

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

"Importância do PGC1 α na diferenciação de células T reguladoras."

AMANDA RAVARA DE SOUZA

RIBEIRÃO PRETO

2022

AMANDA RAVARA DE SOUZA

Importância do PGC1 α na diferenciação de células T reguladoras.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Ribeirão Preto

2022

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.

Catálogo da Publicação

Souza, A. R.

Importância do PGC1 α na diferenciação de células T reguladoras.
50f.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

1. Células T reguladoras (Tregs). 2. Foxp3. 3. PGC1 α 4. Mitocôndria

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Dor associado ao Centro de Pesquisa de Doenças Inflamatórias (CRID), localizado no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP), com o apoio ou suporte financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do São Paulo (FAPESP) por meio do Projeto CEPID 2013/08216-2;
 - CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001
 - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP.
-

Nome: RAVARA, Amanda

Título: Importância do PGC1 α na diferenciação de células T reguladoras.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências;

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais,
que me apoiaram e tornaram tudo
possível.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram e fizeram parte dessa trajetória árdua, porém gloriosa. Foram dois anos de muitas trocas que marcaram minha história e hoje me fazem ser quem eu sou. Agradeço aos meus pais que possibilitaram e sempre incentivaram a minha jornada.

Agradeço ao Professor José Carlos Alves Farias Filho por ter me orientado nesse período. Sou imensamente grata por toda sabedoria compartilhada, pelas discussões científicas extremamente relevantes e por toda paciência e compreensão nos momentos de tormenta.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) por proporcionar todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Meu agradecimento às agências financiadoras: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Agradeço também à FAPESP (Projeto CEPID 2013/08216-2) e projeto individual (Processo 2018/23168-8) pelo fomento que possibilitou a realização desse projeto.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, a Sra. Ana Cristine, por toda sua disposição para ajudar. Agradeço também aos docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP pelos conhecimentos a mim repassados e contribuição para minha formação.

Agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa que ao longo desses anos me ensinaram, auxiliaram e me apoiaram em todos os experimentos e discussões. Agradeço também a todos os colegas do laboratório de Inflamação e Dor pelas convivências diárias, conversas e experiências. Agradeço aos técnicos de laboratório de Inflamação e Dor pelo apoio logístico ao longo desses anos.

RESUMO

RAVARA, Amanda. (2022). **Importância do PGC1 α na diferenciação de células T reguladoras**. Dissertação de Mestrado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As T reguladoras Foxp3⁺ (Treg) são células essenciais na modulação da resposta inflamatória crônica e na homeostase do sistema imunológico. O fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), é uma das citocinas responsáveis pela diferenciação das Tregs induzindo a expressão do fator de transcrição FOXP3, que é considerado o principal regulador dos genes associados a diferenciação e função destas células. O metabolismo das Tregs, está fortemente atrelado a fosforilação oxidativa alimentada por oxidação de ácidos graxos (OXPHOS) que promovem um aumento da capacidade respiratória destas células. Ainda relacionado a respiração celular, estudos anteriores observaram interação entre as Tregs e o Coativador gama 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC1 α), proteína codificada pelo gene PPARGC1A em humanos, que atua como fator de transcrição para diversos genes vinculados ao metabolismo e a biogênese mitocondrial. Neste contexto, foi mostrado que o fator de transcrição em questão está diretamente ligado ao desempenho da função da célula T reguladora, uma vez que a exclusão desse regulador metabólico gera inibição da resposta efetora de células Tregs. Por esse motivo, nós investigamos qual a importância do PGC1 α na diferenciação de células T reguladoras. Após o tratamento com TGF- β em animais knockout condicionais para PGC1 α em células Tregs, evidenciamos redução significativa da quantidade de células FOXP3⁺. Ao analisar as mitocôndrias desses animais, observamos alterações em sua quantidade e no potencial de membrana mitocondrial que foram severamente reduzidos. Estes resultados em conjunto mostram que a diferenciação das células Tregs depende de um balanço energético que vai controlar as necessidades das células a partir dos sinais de moléculas que as ativam.

Palavras-chave: PGC1 α . Linfócitos T Reguladores. EAE..

ABSTRACT

RAVARA, Amanda. (2022). *Importance of PGC1 α in the differentiation of regulatory T cells*. Master's Thesis Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) are essential cells in the modulation of the chronic inflammatory response and in the homeostasis of the immune system. The transforming growth factor beta (TGF- β) is one of the cytokines responsible for the differentiation of Tregs, inducing the expression of the transcription factor FOXP3, which is considered the main regulator of genes associated with the differentiation and function of these cells. The metabolism of Tregs is strongly linked to oxidative phosphorylation fueled by fatty acid oxidation (OXPHOS) that promote an increase in the respiratory capacity of these cells. Still related to cellular respiration, previous studies observed interaction between Tregs and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1-alpha coactivator (PGC1 α), a protein encoded by the PPARGC1A gene in humans, which acts as a transcription factor for several genes linked to the metabolism and mitochondrial biogenesis. In this context, it was shown that the transcription factor in question is directly linked to the performance of regulatory T cell function, since the exclusion of this metabolic regulator generates inhibition of the effector response of Treg cells. For this reason, we investigated the importance of PGC1 α in the differentiation of regulatory T cells. After treatment with TGF- β in conditional knockout animals for PGC1 α in Treg cells, we observed a significant reduction in the number of FOXP3⁺ cells. When analyzing the mitochondria of these animals, we observed changes in their quantity and in the mitochondrial membrane potential that were severely reduced. These results together show that the differentiation of Treg cells depends on an energy balance that will control the needs of cells from the signals of molecules that activate them.

Keywords: T regulatory cells (Tregs), Foxp3, PGC1 α , EAE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O metabolismo das células T reguladoras (Tregs) difere do das células T CD4+ pró-inflamatórias.....	
Figura 2. Cascatas de sinalização da biogênese mitocondrial.....	
Figura 3. Expressão de PGC1 α durante a diferenciação de células T reguladoras..	22
Figura 4. Ativação farmacológica de PGC1 α promove a diferenciação de células T reguladoras	24
Figura 5. A deleção específica de PGC1 α na célula TCD4 inibe a diferenciação de Tregs	27
Figura 6. Criação do animal knockout <i>Foxp3</i> ^{CRE/CRE} <i>PGC1α</i> ^{fl/fl} para o estudo da importância do PGC1 α nas Treg.....	30
Figura 7. Ausência de PGC1 α não altera a frequência de células Treg em condições de homeostasia.	32
Figura 8. Células Treg deficientes para PGC1 α apresentam menor produção de Foxp3.	35
Figura 9. Células deficientes para PGC1 α apresentam alterações nas estruturas mitocôndrias	37
Figura 10. Ativação farmacológica de PGC1 α não possui efeito em células knockouts	39
Figura 11. Células deficientes para PGC1 α apresentam alterações nas estruturas mitocôndrias	53
Figura 12. A deleção de PGC1 α nas células Tregs afetam a capacidade de regular processos inflamatórios.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. AS CÉLULAS T REGULADORAS.....	16
1.1.1. CÉLULAS T REGULADORAS PERIFÉRICAS (pTREG).....	17
1.1.2 CÉLULAS T REGULADORAS INDUZIDAS (iTREG).....	17
1.1.3. METABOLISMO DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	18
1.1.4. IMPORTÂNCIA DAS MITOCONDRIAS NAS TREGS.....	19
1.2. PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR COACTIVATOR-1 (PGC1- α).....	19
2.HIPÓTESE.....	22
3.OBJETIVOS.....	23
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1. ANIMAIS.....	25
5.2. FERRAMENTA FARMACOLÓGICA.....	25
5.3. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS T NAIVE E ITREGS.....	25.
5.4. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T EFETORAS E CÉLULAS T REGULADORAS IN VITRO.....	26
5.5. AVALIAÇÃO PROTEICA POR IMUNOBLOTTING.....	27
5.6. ELISA.....	27
5.7. CITOMETRIA DE FLUXO.....	27
5.8. MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL POR DSS.....	28.
5.9. MODELO DE ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL (EAE).....	28

5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1. EXPRESSÃO DE PGC1 α DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS.	31
6.2. ATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PGC1A PROMOVE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	32
6.3. A DELEÇÃO ESPECÍFICA DE PGC1A NA CÉLULA TCD4 INIBE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TREGS.....	33
6.4. CRIAÇÃO DO ANIMAL KNOCKOUT FOXP3 YFP-CRE PGC1 α PARA O ESTUDO DA IMPORTÂNCIA DO PGC1 α NAS TREGS.	34
6.5. AUSÊNCIA DE PGC1 α NÃO ALTERA A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS TREG EM CONDIÇÕES DE HOMEOSTASIA.....	34
6.6. AUSÊNCIA DE PGC1 α NÃO ALTERA A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SUPRESSORAS EM CONDIÇÕES DE HOMEOSTASIA.	35
6.7. CÉLULAS TREG DEFICIENTES PARA PGC1 α APRESENTAM MENOR PRODUÇÃO DE FOXP3.	37
6.8. ATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PGC1 α NÃO POSSUI EFEITO EM CÉLULAS KNOCKOUTS.	38
6.9. CÉLULAS DEFICIENTES PARA PGC1 α APRESENTAM ALTERAÇÕES NAS ESTRUTURAS MITOCONDRIAS.	38
6.10. A DELEÇÃO DE PGC1 α NAS CÉLULAS T REGULADORAS AFETAM A CAPACIDADE DE REGULAR PROCESSOS INFLAMATÓRIOS.....	39
7. DISCUSSÃO.....	41
8. CONCLUSÃO.....	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Kb: kilobases

Pb: pares de bases

kDa: kilodaltons

G: guanina

A: adenina

C: citosina

T: timina

N: qualquer base nitrogenada

°C: graus Celsius

cm²: centímetros quadrados

mL: mililitro

μl: microlitro

g: gravidade

μg: micrograma

V: volts

Ms: milissegundo

~: aproximadamente

ng: nanograma

5': extremidade cinco linha em ácidos nucleicos

3': extremidade três linha em ácidos nucleicos

X: vezes

mM: milimolar

μM: micromolar

U: unidade

aa: aminoácido

G: glicina

P: prolina

K: lisina

A: alanina

>: maior

<: menor

LISTA DE SIGLAS

Tregs: células T reguladoras

PGC1 α : Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1

APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*):

tTreg: células T reguladoras tímicas

TCR: Receptor de células T

MHC: Complexo de maior de histocompatibilidade

mTEC: células tímicas medulares

VAT: Tregs residentes do tecido adiposo visceral,

MHC-II: complexo principal de histocompatibilidade classe II

TGF- β Fator de crescimento transformante beta

ATP Adenosina trifosfato

ADP Adenosina difosfato

AMP Adenosina Monofosfato

DN: Duplo negativo

DP: Duplo positivo

SP: Simples Positivo

APC: Células apresentadoras de Antígenos

mTOR: mammalian target of rapamycin

GlcNac: N-acetilglucosamina

TME: Microambiente Tumoral

ECAR: Extracellular acidification rate

OCR: Oxygen consumption rate

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

CT: Controle

WT: Wildtype

KO: Knockout

IFN- γ : Interferon Gamma

CTV: Cell Trace Violet

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs)

O sistema imunológico é composto por diferentes tipos de células que possuem como função principal, proteger o organismo contra antígenos nocivos invasores. Dentre elas, estão os linfócitos T CD4 que compõe a imunidade adaptativa e atuam secretando citocinas, além de viabilizar e desenvolver a resposta de outras células (Bonilla e Oettgen, 2010). No entanto, ao mesmo tempo em que o sistema imune precisa gerar uma resposta efetiva e específica contra essas ameaças, ele precisa evitar que ocorra uma exacerbação das respostas inflamatórias que possam ser prejudiciais ao hospedeiro (Schwartz, 2012).

