

EFEITO DA MODULAÇÃO DO TROCADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ SOBRE ASPECTOS ENERGÉTICOS E OXIDATIVOS MITOCONDRIAIS

Rayssa de Mello Lopes¹; Gabriela Nohemi Nuñez Esteves²; Letícia Silva Ferraz³; Claudia Alves da Costa⁴; Ivarne Luis Dos Santos Tersariol⁵; Tiago Rodrigues⁶

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: raymello98@gmail.com
2. Doutoranda em Biosistemas - UFABC; e-mail: gabriela.nohemi@ufabc.edu.br
3. Doutoranda em Biotecnologia - UMC; e-mail: letisbloom@hotmail.com
4. Doutoranda em Biotecnologia - UMC; e-mail: ca.liny@hotmail.com
5. Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: ivarne.tersariol@gmail.com
6. Professor da Universidade Federal do ABC; e-mail: trodrigues.ufabc@gmail.com

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras chaves: Cálcio; Mitocôndria, Trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Câncer; Terapia direcionada.

INTRODUÇÃO

O cálcio é um íon biologicamente muito ativo que está envolvido na regulação de diversos processos celulares importantes, incluindo o metabolismo energético, motilidade celular, proliferação celular, entre outros (ORRENIUS, 1989). A regulação das concentrações intracelulares de cálcio, no entanto, não é um processo simples e requer atividade de muitos mecanismos de controle que envolve a ativação de transportadores, canais e bombas iônicas (BERRIDGE *et al.*, 2000; CLAPHAM, 2007). Alterações nesses mecanismos de homeostase de cálcio são frequentemente associadas às disfunções mitocondriais, as quais podem causar a morte celular ou contribuir para patogênese de diversas doenças, inclusive o câncer (ORRENIUS *et al.*, 2015). A este respeito sabe-se que o NCX é um trocador de $3\text{Na}^+ / 1\text{Ca}^{2+}$ que pode atuar tanto em modo *forward* (Na^+ *in* / Ca^{2+} *out*) como mecanismo fisiológico, quanto em modo *reverse* (Na^+ *out* / Ca^{2+} *in*) em condições patológicas contribuindo para sobrecarga de cálcio - alterações que são frequentemente observadas em casos de isquemias (MATSUDA *et al.*, 2001; NAMEKATA *et al.*, 2017), porém pouco relatadas em câncer (RODRIGUES *et al.*, 2019). Nesse sentido o estudo das alterações da concentração de cálcio por meio do trocador de NCX constitui-se uma proposta interessante para investigar a atividade do NCX em modo *forward* ou *reverse* (Na^+ *out* / Ca^{2+} *in*) sobre a bioenergética mitocondrial, bem com sua relação com o desenvolvimento do câncer.

OBJETIVO

Avaliar as alterações de cálcio induzidas pela modulação do trocador NCX sobre os processos mitocondriais e investigar a atividade do NCX de membrana plasmática como um dos mecanismos de sobrevivência tumoral.

METODOLOGIA

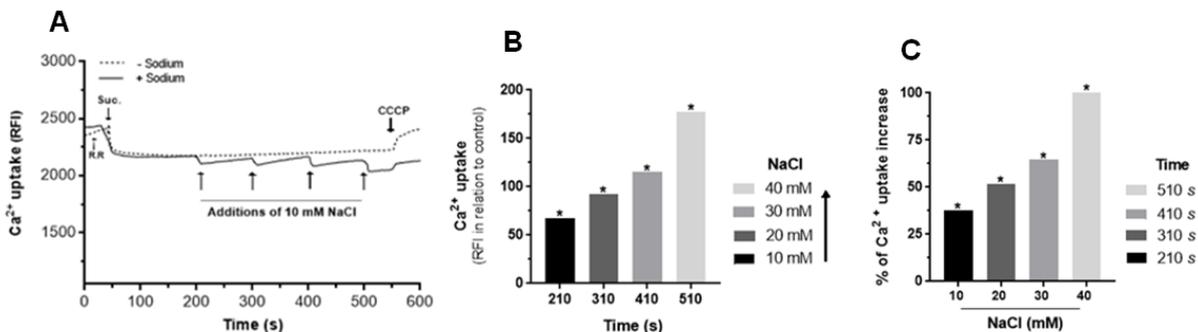
O estudo do NCX mitocondrial foi realizado com mitocôndrias isoladas de fígado de rato sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Mogi das Cruzes, protocolo nº 002/2019. Para a obtenção e isolamento das mitocôndrias ratos Wistar machos (180 g) foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi alcançado por incisão na cavidade abdominal. Após a remoção do órgão, as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial e a determinação da proteína mitocondrial foi realizada pelo método de Biureto. A captação de cálcio foi avaliada em espectrofluorímetro Hitachi F-7000

