DNA utilizando a sonda Iodeto de Propídeo (PI) em células pBABE (controle) e células PGC-1 α tratadas com BSA ou palmitato [500 μ M]. Para a marcação de núcleo foi utilizado a sonda DAPI. (B e C) Quantificação de fluorescência de PI através de análise de citometria de fluxo em células em células pBABE (controle) e células PGC-1 α tratadas com BSA ou palmitato [500 μ M]. (D) Imagens representativas da marcação de DHE em células pBABE (controle) e células PGC-1 α tratadas com BSA ou concentrações crescentes de palmitato. (E) Quantificação de ROS foi realizada usando as sondas DHE e mitosox em células pBABE (controle) e células PGC-1 α tratadas com BSA ou concentrações crescentes de palmitato (n = 5).

Figura 9. Silenciamento de NCoR1 protege células musculares contra morte celular em miotubos. (A) Imagens representativas de morte celular foram adquiridas através da marcação de DNA utilizando a sonda Iodeto de Propídeo (PI) em células pBABE (controle) e células PGC-1 α tratadas com BSA ou palmitato [500 μ M]. Para a marcação de núcleo foi utilizado a sonda DAPI.

Figura 10. Regulação dos níveis protéicos de NCoR1 pela via ubiquitina proteassoma. (A) Níveis proteicos de NCoR1 e β-actina em células musculares tratadas com DMSO ou com o inibidor de proteassoma, MG-132. (B) Níveis proteicos de NCoR1 e β-actina em células musculares transfectadas com pCDNA-GFP ou pCDNA-SiaH2 (E3 ubiquitina proteína ligase).

Figura 12. Silenciamento de NCoR1 induz fissão mitocondrial. (A) *Aspect ratio* e *form factor* de mitocôndrias marcadas com mitotracker ($n > 70$ mitocôndrias) em células MEF transfectadas com pCDNA ou pLKOshNCoR1. (B) Imagens de mitocôndria e núcleo marcadas respectivamente com as sondas mitotracker e DAPI foram adquiridas por microscopia confocal. (C) Análise de morfologia mitocondrial em células MEF transfectadas com pCDNA ou pLKOshNCoR1. Redução de *Form factor* e aumento no percentual de células com fragmentação mitocondrial em células MEF transfectadas com pLKOshNCoR1 sugerem indução de fissão mitocondrial (*form factor* < 2.5).

8.2 APÊNDICE B - Produção científica

8.2.1 Artigos publicados

1. Corrocher, F.A., Bueno de Paiva, L., Duarte, A.S.S., Ferro, K.P., Silveira, L.D.R., **de Lima, T.I.**, Olalla Saad, S.T. and Lazarini, M. 2017. Reduced expression of NR4A1 activates glycolytic pathway in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, pp. 1–4.
2. **Lima, T.I.**, Araujo, H.N., Menezes, E.S., Sponton, C.H., Araújo, M.B., Bomfim, L.H.M., Queiroz, A.L., Passos, M.A., E Sousa, T.A., Hirabara, S.M., Martins, A.R., Sampaio, H.C.L.B., Rodrigues, A., Curi, R., Carneiro, E.M., Boschero, A.C. and Silveira, L.R. 2017. Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle. *Journal of Cellular Physiology* 232(5), pp. 958–966.
3. Abreu, P., Vitzel, K.F., Monteiro, I.C.C.R., **Lima, T.I.**, Queiroz, A.N., Leal-Cardoso, J.H., Hirabara, S.M. and Ceccatto, V.M. 2016. Effects of endurance training on reduction of plasma glucose during high intensity constant and incremental speed tests in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 49(11), p. e5226.
4. **Lima, T.I.**, Monteiro, I.C., Valença, S., Leal-Cardoso, J.H., Fortunato, R.S., Carvalho, D.P., Teodoro, B.G. and Ceccatto, V.M. 2015. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. *Life Sciences* 128, pp. 64–71.
5. Teodoro, B.G., Baraldi, F.G., Sampaio, I.H., Bomfim, L.H.M., Queiroz, A.L., Passos, M.A., Carneiro, E.M., Alberici, L.C., Gomis, R., Amaral, F.G., Cipolla-Neto, J., Araújo, M.B., **Lima, T.**, Akira Uyemura, S., Silveira, L.R. and Vieira, E. 2014. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Journal of Pineal Research* 57(2), pp. 155–167.