Nesse contexto, um subtipo de células T, conhecido como células T reguladoras (Tregs), possuem o importante papel de manter a homeostase do sistema imune adaptativo e a auto tolerância (Sakaguchi, 2000). Um dos fatores que possibilitam esse subtipo de células controlar a inflamação, é alta expressão de CD39/CD73, que reduzem a ativação de células T por converterem ATP em adenosina, diminuindo a energia celular (Bopp *et al.*, 2007). Além disso, estudos anteriores já descreveram que além de serem responsáveis pela prevenção da auto imunidade, essa subpopulação de linfócitos T é importante na imunidade tumoral, inflamação, hipersensibilidades, infecções e transplantes (Hori e Sakaguchi, 2004).

As células T reguladoras, são resultado da diferenciação de células T naive, ou seja, células que ainda não foram ativadas e apresentaram respostas efetoras. Essa diferenciação é guiada pela expressão do fator de transcrição FOXP3 (Forkhead box P3), que também é responsável pela manutenção e função desta célula. (Magenau *et al.*, 2010). Sendo assim, o fenótipo desse subtipo celular é CD4+CD25+FOXP3 e dependendo do local, tecido ou citocina que interage, as Tregs podem se diferenciar em subclasses com características fenotípicas distintas que norteiam sua função.

As Tregs atuam em diversos tecidos e apresentam uma série de funções que incluem: competição pela citocina IL-2 com linfócitos T efetores, supressão através de moléculas como CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*); GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*) e PD-1 (*programmed death-1*) (Sakaguchi, 2004); secreção de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β , IL-10, IL-35) e morte mediada por granzima-B. (Nemazee, 2006; Sharma e Rudra, 2018). Além

disso, as Tregs apresentam alta expressão de CD39/CD73, moléculas que reduzem a ativação de células T por converterem ATP em adenosina, diminuindo a energia celular (Bopp *et al.*, 2007).

1.1.1. Células T reguladoras periféricas (pTreg)

As Tregs podem se desenvolver no timo (tTregs) durante o processo de maturação linfocitária, desempenhando papel fundamental na auto tolerancia. (Howie, D. *et al* 2017). Na periferia, o sistema imune conta com células T reguladoras periféricas (pTreg) que são capazes de controlar respostas exacerbadas contra antígenos não patogênicos, como por exemplo, bactérias comensais que habitam nosso intestino (Lee *et al.*, 2011). As pTregs se assemelham aos demais subtipos de linfócitos. O fator responsável pela estabilidade de Foxp3, bem como sua indução na periferia é o Fator de Crescimento Transformante ou TGF- β (Kanamori *et al.*, 2016).

A relevância do TGF- β na diferenciação das células pTregs foi comprovado no momento em que células T naive tratadas com essa citocina começaram expressar Foxp3 e diferenciam para um perfil regulatório (Chen *et al.*, 2003). As células T reguladoras periféricas, podem ser induzidas *in vivo* e *in vitro* com auxílio de estímulos associados à ativação do Receptor de células T (TCR) e citocinas, como TGF- β , que juntamente com IL-2, induzem a expressão da proteína Foxp3 em linfócitos ainda não ativados (Shevach, e. M , 2014). Estudos anteriores mostraram que animais deficientes para o receptor TGF- β RII, apresentaram uma redução significativa na quantidade de pTreg, mas a população de células T reguladoras tímicas não sofreram alteração (Marie *et al.*, 2005). Esses dados demonstram a influência do TGF- β na promoção de células Tregs na periferia.

1.1.2. Células T reguladoras Induzidas (iTreg)

A consolidação da importância do TGF- β na indução de pTregs, promoveu uma série de estudos sobre a geração de Tregs *in vitro*. No entanto, foi visto que para indução de Foxp3 em células T naive, era necessária uma combinação de estímulos além da presença de TGF- β , como a IL-2 (Interleucina 2), Anti-CD3 e Anti-CD28

responsáveis pela ativação do TCR(Davidson et al., 2007). A partir dessa nova descoberta, estudiosos passaram a investigar mais profundamente sobre os mecanismos regulatórios chave para as funções efetoras e metabolismo dessas células.

1.1.3. Metabolismo das células T reguladoras.

Desde sua origem, a partir de células progenitoras da medula óssea (Koch e Radtke, 2011), ao processo de maturação, expansão clonal e finalmente, adesão de funções efetoras, as células T passam por diferentes estados de ativação que dependem de uma reprogramação metabólica que atenda suas demandas funcionais (Shyer et al., 2020). Antes de ser ativada por algum antígeno, as células se mantêm em estado quiescente e sem nenhuma função efetora ativa (Windt & Pearce, 2012). Nesse contexto, as células captam pouca glicose e aminoácidos, ao mesmo tempo em que dependem de um mínimo nível de fosforilação oxidativa para manter os níveis de ATP estáveis (Salmond, 2018).

Após a ativação de células TCD4 por antígenos, elas se diferenciam em subpopulações de células efetoras do tipo Th1, Th2 e Th17, de acordo com o perfil de citocinas presentes no microambiente em questão (Wang *et al.*, 2011)(Figura1). Essas células, são altamente glicolíticas, diferentemente das células T reguladoras que utilizam preferencialmente o metabolismo lipídico e a fosforilação oxidativa para suprir suas necessidades energéticas (Michalek et al., 2011).

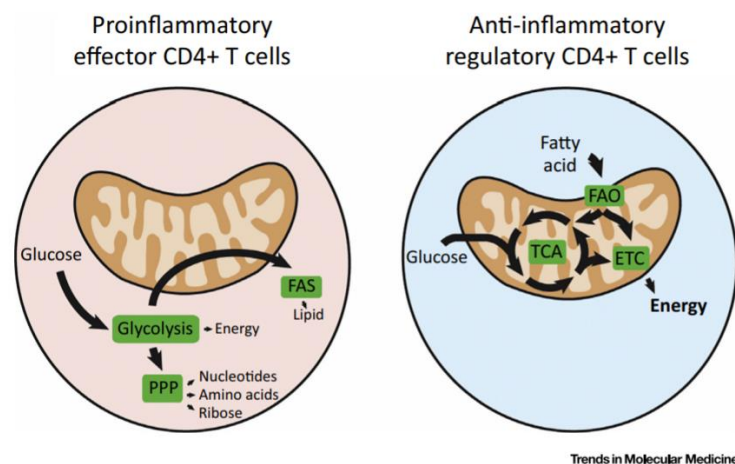


Figura 1. O metabolismo das células T reguladoras (Tregs) difere do das células T CD4+ pró-inflamatórias. (Brunet-Ratnasingham et al., 2019)

1.1.4. A Importância das Mitocôndrias nas células T reguladoras

Estudos descrevem o metabolismo glicolítico como a rápida produção de energia, capaz de dar suporte a resposta imune imediata. Enquanto isso, as mitocôndrias metabolizam lipídeos, aminoácidos e subprodutos da glicólise para gerar ATP de forma mais lenta e sustentável (Das et al., 2019). Esse sistema de obtenção de energia é visto principalmente em células T reguladoras devido a sua função imunossupressoras. Além do metabolismo mitocondrial garantir as funções efetoras das Tregs, ele também permite sua sobrevivência em ambientes ricos em lactato, comuns de várias patologias como câncer, distúrbios inflamatórios e doenças autoimunes (Angelin et al., 2017).

O metabolismo mitocondrial é dividido em duas fases, sendo a primeira a participação do ciclo de Krebs na matriz mitocondrial, cujos produtos são substratos para a segunda fase, denominada cadeia de transporte de elétrons (ETC). A ETC é uma série de quatro complexos ancorados na membrana mitocondrial interna que realizam a fosforilação oxidativa através de uma série de reações redox (Huang & Perl, 2018). Estudos anteriores relatam que o complexo mitocondrial III da ETC é crítico para a função supressora das Tregs (Weinberg et al., 2019).

1.2 Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 (PGC1- α)

O co-ativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 α), é uma proteína membro da família PGC-1, codificada pelo gene PPARGC1A em humanos (Lin J, Handschin C, Spiegelman BM 2005). Expressa majoritariamente no músculo esquelético, é induzida por situações de estresse como exercício físico, queda na temperatura corporal, presença de espécies oxidativas, entre outras (Nisoli E. 2003). Desempenha o papel de fator de transcrição, coativando fatores necessários no controle da biogênese mitocondrial, angiogênese e da troca do tipo de fibra muscular (Boström, et al 2012).

A biogênese mitocondrial se dá através da ativação do fator respiratório nuclear 1 (NRF1), fator respiratório nuclear 2 (NRF2) e receptor alfa relacionado ao estrogênio (ERR α), pelo PGC1 α . Juntos, os três fatores desencadeiam a expressão

complexa da cadeia de transporte de elétrons, a duplicação do DNA mitocondrial pela transcrição mitocondrial do fator A (TFAM) e, por fim, a ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Opichka M., et al 2019). Com isso, o PGC1 α é capaz de aumentar o número total de mitocôndrias, enzimas de eliminação de espécies reativas de oxigênio, componentes de fosforilação oxidativa, vias metabólicas mitocondriais, complexos de importação de proteínas, proteínas envolvidas na fissão e fusão e os níveis de sirtuinas mitocondriais (Dominy, J. E., & Puigserver, P. 2019). (Figura 2)

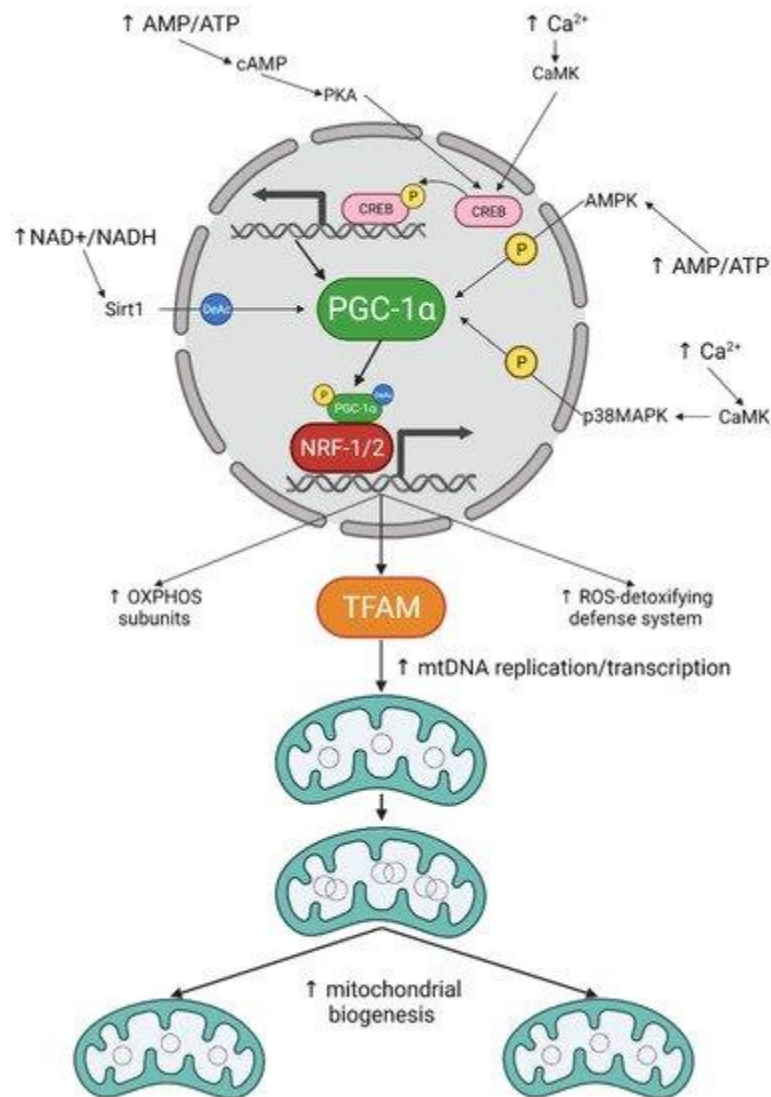


Figura 2. Cascatas de sinalização da biogênese mitocondrial. (Cardanho-Ramos & Morais, 2021)

Estudos anteriores mostraram que a biogênese mitocondrial mediada pelo PGC1 α também apresenta grande importância no tratamento de alguns tipos de câncer através da imunoterapia. Foi visto que a reprogramação retroviral de células específicas de tumor com PGC1 α , resultou em um aumento da imunidade antitumoral. Além disso, a biogênese mitocondrial foi suprimida em células onde a expressão de PGC1 α se encontrava inibida (Menk, A. et al 2018) Ainda no contexto do sistema imune, já foi descrito que o fator de transcrição em questão está diretamente ligado ao desempenho da função da célula T reguladora, uma vez que a exclusão desse regulador metabólico gera inibição da resposta efetora de células Tregs (Galgani, M., De Rosa, V., La Cava, A., Matarese, G. 2017) .