(Tóquio, Japão) por meio das alterações da fluorescência do *calcium Green* 0,1 μM (505/531nm excitação/emissão). As mitocôndrias (1 mg / mL) foram energizadas com succinato de potássio 5 mM e incubadas em tampão de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de rotenona 2,5 μM e cloreto de cálcio 10 μM , a 30°C (volume final 2,0 mL). Para investigação da atividade do NCX de membrana plasmática no câncer, células de melanoma humano mutadas SK-MEL-19 (BRAF^{V600E} mutado) e SK-MEL-147 (NRAS^{Q61R}) foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle (DMEM) de alta glicose (DMEM), pH 7,2, suplementado com 100 U / mL de penicilina, 100 μg / mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino a 37 °C com 5% de CO₂ (Panasonic MCO-19AIC, Japão). Para realização dos experimentos, as células foram desaderidas da garrafa com tripsina-EDTA, centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min e suspensas em DMEM suplementado. Em seguida as células foram plaqueadas a uma densidade de 6,25 $\times 10^4$ células/ cm², incubadas por 24 h para adesão celular e o ensaio de viabilidade celular foi realizado por redução do 1-(4,5-dimetiltiazol-2-3,5-difenilformazan) (MTT) com leitura da absorbância em 570 nm em um leitor de microplacas (Biochrom, Asys Expert Plus Microplate Reader, EUA). Para a medição do Ca²⁺ intracelular as células foram plaqueadas (6,25 $\times 10^4$ células/ cm²) e incubadas por 24 h, depois lavadas duas vezes com solução Hanks 'Balance Salts Solution (HBSS) e adicionado o Fura 2-AM (2,0 μM) por 30 min a 25 °C. Em seguida as células foram lavadas com HBSS seguido pela adição dos inibidores de NCX. Após 10 min de incubação os níveis de Ca²⁺ intracelular foram estimados através do registro de variações de fluorescência a 37°C durante 15 min, adicionando paralelamente tapsigargina e ionomicina. A fluorescência foi adquirida em uma microscopia de campo amplo (Leica DMI6000B, Leica Microsystems, Alemanha). As análises gráficas foram feitas no software Graph Pad Prism 7.04.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da modulação do trocador NCX mitocondrial sobre o transporte de cálcio primeiramente foi analisado na presença de inibidores do trocador SEA0400 e KB-R7943, a fim de se investigar possíveis alterações na movimentação do cálcio mitocondrial. Nossos resultados prévios, contudo não demonstraram um aumento ou diminuição na captação de cálcio pelas mitocôndrias energizadas em relação ao controle indicando assim que talvez o trocador estivesse inativo ou que os inibidores não tiveram efeito (Resultados não mostrados). Sendo assim, novas condições experimentais foram testadas a fim de avaliar a modulação do NCX, a saber, suplementação com sódio para estimulação do trocador e *ruthenium red* para inibição do *uniporter*. Como resultado observamos que adição de 10 mM de cloreto de sódio (NaCl) aumentou sutilmente a captação de cálcio na presença de *ruthenium red* (1 μM), porém que este efeito não foi inibido por SEA0400, sugerindo assim que esses inibidores não atuam sobre o NCX mitocondrial, e que são seletivos para NCX de membrana plasmática (Resultados não mostrados), bem como corrobora com outros estudos (MATSUDA *et al.*, 2001; NAMEKATA *et al.*, 2017). Em vista disso, objetivamos estimular mais o NCX mitocondrial aumentando gradativamente a quantidade de sódio experimental, pois sabe-se que o aumento da concentração desse íon no espaço extramitocondrial induz a despolarização da membrana mitocondrial interna tornando-a mais permeável ao sódio, o que por sua vez ativa o NCX em modo *reverse* para normalização do gradiente (MURPHY & EISNER, 2009; SAMANTA *et al.*, 2018). Como mostra Figura 1 o aumento gradativo da concentração de NaCl conseguiu potencializar a captação de cálcio mitocondrial (Fig.1 A e B). Um efeito que favoravelmente sugere a participação do NCX mitocondrial em modo *reverse* contribuindo para homeostase mitocondrial. Além disso, a entrada de cálcio na mitocôndria em resposta ao sódio representou um aumento de quase 3 vezes mais na presença de 40 mM de NaCl.