8.2.2 Artigos submetidos

1. **Tanes I. Lima**; Valenca, Samuel; Carvalho, Denise; Sampaio, Igor; Monteiro, Igor; Fortunato, Rodrigo; Queiroz, Andre; Araujo, Michel; Bomfim, Lucas; Sponton, Carlos; Araujo, Hygor; Palameta, Soledad; Bajgelman, Marcio; Boschero, Antônio; Carneiro, Everardo ; Ceccatto, Vania; Silveira, Leonardo. Activation of AMPK/PGC-1 α axis stimulates mitochondrial antioxidant defense system and attenuates skeletal muscle cell death in metabolic stress. *Journal of Cellular Physiology*. 2017.
2. **Tanes I. Lima**, Leonardo dos Reis Silveira. A microplate assay for measuring propidium

iodide in C2C12 cells. *Biochemistry and Cell Biology*. 2018.

3. **Tanes I. Lima**, Rafael R. Valentim, Hygor N. Araújo, André G. Oliveira, Bianca C. Favero, Eveline S. Menezes, Rafaela Araújo, Leonardo R. Silveira. Role of NCoR1 in mitochondrial biogenesis. *Cell Biology International*. 2017.
4. Ricardo Freitas-Dias, Jose Maria Costa Junior, Luciana Gonçalves, **Tanes Lima**, Flavia de Paula, Gustavo Santos, Leonardo Silveira, Camila Oliveira, Antonio Boscherio, Claudio Zoppi, Everardo Carneiro. Offspring from endurance-trained fathers inherit improved mitochondrial function associated with PPAR co-repressor modulation. *Cell Reports*. 2017.
5. Madla A. Passos*, Lucas Henrique M. Bomfim*, **Tanes I. Lima**, Bruno G. Teodoro, Luciane C. Alberici, Norberto P. Lopes, Silvio R. Consonni, Licio A. Velloso, Hygor N. Araújo, Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boscherio, Isis C. Kettelhut, Rafael R. Valentim, Renato C.S. Branco, Marcio C. Bajgelman, Steffi Goffart, Claudio M. Costa Neto, Diego A. Duarte, Leonardo R. Silveira. Pyruvate carboxylase overexpression induces metabolic shift and improvement of mitochondrial function through increase on NAD⁺/NADH ratio. *BBA Molecular Cell Research*. 2017.
6. Priscila Slepicka, Andressa Oliveira, Talita Hanchuk, Edmarcia Souza, Leonardo Reis, **Tanes Lima**, Vanessa Cardoso, Valquiria Santos, Davi Mendes, Carlos Menck. Nek10 interactome and depletion reveal new mitochondrial functions. *BBA. Molecular Cell Research*. 2017.

8.2.3 Artigos em preparação

1. **Tanes I Lima**, Lucas Bonfim, Igor H. Sampaio, Hygor Araújo, Soledad Palameta, Ângela Saito, Rafael Rossi, Thais H. Tittanegro, André L. Queiroz, Michel B. Araújo, Carlos H. G. Sponton, José Xavier Neto, Ana Carolina M. Figueira, Valentina Perissi, Johan Auwerx, Marcio Chaim Bajgelman, Antonio C. Boscherio, Everardo Magalhães, and Leonardo Reis Silveira. The transcriptional coregulators PGC-1 α and NCoR1 are essential mediators of mitochondrial redox homeostasis in skeletal muscle cells. 2018.
2. **Tanes I Lima**, Lucas Bonfim, Hygor Araújo, Rafael Rossi, Carlos H. G. Sponton, Valentina Perissi, Johan Auwerx, Marcio Chaim Bajgelman, Antonio C. Boscherio, Everardo Magalhães, and Leonardo Reis Silveira. Network organization of mitochondrial function during skeletal muscle cell differentiation. 2018.
3. **Tanes I. Lima**, Bianca A. Pauletti, Rafael Rossi, Adriana F. Paes Leme, Leonardo R. Silveira. A subcellular fractionation method for mass-spectrometry based proteomics in skeletal muscle cells. *Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences*. TECHNICAL NOTE. 2018.