2. HIPÓTESE

Tendo em vista que o PGC1 α é uma proteína chave para a fosforilação oxidativa. e que esta, é essencial ao metabolismo e funções efetoras das células T reguladoras, nossa hipótese é que a supressão de PGC1a nas Tregs, regula negativamente a diferenciação, função e metabolismo mitocondrial destas células.

3. OBJETIVOS

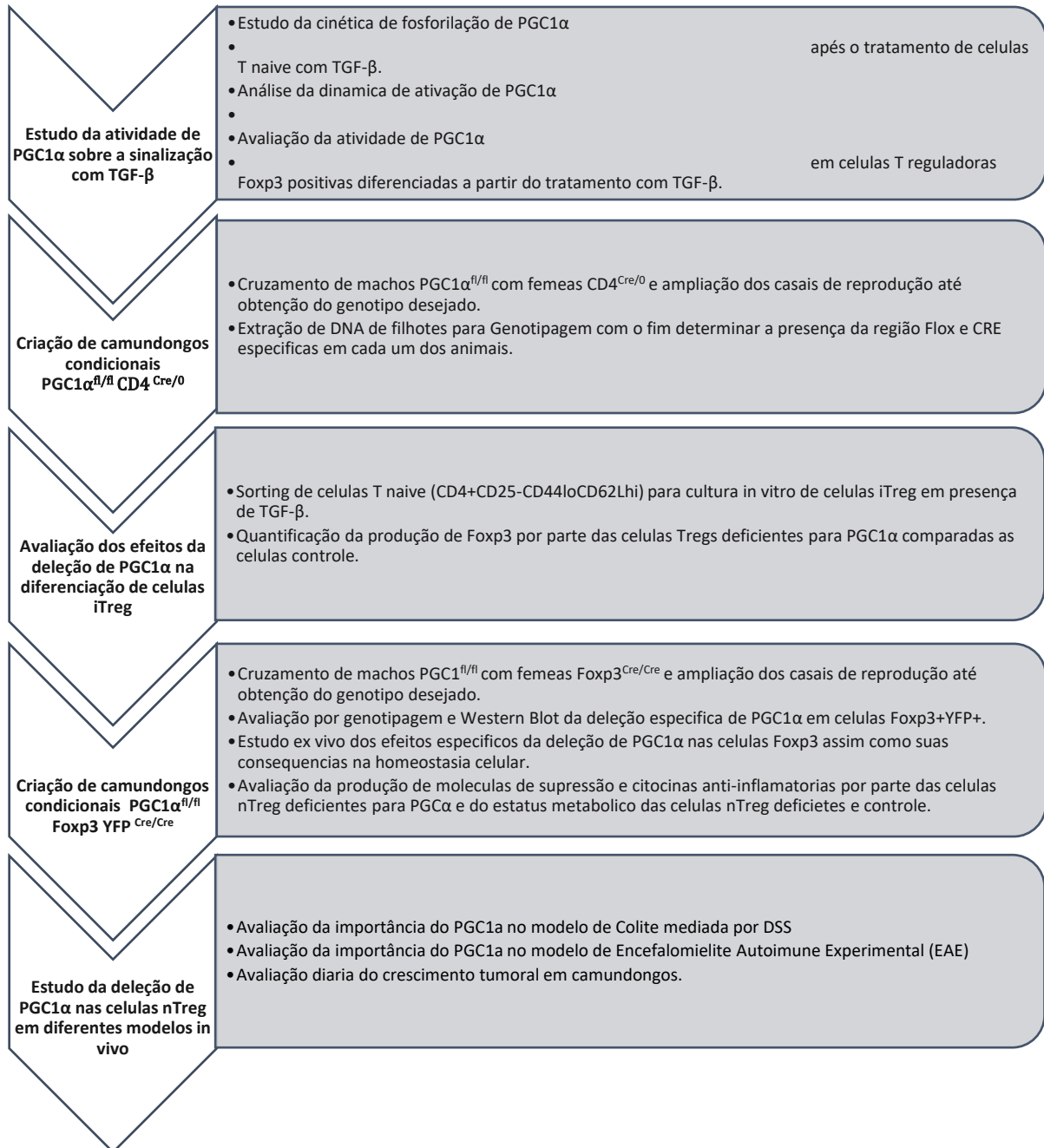
3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do co-ativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 α) na diferenciação de células T reguladoras.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analisar a atividade do PGC1 α durante a sinalização por TGF- β .
- Estudar qual é o efeito da ativação farmacológica de PGC1 α sobre a diferenciação de células Tregs com TGF- β .
- Determinar quais são os efeitos da deleção específica de PGC1 α nas células T CD4 sobre a diferenciação de células Treg com o TGF- β .
- Analisar o efeito do PGC1 α sob as estruturas mitocondriais das células Tregs in vitro.
- Avaliar o papel de PGC1 α nas células Tregs, no desenvolvimento de diferentes modelos in vivos.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Os animais foram utilizados no background C57BL/6J. Foram utilizados camundongos WT isogênicos da linhagem PGC1 α ^{fl/fl} (Machos), CD4^{Cre} (Fêmeas), Foxp3^{Cre} (Fêmeas) e Foxp3^{Cre-ER} com 6 semanas de idade, pesando entre 20-23 g, obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Centro de Criações de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRPUSP). Os animais foram cruzados para obtenção de camundongos PGC1 α /Foxp3^{Cre}, PGC1 α /CD4^{Cre} e PGC1 α /Foxp3^{Cre-ER}. Todos os experimentos foram realizados em ambos os sexos, porém pareados com seus *littermates*, na idade entre 6 e 14 semanas. Todos os animais para experimentação foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP sob condições de temperatura de 23-25°C, ciclo de claro/escuro de 12h, com aceso livre a água e ração. Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (certificado n° 028/2020).

5.2. Ferramenta Farmacológica

Foram usados o ativador alostérico de PGC1 α ZLN005 (TOCRIS) na concentração de 3 μ M para experimentos de cultura *in vitro*.

5.3. Separação de células T naive e iTregs

Após os camundongos serem eutanasiados, o baço e/ou os linfonodos foram retirados, e colocados em tubos de propietileno de 15 ml (Falcon®) contendo 1 ml de meio RPMI 1640 incompleto. A seguir, os órgãos foram divulssionados em peneira de propietileno (Falcon® - separador de células – 100 μ m) com auxílio do êmbolo da seringa de 5 ml (Plastipak®), formando uma única suspensão celular. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise e uma

nova centrifugação foi realizada. Subsequentemente, as células do baço foram ressuspensas em 3 ml, 1 ml e 2 ml de PBS contendo 2% de soro bovino fetal inativado, respectivamente. As células foram contadas em câmara de Neubauer.

Para isolamento de células T *naive* por *beads*. Após, a subpopulação de células T CD4⁺CD25⁻ do baço e linfonodos totais de camundongos C57/B6 hípidos foram separadas utilizando um kit comercial proveniente da Miltenyi Biotec (Auburn, CA) e seguindo o protocolo recomendado por o fabricante. Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com um coquetel de *beads* anti-CD4. Após 15 minutos de incubação, as células foram lavadas, 400 g por 10 minutos a 4-8 °C e a população CD4⁺ (maior que 90 % pureza) foi separada magneticamente por MACS® -*sorting* através da seleção positivas em colunas adequadas ao número de células. Posteriormente, as células foram marcadas com anti-CD4 Alexa 488 (BD, 1:200), anti-CD25 PE (BD, 1:200) e anti-CD62L APC (BD, 1:200) e suspensas em solução de 2% de soro bovino fetal mais 2mM de EDTA. As células T *naive* CD4⁺CD25⁻CD62L⁺ foram obtidas após FACS *sorting* (FACSAria, BD; XDP or MoFlo, Beckman Coulter).

5.4. Diferenciação de células T efetoras e células T reguladoras *in vitro*

Após o isolamento das células T *naive* (com pureza maior que 90%), estas foram submetidas à diferenciação de iTregs. Meio RPMI 1640 GlutaMAX (*Life Technologies*) foi utilizado para diferenciação das iTreg. Os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal inativado (Biochrom), 500 U penicilina/estreptomicina (PAA *laboratories*) e 50 Mm de β-mercaptoethanol (*Life Technologies*). Para diferenciação de células iTreg, célula T *naive* foram cultivadas em placas de fundo chato de 96 poços com *coating* de anti-CD3ε e anti-CD28 (10 µg mL⁻¹⁰). Para diferenciação de células iTregs, 1 × 10⁵ células T *naive* foram cultivadas em placas de fundo em U de 96 poços com *coating* de anti-CD3ε (5 µg mL⁻¹, clone 145- 2C11; Bio X Cell) e mais coquetel específico para diferenciação: anti-CD28 (1 µg mL⁻¹), rhTGF-β1 (concentrações variadas de acordo com os experimentos). Para ativação de células T CD4 (TH0) foram cultivadas de acordo com o protocolo para iTregs, porém na ausência TGF-β. Todas as culturas foram feitas em condições estéreis e diferenciação finalizadas após 96

horas a 37°C em estufa 5% de CO₂.

5.5. Avaliação proteica por Immunoblotting

O lisado das células foi preparado com tampão de lise (Pierce RIPA buffer, Thermo Scientific) com inibidor de protease (complete cocktail) e inibidor de fosfatase PhosSTOP, ambos da Roche Applied Science. As amostras foram quantificadas (kit de BCA, sigma) de acordo com as instruções do fabricante e de 20-40ug de proteínas foram utilizadas na eletroforese. Para separar as amostras por peso molecular foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e transferidas da membrana de nitrocelulose (Merck Millipore) e bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com leite 5%. Para a marcação foram utilizados os seguintes anticorpos diluídos em BSA 5%, Foxp3 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000), p70-S6 (Cell signaling, 1:1000), Anticorpos anti-mouse e anti-rabbit com peroxidase (Cell signaling) foram utilizados na concentração de 1:5000 diluídos em leite 5%/TBST. O sinal foi detectado com ECL prime (GE Healthcare) no Chemidoc imaging systems (Bio-Rad Laboratories).