Figura 1. Captação de cálcio mitocondrial estimulada com sódio

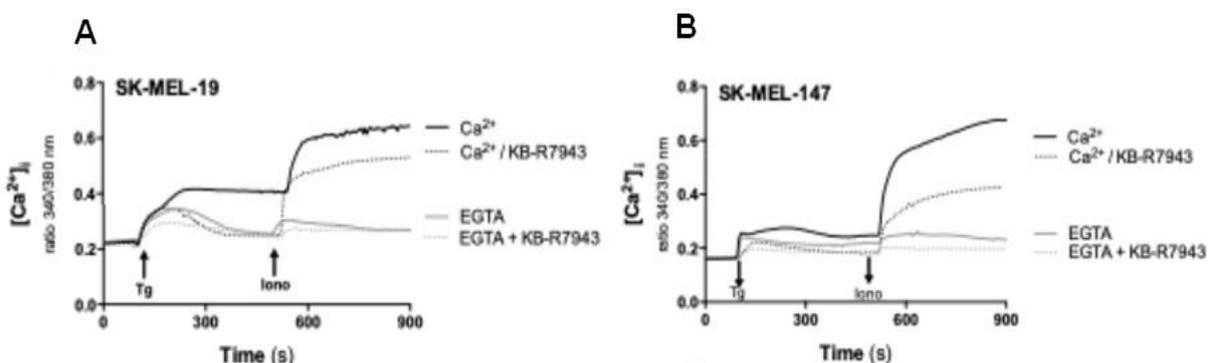


efeito dose-dependente (Fig.1 C).

As mitocôndrias foram incubadas em tampão de reação contendo calcium green (0,1 μ M), rotenona (2 μ M), cloreto de cálcio (10 μ M) e 1 μ M de ruthenium red (R.R) a 30 °C. Para a estimulação da captação de cálcio mitocondrial foi adicionado 5 mM de succinato de potássio (Suc) em 50 segundos e CCCP (1 μ M) em 550 segundos para liberação máxima do cálcio. As adições de 10 mM de NaCl foram feitas em 200; 300; 400; e 500 segundos e os resultados foram tratados de acordo com a intensidade relativa de fluorescência

Com relação à avaliação da atividade do NCX de membrana plasmática como um dos mecanismos de sobrevivência tumoral investigamos paralelamente em células de melanoma BRAF^{V600E} mutado (linhagem SK-MEL-19) responsivas ao vemurafenibe e células NRAS^{Q61R} mutato (linhagem SK-MEL-147) resistentes ao fármaco, à modulação do trocador NCX sobre a cinética de cálcio e seu impacto na viabilidade celular quando associado ao vemurafenibe. Como é possível observar Figura 2A e 2B nossos resultados avaliando o NCX sobre a cinética de cálcio em células de melanoma NRAS^{Q61R} mutado e BRAF^{V600E} mutado demonstraram que a inibição do trocador utilizando KB-R7943 reduziu os níveis aumentados de cálcio citosólico induzido por taspigargina e ionomicina e que ainda foram totalmente reduzidos quando utilizado o quelante de cálcio EGTA – um efeito observado para os dois tipos de melanoma e que consequentemente indica a atividade do NCX em modo *reverse*, especialmente para linhagem de mutação NRAS^{Q61R} (Fig. 2B).

Figura 2. Inibição do trocador NCX promove a redução dos níveis de cálcio citosólico induzido por taspigargina e ionomicina em células de melanoma BRAF e NRAS.