5.6. ELISA

As quantificações de IL-10 (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) foi realizada no sobrenadante da cultura ao final da diferenciação de iTregs (96h). A quantificação desta citocinas foi realizada por método imunoenzimático (ELISA), conforme descrito pelo fabricante.

5.7. Citometria de Fluxo

Foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para antígenos murinos com fluorocromos para FACS das seguintes empresas e nas concentrações descritas: CD25 PE (PC61; 1:200), CD4 Alexa488 (GK1.5; 1:800), CD4 efluor450 (eBioscience, 1:200), CD4 BV510 (BD 1:200), Smad2 (ps465/467)/Smad3 (ps423/425) (BD 1:100), CD62L PE- Cy7 (MEL-14; 1:600), Foxp3 eFluor450 (FJK-16s; 1:400), Foxp3 APC (BD 1:200), Foxp3 PE (BD 1:200), Alexa-fluor 647 O-

GlcNac (RL2 Novus biologicals). As células mortas foram excluídas pela marcação com *LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain* (Life Technologies) e bloqueadas com *Fc-block* (CD16/32, 2.4G2) por 10 min no gelo. As células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão de FACS (0.25% BSA/2 mM EDTA em PBS) para marcação extracelular. Para marcação intracelular (IFN- γ , Foxp3), as células foram fixadas com 2% PFA em PBS por 20 min no gelo. Estas células foram lavadas com tampão de permeabilização (0.25% BSA/2 mM EDTA/0.5% saponin em PBS). Previamente, para marcação de citocinas intracelulares, as células foram estimuladas com PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich) and ionomicina (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich) por 2 h, seguido de Brefeldin A (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por mais 2 h. Para marcação de IFN γ e Foxp3 foi utilizado um kit de fixação/permeabilização (Affymetrix/eBioscience) e o procedimento foi de acordo com as instruções do fabricante. As células foram adquiridas nos seguintes aparelhos: CyAn ADP (Beckman Coulter), a LSR II (Becton Dickinson), FACSVerse (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FlowJo versão 10.0.

5.8. Modelo de Colite Experimental

A colite experimental induzida por DSS foi realizada através da administração de sulfato sódico de dextrana (DSS, de peso molecular: 36,000-50,000, obtido da ICN Biomedicals, Solon, OH, EUA) na água de beber. Os animais receberam DSS ad libitum por um período de seis dias, seguido por um período de seis dias recebendo apenas água filtrada.

5.9. Modelo de Encefalomielite Autoimune EAE

EAE foi induzido por imunização subcutânea com emulsão contendo 200 μg do antígeno peptídeo MOG35-55 (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) em CFA (adjuvante completo de Freund) suplementado com 5mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* em ambos os lados dos flancos traseiros. Foi injetado toxina pertussis (PTx) em uma dose de 200ng por animal (i.p), no dia da imunização e 48h depois. O escore clínico dos animais foi monitorado

diariamente utilizando-se escalas padronizadas: 0. Nenhum sinal clínico; 1. Cauda flácida; 2. Marcha cambaleante, déficit de equilíbrio 3. Paralisia parcial dos membros posteriores; 4. Paralisia completa dos membros posteriores; 5. Paralisia completa dos membros posteriores com fraqueza de membros anteriores ou moribundo.

5.10. Análises Estatísticas

Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (DP). Para determinar a diferença estatística entre os grupos de animais no experimento de colite foi utilizado o teste t de *Student* não-pareado. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey foi aplicado para amostras com distribuições normais. As análises foram realizadas através do programa GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de P igual ou menor a 0,05.

6.RESULTADOS

6.1. EXPRESSÃO DE PGC1 α DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS.

As funções efetoras das Células Tregs são viabilizadas principalmente pelos processos de fosforilação oxidativa e oxidação de ácidos graxos realizados por essa subpopulação de linfócitos. (Michalek et al., 2011). PGC1 α , por sua vez, tem se mostrado importante para a função celular devido seu papel chave na biogênese mitocondrial (Boström, et al 2012). Em vista disso, para entendermos qual a importância dessa proteína nas células T reguladoras, primeiramente, precisávamos avaliar sua expressão gênica na diferenciação das células em questão. Para esse fim, células T CD4⁺ CD25⁻ foram ativadas com anti-CD3/CD28 na presença de TGF- β ou não e avaliamos a expressão gênica de PGC1 α e FOXP3 em diferentes tempos de cultura (24h, 48h, 72h e 96h) (Figura 3A e B). Nesse primeiro experimento, foi possível observar por *qPCR* que o pico de expressão proteica de PGC1 α e FOXP3, ocorrem simultaneamente após 12hrs de incubação. Além disso, também verificamos o perfil de expressão de PGC1 α em nível proteico ao analisar células que foram coletadas para Western Blot. Três diferentes grupos foram avaliados, sendo o primeiro de células naíves que não receberam nenhum tipo de estímulo (Naive), o segundo grupo de células sofreram apenas o estímulo de anti-CD3/CD28 (Th0) e por último, células que foram estimuladas com anti-CD3/CD28 e estavam na presença de TGF- β (iTreg) (Figura 3C). Observamos que as células diferenciadas em T reguladoras, possui maior expressão de PGC1 α , quando comparadas com células naíves.

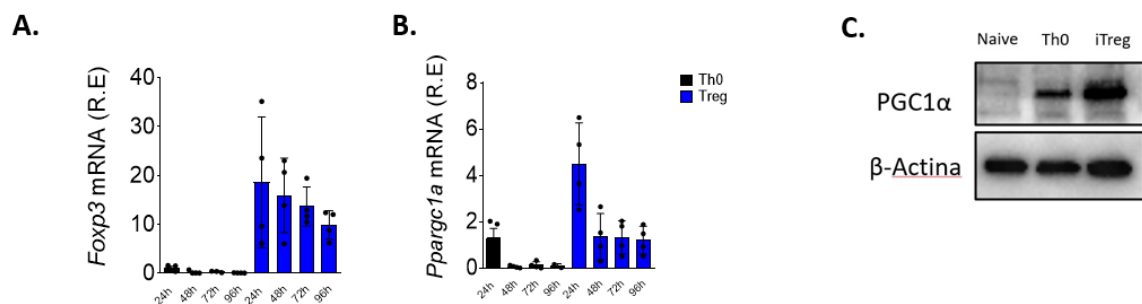


Figura 3. Expressão de PGC1 α durante a diferenciação de Células T reguladoras naive. A) Expressão gênica de FOXP3 na presença ou não de TGF- β . B) Expressão gênica de PGC1 α na presença ou não de TGF- β . C) Expressão proteica de PGC1 α em células estimuladas ou não.

6.2. ATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PGC1A PROMOVE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS.

A partir do resultado anterior, onde evidenciamos que o PGC1 α é importante na diferenciação de células Tregs nós resolvemos investigar qual seria o efeito de uma modulação farmacológica dessa proteína. Para isso, primeiramente, isolamos linfonodos de camundongos WT, sorteamos células TCD4⁺ CD25⁻ e fizemos cultura de células estimuladas com anti-CD3/CD28 e diferentes concentrações de TGF- β por 72hrs para padronizarmos a concentração ideal a ser utilizada nos experimentos ao decorrer do trabalho. (Figura 4A). A análise por citometria de fluxo mostrou que a concentração de 1.0ng/mL promoveu uma diferenciação satisfatória de Tregs e, portanto, foi fixada. Em seguida, fizemos outra cultura de células TCD4⁺ CD25⁻ estimuladas com anti-CD3/CD28 na presença de TGF- β e adicionamos a droga ZLN005 que atua como regulador transcricional de PGC1 α e promove um aumento em sua transcrição. O uso desse ativador favoreceu significativamente a diferenciação de células Tregs (Figura 4B). No entanto, não foi visto alteração na expressão de FOXP3 (Figura 4C).

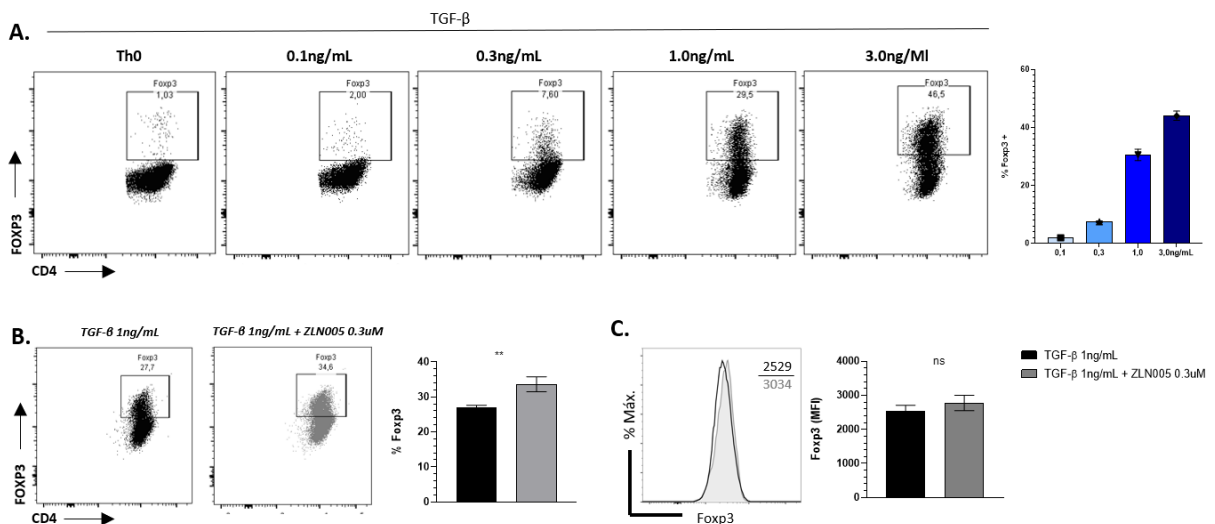


Figura 4. Ativação farmacológica de PGC1 α promove a diferenciação de células T reguladoras. A) Curva de concentração de TGF- β com quatro pontos em cultura de células. B) Diferenciação em células T reguladoras na presença do ativador de PGC1 α ZLN005. C) Expressão de FOXP3 na adição do ativador de PGC1 α ZLN005.

6.3. A DELEÇÃO ESPECÍFICA DE PGC1A NA CÉLULA TCD4 INIBE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TREGS.

Para estudar o efeito da ausência específica de PGC1 α na diferenciação das células T reguladoras, nós utilizamos camundongos deficientes para PGC1 α nas células T CD4. Para isto, usamos o sistema por recombinação CRE-LOX (Wurst & Kühn, 2009), onde camundongos machos que apresentam o exon 3 da região gênica da subunidade alpha de PGC1 α ($PGC1\alpha^{fl/fl}$) flanqueada por dois sítios Loxp (<https://www.jax.org/strain/009666>) foram cruzados com camundongos fêmeas que expressam a CRE recombinase sob o controle do promotor de CD4 (<https://www.jax.org/strain/017336>). Com isso, foi possível deletar condicionalmente PGC1 α nas células CD4. Assim, camundongos knockout $PGC1\alpha^{fl/fl}CD4^{CRE/-}$ (KO) e os controle $PGC1\alpha^{fl/fl}CD4^{-/-}$ (WT) foram usados nesse estudo (Figura 5A). A genotipagem dos animais foi realizada por PCR convencional e primers exclusivos para PGC1 α flox e CRE genérico (Figura 5B). Finalmente, quando realizada a cultura de células de animais controles e knockouts, na presença de TGF- β e estímulo de anti-CD3/CD28, vimos que a deleção de PGC1 α nas células TCD4 inibiu a diferenciação de células T reguladoras. (Figura 5C)

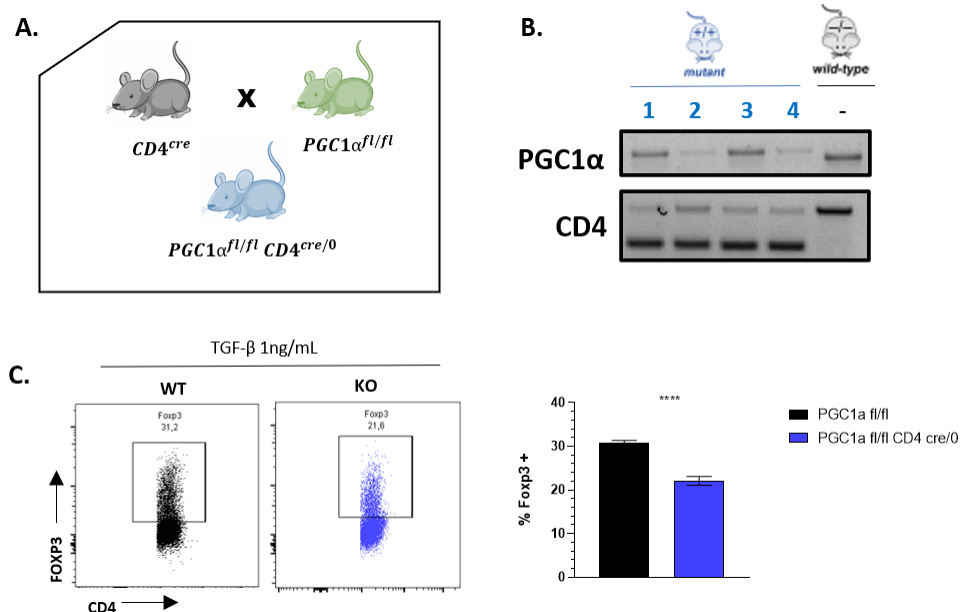


Figura 5. A deleção gênica de PGC1 α nas células T CD4 inibe a diferenciação de células T reguladoras. A) Modelo de construção do animal knockout através da recombinação CRE-LOX. B) Genotipagem de 5 animais para validação do cruzamento. C) Diferenciação em células T reguladoras em animais $PGC1\alpha^{fl/fl}CD4^{-/0}$ E $PGC1\alpha^{fl/fl}CD4^{CRE/-}$.

6.4. CRIAÇÃO DO ANIMAL KNOCKOUT *FOXP3 YFP-CRE PGC1 α* PARA O ESTUDO DA IMPORTÂNCIA DO *PGC1 α* NAS TREGS.

Posteriormente, aproveitando outras ferramentas genéticas que tínhamos, criamos um animal knockout, também através do sistema de recombinação CRE-LOX, para estudar diretamente o efeito da ausência de *PGC1 α* nas células *Foxp3* positivas. Para isso, cruzamos camundongos fêmeas *Foxp3 – YFP^{CRE/CRE}* com machos *PGC1 α ^{fl/fl}*, gerando animais *Foxp3^{CRE/CRE} PGC1 α ^{fl/fl}* (KO)(Figura 6A). O genótipo foi confirmado por PCR convencional. (Figura 6B).

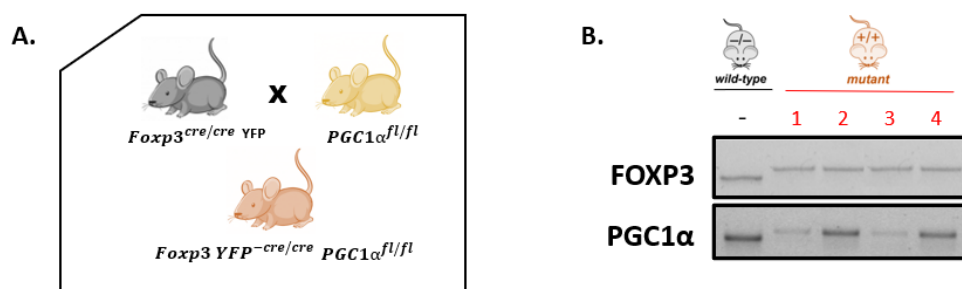


Figura 6. Criação do animal knockout *Foxp3^{CRE/CRE} PGC1 α ^{fl/fl}* para o estudo da importância do *PGC1 α* nas Tregs. **A).** Estratégia de cruzamento para geração de animais *Foxp3^{CRE/CRE} PGC1 α ^{fl/fl}*. **B).** Genotipagem de 5 animais por PCR convencional.

6.5. AUSÊNCIA DE *PGC1 α* NÃO ALTERA A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS TREG EM CONDIÇÕES DE HOMEOSTASIA.

A construção do animal knockout, nos possibilitou investigar qual o efeito da ausência específica de *PGC1 α* nas células T reguladoras. Primeiramente, avaliamos se existia alteração nas células *Foxp3* em homeostasia de camundongos controles *Foxp3^{CRE/y}* (WT) e knockouts *Foxp3^{CRE/CRE} PGC1 α ^{fl/fl}* (KO). Para isso, coletamos células de baço, linfonodos e timo, e analisamos a população natural Tregs (nTreg). Através da citometria de fluxo, observamos que a quantidade de células *Foxp3*⁺ nos diferentes órgãos não sofreram modificações com a deleção de *PGC1 α* (Figura 7A). Em seguida, investigamos a ativação dessas células e vimos que não houve diferença entre os grupos em relação ao percentual de células naives e células efectoras. (Figura 7B)

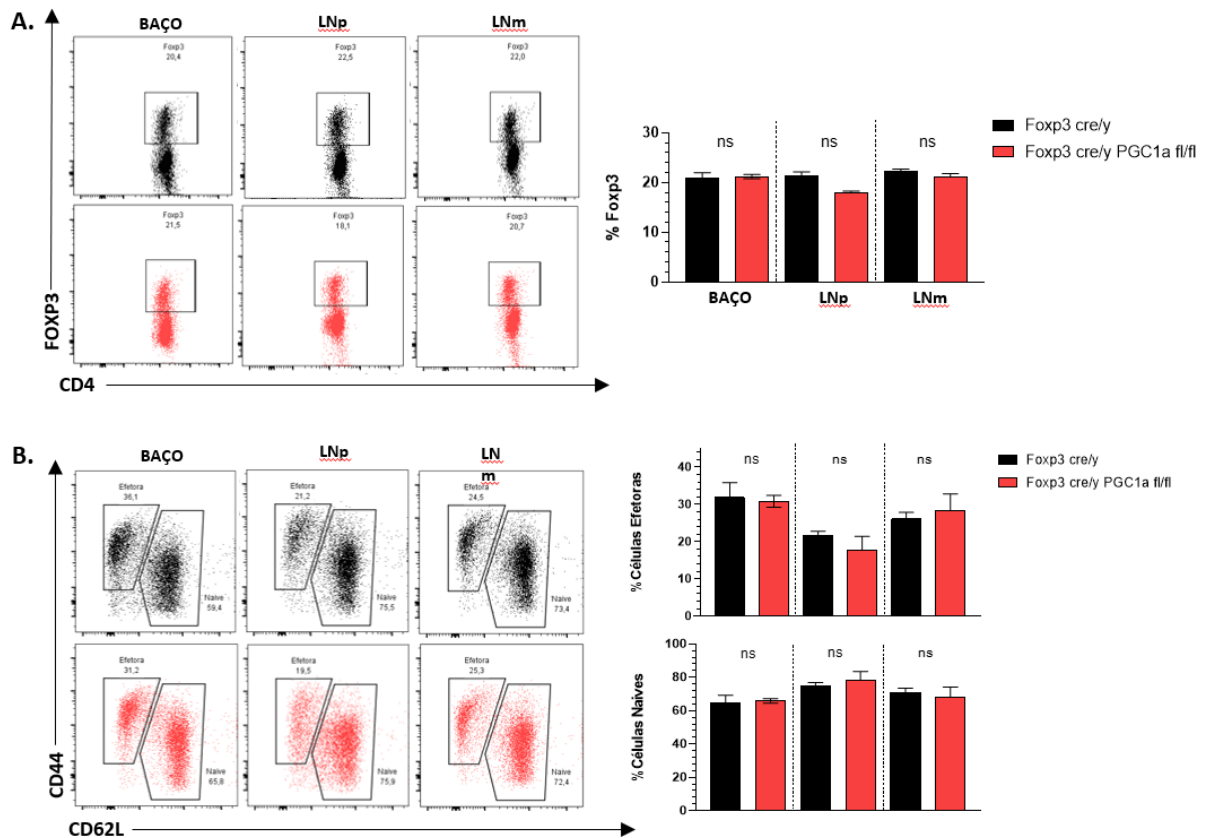


Figura 7. Ausência de PGC1 α não altera a frequência de células Treg em condições de homeostasia. A) Análise por citometria de fluxo de células Foxp3 isoladas de animais *Foxp3^{CRE/y} PGC1 α ^{fl/fl}* (vermelho) comparados a animais controle (preto). **B).** Análise por citometria de fluxo de marcadores específicos de células Foxp3+ naives e efetoras.

6.6. AUSÊNCIA DE PGC1 α NÃO ALTERA A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SUPRESSORAS EM CONDIÇÕES DE HOMEOSTASIA.

Em seguida, para ter certeza de que o PGC1 α não afetava as características funcionais das células T reguladoras, o próximo passo foi avaliar a expressão de diferentes marcadores de supressão em condição de homeostasia em órgãos distintos. A análise por citometria de fluxo não mostrou alteração nos marcadores de superfície GITR, CTLA4 e PD1. Nossos resultados demonstram que na ausência de PGC1 α as células Treg mantém preservada seu fenótipo regulador. (Figura 8)