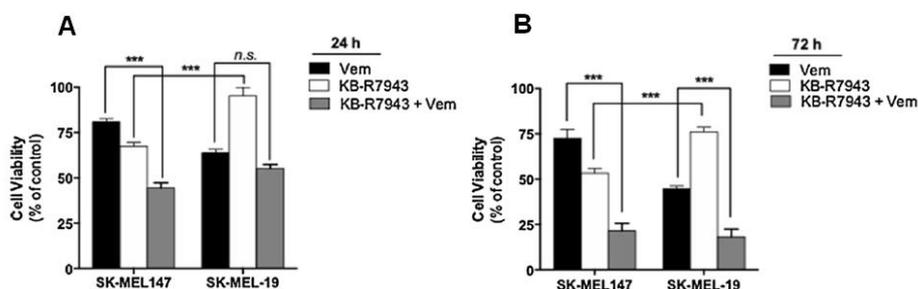


A avaliação dos níveis de cálcio citosólico foi realizada utilizando 1 μ M de taspigargina (Tg) em 100 segundos e ionomicina (Iono) em 540 segundos. Para as leituras com KB-R7943 as células foram

previamente incubadas com 5 μ M do inibidor e com 0,5 mM de EGTA para total diminuição das concentrações de cálcio.

Diante desses achados nós investigamos se a inibição do NCX alterava a sensibilidade das células de melanoma ao vemurafenibe, a fim de descobrir se a modulação do trocador influenciava na resposta ao tratamento. Para isso, avaliamos o efeito do KB-R7943 isoladamente e combinado com o vemurafenibe sobre a viabilidade celular. Como podemos observar na Figura 3A e 3B, nossos resultados demonstraram que a inibição do NCX com KB-R7943 foi mais citotóxica para as células de melanoma SK-MEL-1947 (NRAS^{Q61R} mutado), do que para as células SK-MEL-19 (BRAF^{V600E} mutado), e que ainda a associação de KB-R7943 com vemurafenibe conseguiu sensibilizar as células de melanoma NRAS^{Q61R} a ação do quimioterápico aumentando sua citotoxicidade e resposta ao tratamento farmacológico (Fig. 3).

Figura 3. Efeito do KB-R7943 e sua combinação com vemurafenibe sobre a viabilidade celular do melanoma.



A viabilidade celular foi avaliada por MTT após 24 h (A) e 72 h (B) de incubação com 1,0 μ mol/ vemurafenibe (barras pretas), 1,0 μ mol/L KB-R7943 (barras brancas) e 1,0 μ mol/L KB-R7943 mais 1,0 μ mol/L de vemurafenibe (barras cinzas). Os dados foram expressos como média \pm EPM e a significância estatística foi definida como *ns* não significativo e *** $p < 0,001$, $n = 3$.

CONCLUSÕES

Juntos esses achados demonstram a importância da modulação do trocador NCX sobre as alterações das concentrações de cálcio avaliadas paralelamente sob um contexto fisiológico com mitocôndrias isoladas e patológicas com células de melanoma, ao mesmo tempo em que contribui para estudos futuros que desejam estudar a modulação do NCX como estratégia terapêutica para patologias em que as alterações da homeostase de cálcio sejam importantes como, por exemplo, o melanoma do subtipo NRAS^{Q61R} e BRAF^{V600E}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D. The versatility and universality of calcium signaling. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 1 (2000) 11–21.
- CLAPHAM, D. E. Calcium Signaling. **Cell**, 131(6), 1047–1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028.
- ORRENIUS, S.; McCONKEY, D. J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. **TIPS.**, v. 10, p. 281-285, 1989.
- ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochem Biophys Res Commun.** 2015 Apr 24;460(1):72-81.

MATSUDA, T. [*et al*] & BABA, A. SEA0400, a el and selective inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2001 Jul;298(1):249-56.

MURPHY, E. & EISNER, D. A. Regulation of Intracellular and Mitochondrial Sodium in Health and Disease. **Circ Res.** 2009 Feb 13; 104(3): 292–303.

NAMEKATA, I. [*et al*] & TANAKA, H. Fluorescence Analysis of the Mitochondrial Effect of a Plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Inhibitor, SEA0400, in Permeabilized H9c2 Cardiomyocytes. **Biol Pharm Bull.** 2017; 40 (9): 1551-1555.

RODRIGUES, T.; ESTEVEZ, G.N.N.; TERSARIOL, I.L.D.S. Na⁺/Ca²⁺ Exchangers: unexploited opportunities for cancer therapy? **Biochem. Pharmacol**, 2019 May;163:357-361.

SAMANTA, K.; MIRAMS, G. R.; & PAREKH, A. B. Sequential forward and reverse transport of the Na⁺ Ca²⁺ exchanger generates Ca²⁺ oscillations within mitochondria. **Nat. Commun.** volume 9, Article number: 156 (2018).