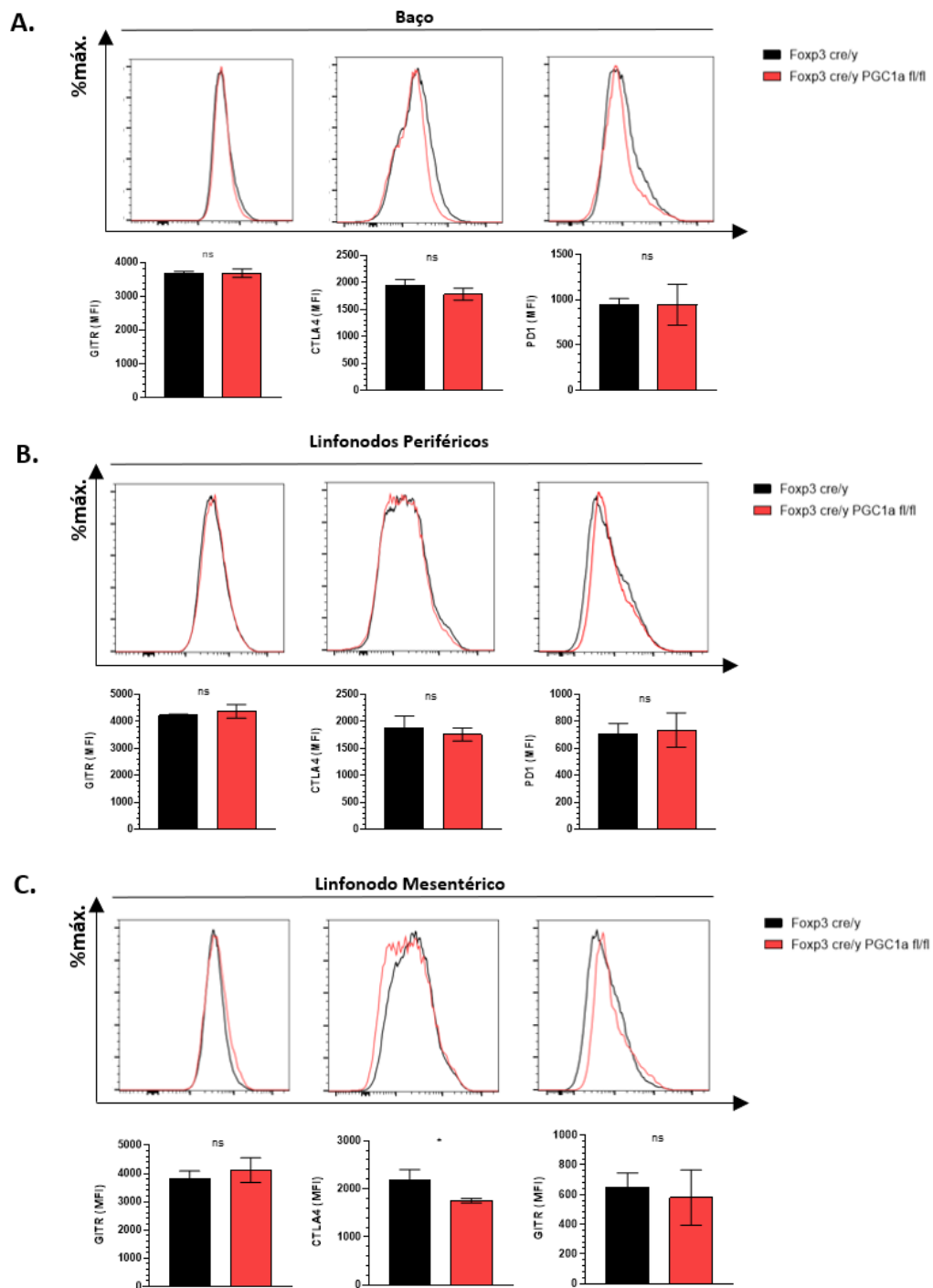


Figura 8. Ausência de PGC1 α não altera a produção de moléculas supressoras em condições de homeostasia. A) Análise por citometria de fluxo de marcadores de superfície de supressão de células F $oxp3$ isoladas do Baço de animais $Foxp3^{CRE/y}PGC1\alpha^{fl/fl}$ (vermelho) comparados a animais controle (preto). **B)** Análise por citometria de fluxo de marcadores de superfície de supressão de células F $oxp3$ isoladas de Linfonodos Periféricos. **C)** Análise por citometria de fluxo de marcadores de superfície de supressão de células F $oxp3$ isoladas do Linfonodo Mesentéricos de camundongos WT e KO.

6.7. CÉLULAS TREG DEFICIENTES PARA PGC1 α APRESENTAM MENOR PRODUÇÃO DE FOXP3.

Após a construção do animal knockout, decidimos investigar a diferenciação de células T reguladoras na ausência específica de PGC1 α em células TCD4+ CD25+. Para esse fim, fizemos uma cultura com células extraídas de linfonodos e baço de camundongos controle *Foxp3^{CRE/y}* (WT) e knockouts *Foxp3^{CRE/y}PGC1 α ^{fl/fl}* (KO). Os órgãos foram processados e células TCD4+ CD25- foram sorteadas por um citômetro de fluxo. Em seguida incubamos as células por 72hrs na presença de TGF- β em placas de 96poços com meio de cultura previamente estimulado. Corroborando com resultados anteriores, vimos diminuição significativa na quantidade de células T reguladoras de animais deficientes em PGC1 α (Figura 9A). Além disso, ao analisamos a intensidade de fluorescência mediana (MFI) de Foxp3 na população TCD4, evidenciamos na inibição considerável de sua expressão (Figura 9B).

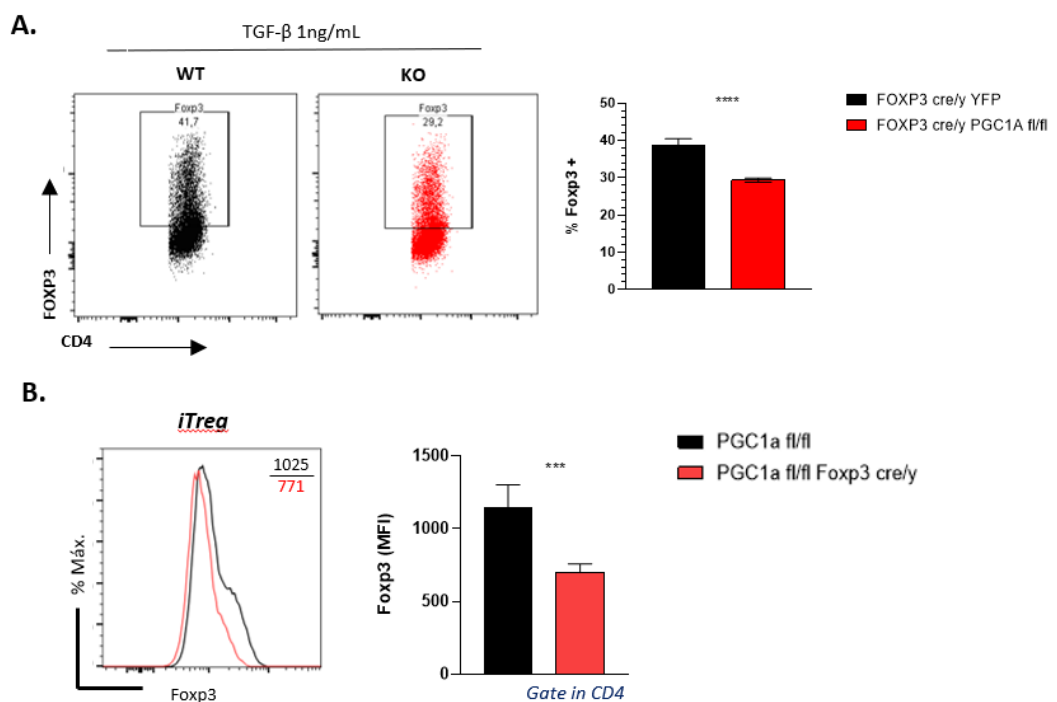


Figura 9. Células Treg deficientes para PGC1 α apresentam menor produção de Foxp3. **A)** Análise por citometria de fluxo de marcadores do percentual de células Foxp3 de animais *Foxp3^{CRE/y}PGC1 α ^{fl/fl}* (vermelho) comparados a animais controle (preto). **B)** Análise da intensidade de fluorescência mediana (MFI) de Foxp3.

6.8. ATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PGC1 α NÃO POSSUI EFEITO EM CÉLULAS KNOCKOUTS.

Anteriormente, nossos resultados mostraram que o uso do ativador de PGC1 α ZLN005, afetou negativamente a diferenciação de células Foxp3. Portanto, sabendo que algumas drogas apresentam atividades inespecíficas, aproveitamos a presença do animal knockout específico para avaliar a especificidade da droga escolhida. Corroborando com os resultados anteriores, observamos a diminuição no percentual de Foxp3 em animais controles *Foxp3*^{CRE/y} (WT). No entanto, a quantidade de Treg do animal *Foxp3*^{CRE/y}*PGC1 α* ^{fl/fl} (KO) permanece inalterada, provando que a ação do ativador é restrita ao PGC1 α . (Figura 10A).

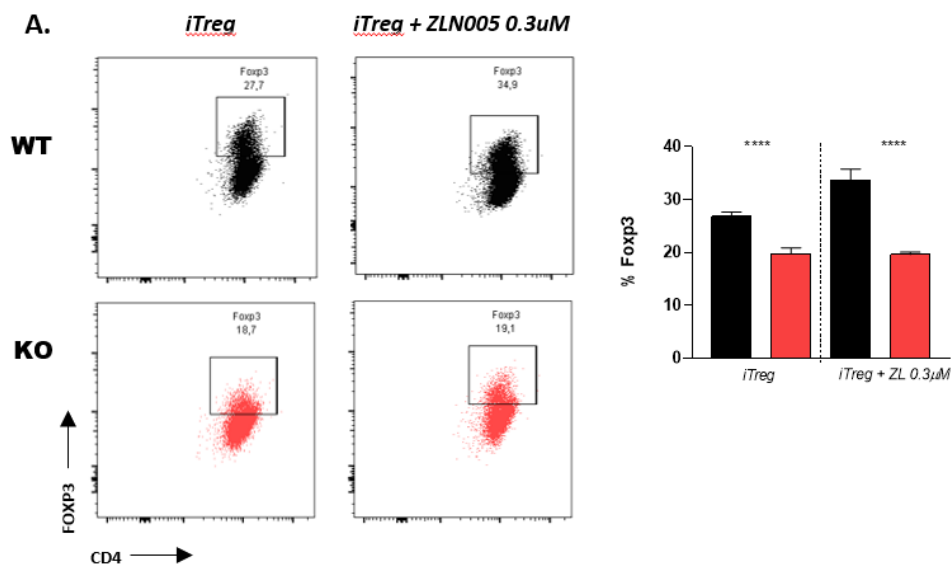


Figura 10. Ativação farmacológica de PGC1 α não possui efeito em células knockouts
A) Análise por citometria de fluxo do efeito de ZLN005 sobre a diferenciação de Foxp3 em animais knockouts (vermelho) comparados a animais controle (preto).

6.9. CÉLULAS DEFICIENTES PARA PGC1 α APRESENTAM ALTERAÇÕES NAS ESTRUTURAS MITOCONDRIAIS.

A literatura mostra a importância de PGC1 α na biogênese mitocondrial e na produção de fatores essenciais a função das mitocôndrias. Por esse motivo, decidimos avaliar como se encontra a estrutura mitocondrial de células Tregs na ausência de PGC1 α . Com esse fim, cultivamos por 72 horas células retiradas de

animais *Foxp3^{CRE/y}PGC1 α ^{fl/fl}* (KO) e animais *Foxp3^{CRE/y}* (WT) e posteriormente, transferimos para lâmina afim de realizar análise microscópica de Imunofluorescência dessas estruturas. Nós observamos que células Tregs deficientes para PGC1 α apresentam menor massa mitocondrial e potencial de membrana reduzido quando avaliados por MitoTracker Red CMXRos (Figura 11A). Células também foram coletadas para análise por citometria de fluxo. Vimos redução significativa na expressão de MitoTracker Red CMXRos, o que nos indica que a deleção de PGC1 α interfere negativamente na quantidade de mitocôndrias (Figura 11B).

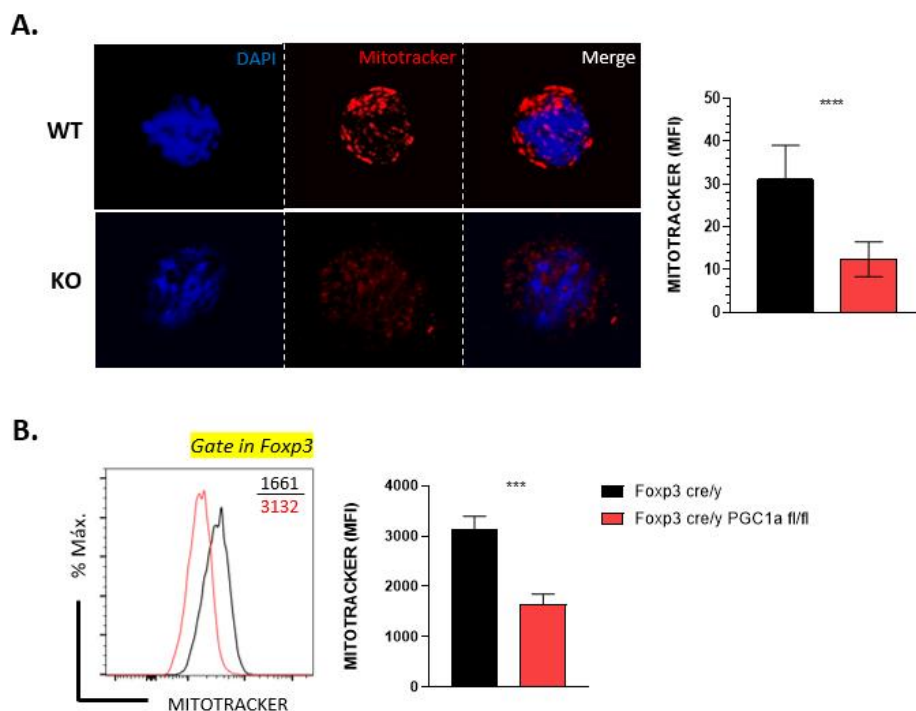


Figura 11. Células deficientes para PGC1 α apresentam alterações nas estruturas mitocondrias. A) Análise por citometria de fluxo do efeito de ZLN005 sobre a diferenciação de Foxp3 em animais knockouts (vermelho) comparados a animais controle (preto). **B)** Avaliação da expressão de MitoTracker Red CMXRos por citometria de fluxo.

6.10. A DELEÇÃO DE PGC1 α NAS CÉLULAS T REGULADORAS AFETAM A CAPACIDADE DE REGULAR PROCESSOS INFLAMATÓRIOS.

Finalmente, para validar a importância de PGC1 α na subpopulação de linfócitos T reguladores, usamos diferentes modelos in vivo para avaliar se camundongos depletados para PGC1 α eram mais ou menos suscetíveis a doenças mediadas por

células T reguladoras. Inicialmente escolhemos o modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), onde tratamos os animais WT e KO condicionais para PGC1 α em células T reguladoras, com uma emulsão em CFA contendo antígeno (MOG35-55), além de toxina Pertussis. No dia dois pós imunização, foi administrado mais uma dose de pertusis. O score clínico dos animais foi avaliado até o 13^o dias pós imunização. (Figura 12A). Visto que o modelo de EAE demonstrou que a deleção de PGC1 α afetou a capacidade anti-inflamatória dos animais, resolvemos testar o modelo de Colite experimental induzida por DSS (Figura 12B). Corroborando com o resultado do modelo anterior, nossos dados sugerem que o PGC1 α possui papel essencial no controle da inflamação mediado por células T reguladoras.

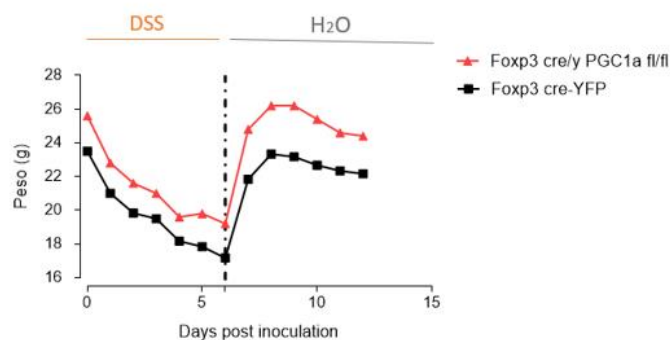
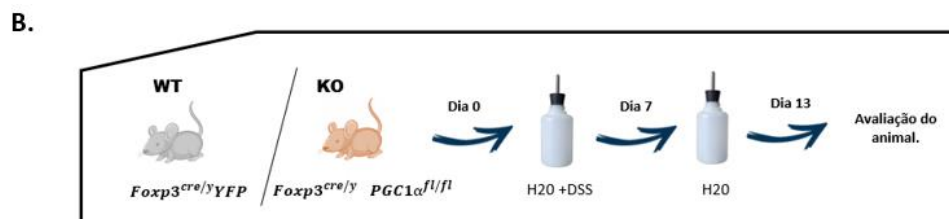
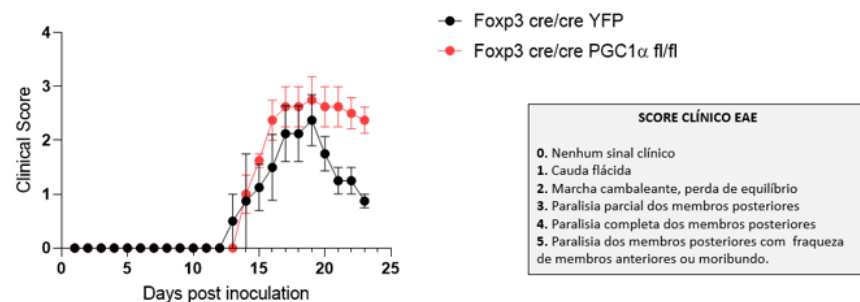
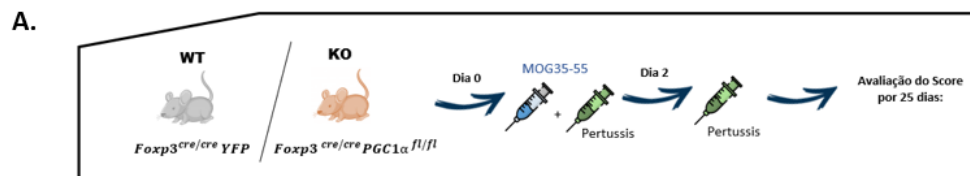


Figura 12. A deleção de PGC1 α nas células Tregs afetam a capacidade de regular processos inflamatórios. A) Análise por citometria de fluxo do efeito de ZLN005 sobre a diferenciação de Foxp3 em animais knockouts (vermelho) comparados a animais controle (preto).

7. DISCUSSÃO

As células T precisam de uma ampla disponibilidade de nutrientes para exercer todas suas funções efectoras. Por esse motivo, após sua ativação via TCR, as células T passam através de uma reprogramação metabólica que tem como intuitivo gerar a energia suficiente para as células proliferarem, migrarem ou produzir suas diferentes citocinas (Rangel Rivera et al., 2021). Nesse contexto, as células Tregs contam com certas particularidades metabólicas quando comparadas a outros tipos de subclasses de células T. Por exemplo, é bem definido que as Tregs usam preferencialmente a fosforilação oxidativa invés da glicólise como principal fonte de energia (Shi & Chi, 2019). Tendo em conta que a maior parte da fosforilação oxidativa acontece dentro da mitocôndria, é de se esperar que esta organela tenha uma função especial dentro da estabilidade e função das células Tregs (Cortez et al., 2012). O cofator de transcrição PGC1 α tem sido caracterizado como um componente essencial da maquinaria transcricional que regula a estrutura e função das mitocôndrias (Halling & Pilegaard, 2020). Trabalhos anteriores mostraram que a deleção de PGC1 α afeta diretamente a capacidade supressora das células Tregs (Beier et al., 2015), porém ainda não está definido qual é a importância de PGC1 α para o metabolismo mitocondrial das células Treg.

Em primeiro lugar, nós quisemos avaliar a expressão de PGC1 α ao longo do processo de diferenciação das células Tregs. O fato de que o maior pico de expressão de PGC1 α correlaciona com o maior pico de expressão de Foxp3, pode ser indicativo de que PGC1 α é um fator chave para a indução de expressão de Foxp3 e posterior processo de diferenciação. Anteriormente, foi demonstrado que a expressão de Foxp3 acontece durante as primeiras 24 horas de cultura após o estímulo de TGF- β (Selvaraj & Geiger, 2007). Além disso, é bem conhecido que o estímulo de TGF- β promove diretamente o aumento de geração de massa mitocondrial e posterior incremento da fosforilação oxidativa (Liu & Chen, 2022; Q. Sun et al., 2019), razão pela qual é possível sugerir que o TGF- β também induz a expressão de PGC1 α . Do mesmo modo, foi possível observar que a expressão de PGC1 α é significativamente maior nas células Tregs comparada com células naive ou células não estimuladas. A partir desses resultados podemos sugerir que PGC1 α pode ter um papel de importância para as células Tregs, sua diferenciação e sua função.

Para nos aprofundar na importância de PGC1 α na diferenciação de células Tregs, nós modulamos farmacologicamente a atividade de PGC1 α . Para isto usamos o fármaco ZLN005, o qual já foi caracterizado como um importante ativador transcricional de PGC1 α (Zhang et al., 2013; Zhu et al., 2022). De fato, células Treg diferenciadas em presença de ZLN005, apresentam uma maior diferenciação, indicando que o fármaco tem um efeito direto sobre a expressão de Foxp3, apesar de não observarmos aumento no MFI de Foxp3, a quantidade de células expressores de Foxp3 é significativamente maior, pelo qual é possível sugerir um efeito direto de PGC1 α no processo. Porém, o uso de ferramentas farmacológicas apresenta como principal dificuldade os efeitos off-targets, que podem mascarar os efeitos, por exemplo ZLN005, tem se visto ativar também outros genes como AMPK α (Zhang et al., 2013). Por tal motivo, nós usamos camundongos geneticamente modificados, para o estudo da perda funcional e específica de PGC1 α nas células T CD4 e células Foxp3. Esses animais nos permitem analisar diretamente se a ausência de PGC1 α tem um efeito direto sobre a diferenciação e função das células Tregs.

Primeiramente, nós usamos os camundongos PGC1 α ^{fl/fl} CD4^{Cre/0} cujas células CD4 e CD8 perdem especificamente a expressão de PGC1 α . Quando diferenciadas em presença de TGF- β , essas células deficientes para PGC1 α , diferenciaram menos comparadas com células controle, indicando assim que PGC1 α é realmente um fator de transcrição importante para a diferenciação das células tregs. Infelizmente, esses animais foram gerados recentemente e não foi possível se aprofundar sobre outras possíveis alterações que eles possam ter ante a ausência de PGC1 α . Porém é importante ressaltar, que esses animais não apresentam nenhuma alteração em crescimento, sobrevivência e reprodução. Posteriormente, foram feitos alguns experimentos para avaliar o metabolismo das células T CD4 e células Treg diferenciadas desses animais.

Paralelamente nós também geramos outra linhagem de animais transgênicos, PGC1 α ^{fl/fl} Foxp3^{CRE/CRE}. O uso de animais Foxp3^{Cre} tem permitido um estudo mais específico das células Foxp3, devido a que junto a recombinasse CRE, existe o repórter YFP, que permite sortear as células Foxp3 através de sua fluorescência (Rubtsov et al., 2008). Devido a importância que tem PGC1 α para o metabolismo

mitocondrial, novamente nosso primeiro intuito foi avaliar o crescimento desses animais, posto que é conhecido que alterações em alguns genes vitais para as funções das células Foxp3, podem desencadear um síndrome linfoproliferativo conhecido como Scurfy, o qual é letal para os animais, não conseguindo sobreviver por mais de 4 semanas (Ramsdell & Ziegler, 2014). Nossos animais, não apresentaram nenhum sinal de doença, perda de peso, dificuldade para crescer, ou possível alteração autoimune. Contudo, aproveitando que as células Foxp3 desses animais são coloridas, analisamos por citometria de fluxo a estabilidade dessas células. Não achamos nenhuma alteração, na proporção de células Treg nenhum dos órgãos linfoides, nem alterações na produção de moléculas supressoras. Esses achados, são contrários a nossa hipótese inicial, de que animais cujas Tregs são deficientes para PGC1 α , poderiam apresentar um fenótipo scurfy. Então aparentemente, as células Tregs naturais, cuja expressão de Foxp3 não é dependente de TGF- β não precisam de PGC1 α para cumprir suas funções. Isto, é devido a que quando se induz a diferenciação de células Treg em presença de TGF- β , células Foxp3 deficientes para PGC1 α diferenciam menos, comparadas com células controle. Esses resultados indicam que PGC1 α é modulado pelo TGF- β diretamente. Curiosamente, PGC1 α tem sido mostrado como um regulador negativo da sinalização do TGF- β (Choi et al., 2019). Então é possível que PGC1 α , seja importante para controlar a sinalização de TGF- β durante a diferenciação das Tregs.

Posteriormente, nós usamos a sonda MitroTracker RED, para estudar se a deficiência de PGC1 α pode afetar a estrutura mitocondrial nas Treg diferenciadas em presença do TGF- β . MitroTracker RED é uma sonda que marca especificamente a mitocôndria, e permite determinar a massa mitocondrial junto a seu potencial de membrana (Chazotte, 2011). Células Tregs deficientes para PGC1 α , apresentam uma menor densidade mitocondrial, comparada com as células controle, e dado que a intensidade da fluorescência indica diretamente o potencial de membrana da mitocôndria, foi possível observar que as células deficientes apresentam um menor potencial. Este componente é essencial para o armazenamento de energia durante a fosforilação oxidativa (Zorova et al., 2018). Portanto, PGC1 α é importante para a estabilidade mitocondrial durante a diferenciação de células Tregs após o tratamento com o TGF- β . Análises moleculares mais precisas precisam ser feitas para entender

quais efeitos adicionais traz consigo a deficiência de PGC1 α . O entendimento da morfologia e função da mitocôndria nesse contexto será vital para ampliar o conhecimento sobre a importância da mitocôndria na biologia das células Tregs.

Finalmente, nos quisemos avaliar diferentes modelos in vivo, para o estudo da importância de PGC1 α para as células Treg no controle da inflamação. Em primeiro lugar, escolhemos o modelo de colite mediado pelo DSS. As células Treg são componentes vitais do controle da inflamação durante as doenças inflamatórias intestinais (X. Sun et al., 2017). Durante esses processos inflamatórios acontecem uma alteração na proporção, diferenciação e função das células Tregs (Boschetti et al., 2017). Nossos modelos de colite, em animais deficientes para PGC1 α , mostrou que em ausência de PGC1 α os animais apresentam uma maior dificuldade de recuperação após a indução da colite, indicando que as células Tregs, não são capazes de controlar a inflamação. Isto pode ser indicativo de uma perda de função das Tregs. Análises celulares, precisam ser feitas para entender que tipo de alterações apresentam as células Tregs em ausência de PGC1 α .

Adicionalmente, também avaliamos se animais PGC1 α deficientes, seriam mais susceptíveis ao desenvolvimento do EAE. As células Tregs são essenciais no controle da inflamação no sistema nervoso central durante o desenvolvimento do EAE. As células Treg controlam a proliferação de células T CD4 efectoras, e inflamatórias como as células Th17 (Koutouros et al., 2014). Nosso modelo, mostrou que animais deficientes para PGC1 α apresentam uma maior susceptibilidade ao EAE, e são incapazes de se recuperar dos processos inflamatórios gerados pela doença. Então novamente é possível observar que apesar de não apresentar distúrbios celulares em condições de homeostasia, quando acontecem processos inflamatórios, as células Tregs que são geradas na periferia, não são capazes de controlar a inflamação, nem suprimir as respostas inflamatórias.

Nosso projeto, tinha como objetivo entender se PGC1 α é um gene de importância para a biologia e função das células Tregs, apesar de ser necessário se aprofundar mais no entendimento dos efeitos funcionais que PGC1 α possa ter nas células Tregs, abrimos um caminho de estudo que permitiria ampliar os conhecimentos sobre a importância do metabolismo mitocondrial no controle das respostas imunes

8. CONCLUSÃO

- PGC1 α é um fator chave para a indução de expressão de Foxp3 e posterior processo de diferenciação.
- PGC1 α possui um papel de importância para as células T reguladoras, sua diferenciação e sua função.
- Células Treg diferenciadas em presença do ativador de PGC1 α , apresentam uma maior diferenciação, indicando que o fármaco tem um efeito direto sobre a expressão de Foxp3
- Células Tregs naturais, cuja expressão de Foxp3 não é dependente de TGF- β não precisam de PGC1 α para cumprir suas funções. Sugerindo que PGC1 α é modulado pelo TGF-B diretamente.
- PGC1 α é importante para a estabilidade mitocondrial durante a diferenciação de células Tregs após o tratamento com o TGF- β .
- Apesar de não apresentar distúrbios celulares em condições de homeostasia, quando acontecem processos inflamatórios, as células Tregs que são geradas na periferia, não são capazes de controlar a inflamação, nem suprimir as respostas inflamatórias.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelin, A., Gil-de-Gómez, L., Dahiya, S., Jiao, J., Guo, L., Levine, M. H., Wang, Z., Quinn, W. J., Kopinski, P. K., Wang, L., Akimova, T., Liu, Y., Bhatti, T. R., Han, R., Laskin, B. L., Baur, J. A., Blair, I. A., Wallace, D. C., Hancock, W. W., & Beier, U. H. (2017). Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metabolism*, 25(6), 1282-1293.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.018>
- Beier, U. H., Angelin, A., Akimova, T., Wang, L., Liu, Y., Xiao, H., Koike, M. A., Hancock, S. A., Bhatti, T. R., Han, R., Jiao, J., Veasey, S. C., Sims, C. A., Baur, J. A., Wallace, D. C., & Hancock, W. W. (2015). Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3 + T-regulatory cell function and allograft survival. *The FASEB Journal*, 29(6), 2315–2326. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268409>
- Boschetti, G., Kanjarawi, R., Bardel, E., Collardeau-Frachon, S., Duclaux-Loras, R., Moro-Sibilot, L., Almeras, T., Flourié, B., Nancey, S., & Kaiserlian, D. (2017). Gut Inflammation in Mice Triggers Proliferation and Function of Mucosal Foxp3 + Regulatory T Cells but Impairs Their Conversion from CD4 + T Cells. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(1), 105–117. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw125>
- Brunet-Ratnasingham, E., Dubé, M., & Kaufmann, D. E. (2019). Targeting Mitochondria to Revive Dysfunctional Regulatory T Cells. *Trends in Molecular Medicine*, 25(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.001>
- Cardanho-Ramos, C., & Morais, V. A. (2021). Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13059. <https://doi.org/10.3390/ijms222313059>
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chazotte, B. (2011). Labeling Mitochondria with MitoTracker Dyes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(8), pdb.prot5648. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5648>
- Choi, H.-I., Park, J. S., Kim, D.-H., Kim, C. S., Bae, E. H., Ma, S. K., & Kim, S. W. (2019). PGC-1 α Suppresses the Activation of TGF- β /Smad Signaling via Targeting TGF β RI Downregulation by let-7b/c Upregulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5084. <https://doi.org/10.3390/ijms20205084>
- Cortez, E., Neves, F. A., Bernardo, A. F., Stumbo, A. C., Carvalho, L., Garcia-

- Souza, É., Sichieri, R., & Moura, A. S. (2012). Lymphocytes Mitochondrial Physiology as Biomarker of Energy Metabolism during Fasted and Fed Conditions. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1100/2012/629326>
- Das, M., Alzaid, F., & Bayry, J. (2019). Regulatory T Cells under the Mercy of Mitochondria. *Cell Metabolism*, 29(2), 243–245. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.012>
- Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J., & Shevach, E. M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3 + T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4022–4026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4022>
- Halling, J. F., & Pilegaard, H. (2020). PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(9), 927–936. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0005>
- Huang, N., & Perl, A. (2018). Metabolism as a Target for Modulation in Autoimmune Diseases. *Trends in Immunology*, 39(7), 562–576. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.006>
- Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology*, 37(11), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>
- Kim, J.-H., Kim, B. S., & Lee, S.-K. (2020). Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. *Immune Network*, 20(1). <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e4>
- Koutrolos, M., Berer, K., Kawakami, N., Wekerle, H., & Krishnamoorthy, G. (2014). Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0163-1>
- Liu, H., & Chen, Y.-G. (2022). The Interplay Between TGF- β Signaling and Cell Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.846723>
- Lee, H.-M., Bautista, J. L., & Hsieh, C.-S. (2011). *Thymic and Peripheral Differentiation of Regulatory T Cells* (pp. 25–71). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387827-4.00002-4>
- Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M., & Rudensky, A. Y. (2005). TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1061–1067. <https://doi.org/10.1084/jem.20042276>
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A., Nichols, A. G., & Rathmell, J. C. (2011). Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4 + T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*,

186(6), 3299–3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>

- Ramsdell, F., & Ziegler, S. F. (2014). FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nri3650>
- Rangel Rivera, G. O., Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Smith, A. S., Wyatt, M. M., Rivera-Reyes, A. M., Thaxton, J. E., & Paulos, C. M. (2021). Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645242>
- Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Muller, W., & Rudensky, A. Y. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity*, 28(4), 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.017>
- Selvaraj, R. K., & Geiger, T. L. (2007). A Kinetic and Dynamic Analysis of Foxp3 Induced in T Cells by TGF- β . *The Journal of Immunology*, 178(12), 7667–7677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7667>
- Shi, H., & Chi, H. (2019). Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02716>
- Sun, Q., Fang, L., Tang, X., Lu, S., Tamm, M., Stolz, D., & Roth, M. (2019). TGF- β Upregulated Mitochondria Mass through the SMAD2/3 \rightarrow C/EBP β \rightarrow PRMT1 Signal Pathway in Primary Human Lung Fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 202(1), 37–47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800782>
- Sun, X., He, S., Lv, C., Sun, X., Wang, J., Zheng, W., & Wang, D. (2017). Analysis of murine and human Treg subsets in inflammatory bowel disease. *Molecular Medicine Reports*, 16(3), 2893–2898. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6912>
- Salmond, R. J. (2018). mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00122>
- Schwartz, R. H. (2012). Historical Overview of Immunological Tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4), a006908–a006908. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006908>
- Shyer, J. A., Flavell, R. A., & Bailis, W. (2020). Metabolic signaling in T cells. *Cell Research*, 30(8), 649–659. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0379-5>
- Weinberg, S. E., Singer, B. D., Steinert, E. M., Martinez, C. A., Mehta, M. M., Martínez-Reyes, I., Gao, P., Helmin, K. A., Abdala-Valencia, H., Sena, L. A., Schumacker, P. T., Turka, L. A., & Chandel, N. S. (2019). Mitochondrial complex III is essential for suppressive function of regulatory T cells. *Nature*, 565(7740), 495–499. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0846-z>

- Windt, G. J. W., & Pearce, E. L. (2012). Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunological Reviews*, 249(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x>
- Wurst, W., & Kühn, R. (Eds.). (2009). *Gene Knockout Protocols* (Vol. 530). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1>
- Zhang, L.-N., Zhou, H.-Y., Fu, Y.-Y., Li, Y.-Y., Wu, F., Gu, M., Wu, L.-Y., Xia, C.-M., Dong, T.-C., Li, J.-Y., Shen, J.-K., & Li, J. (2013). Novel Small-Molecule PGC-1 α Transcriptional Regulator With Beneficial Effects on Diabetic db/db Mice. *Diabetes*, 62(4), 1297–1307. <https://doi.org/10.2337/db12-0703>
- Zhu, P., Ma, H., Cui, S., Zhou, X., Xu, W., Yu, J., & Li, J. (2022). ZLN005 Alleviates In Vivo and In Vitro Renal Fibrosis via PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Homeostasis. *Pharmaceuticals*, 15(4), 434. <https://doi.org/10.3390/ph15040434>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>