Efeito da suplementação com β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB) sobre a via de mitofagia após regeneração hepática induzida por hepatectomia parcial (PHx)

Palavras-chave: Mitofagia, β-hidroxi- β-metilbutirato, fígado

Autores: Ana Laura Vieira da Silva; Franciely Alves da Silva; Gustavo Palmeira dos Santos; Marcos Vinícius Esteca; Isabela Aparecida Divino – Faculdade de Ciências Aplicadas, UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. Igor Luchini Baptista – Faculdade de Ciências Aplicadas, UNICAMP

INTRODUÇÃO

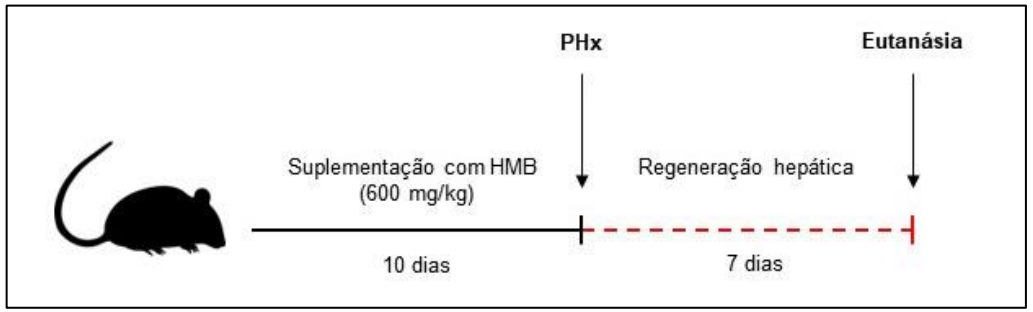
A hepatectomia parcial (PHx) é uma técnica que consiste na ressecção de 70% do fígado a fim de induzir a regeneração do órgão sem causar prejuízos ao tecido remanescente (LIU et al., 2021). O fígado é único em sua capacidade regenerativa, sendo capaz de expandir a sua massa de modo a conseguir se manter atendendo as necessidades metabólicas do organismo mesmo após a lesão. Para tanto, as mitocôndrias desempenham um importante papel, pois o adequado suprimento de energia constitui um pré-requisito da progressão da regeneração ao garantir a síntese de DNA, a proliferação dos hepatócitos e a sobrevivência das células (KAMIYAMA; OZAWA; HONJO, 1976). Contudo, após PHx, gera-se uma carga energética excessiva sobre o tecido remanescente, podendo haver atraso na regeneração, aumento da lesão e maior mortalidade (KAMIYAMA; OZAWA; HONJO, 1976; REHMAN et al, 2011).

Assim, a mitofagia constitui um ponto de controle celular da integridade da rede mitocondrial garantindo a qualidade e o adequado funcionamento das mitocôndrias durante momentos de estresse (SPRINGER; MACLEOD, 2016). A partir disso, destaca-se o β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB), um suplemento dietético que tem sido apontado como capaz de melhorar a função mitocondrial ao promover a biogênese de mitocôndrias, além de se relacionar com a regulação do sistema ubiquitina-proteassoma, vias que contribuem para que a haja a progressão adequada no ciclo celular e a proliferação coordenada das células hepáticas durante a regeneração (ZANCHI et al., 2011; GIRÓN et al., 2015; SMITH; MUKERJI; TISDALE, 2005).

Dessa forma, o presente projeto teve por objetivo investigar os efeitos da suplementação com HMB sobre a via de mitofagia após o processo de regeneração hepática em camundongos selvagens que passaram por hepatectomia parcial.

METODOLOGIA

Camundongos machos C57BL/6J tipo selvagem (WT) (12 semanas de idade, 25-27 g, N = 4 para cada grupo) foram usados nesse estudo. Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA, protocolo nº 5712-1/2021(A) aprovado em 18 de novembro de 2021). O desenho experimental do projeto seguiu o esquema abaixo.



A suplementação ocorreu através de gavagem (BAPTISTA et al., 2013). Para a cirurgia, uma incisão abdominal foi realizada a fim de permitir o acesso ao lobo esquerdo do fígado, o qual foi amarrado por um nó com linha de sutura não-absorvível e totalmente removido por uma tesoura microcirúrgica. Da mesma forma, o lobo médio foi amarrado em cerca de ⅓ de seu total e também removido (MITCHELL; WILLENBRING, 2008). Após 7 dias de regeneração, os animais foram eutanasiados e o fígado coletado e preservado para posterior análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PHx levou à uma variação significativa na massa corporal dos animais (Figura 1B). No pós-cirúrgico, a extração de substratos dos tecidos a fim de fornecer metabólitos para a regeneração e a redução da ingestão de ração devido a dor e inflamação constituem causas para a perda de peso (MOHAN et al., 2021). Analisando apenas o peso do órgão, não obtivemos diferença estatística (Figura 1C), todavia, visualmente o grupo PHx apresentou um crescimento compensatório na forma tecido fibrogênico maior se comparado ao grupo suplementado (Figura 1A). Assim, o aumento do peso do órgão associado à perda de massa corporal culminou em uma relação peso fígado/peso corporal significativamente mais elevada no grupo PHx (Figura 1D).

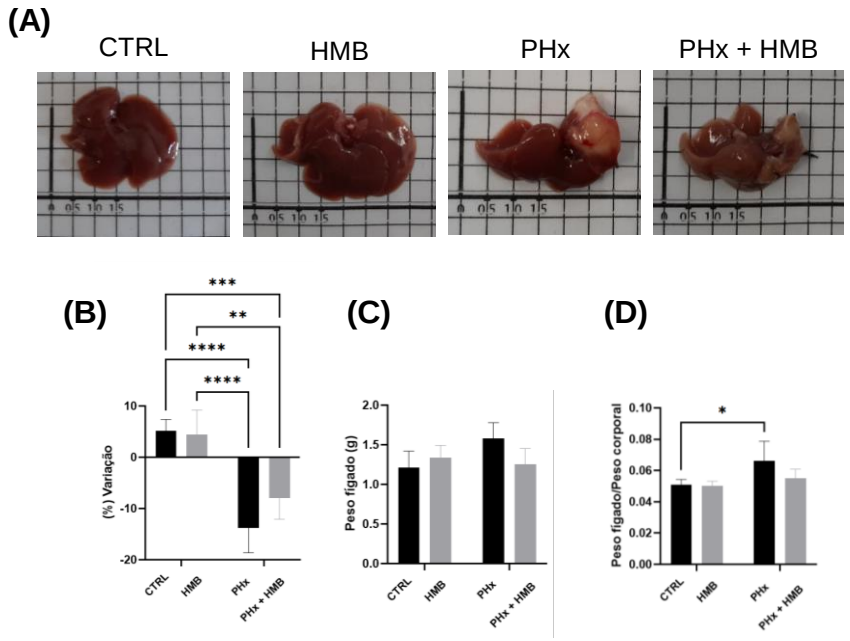


Figura 1. Efeitos da suplementação com HMB sobre o peso corporal e do fígado após 7 dias de regeneração hepática. **(A)** Imagens representativas do fígado dos diferentes grupos de estudo no momento da coleta. **(B)** Gráfico de variação do peso corporal (%) após 7 dias de regeneração. **(C)** Gráfico de peso do fígado (g). **(D)** Gráfico da razão do peso do fígado/peso corporal (g). Os dados representam médias ± SD (Two-Way ANOVA: ** p < 0,05; ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0,0001; n = 4).*

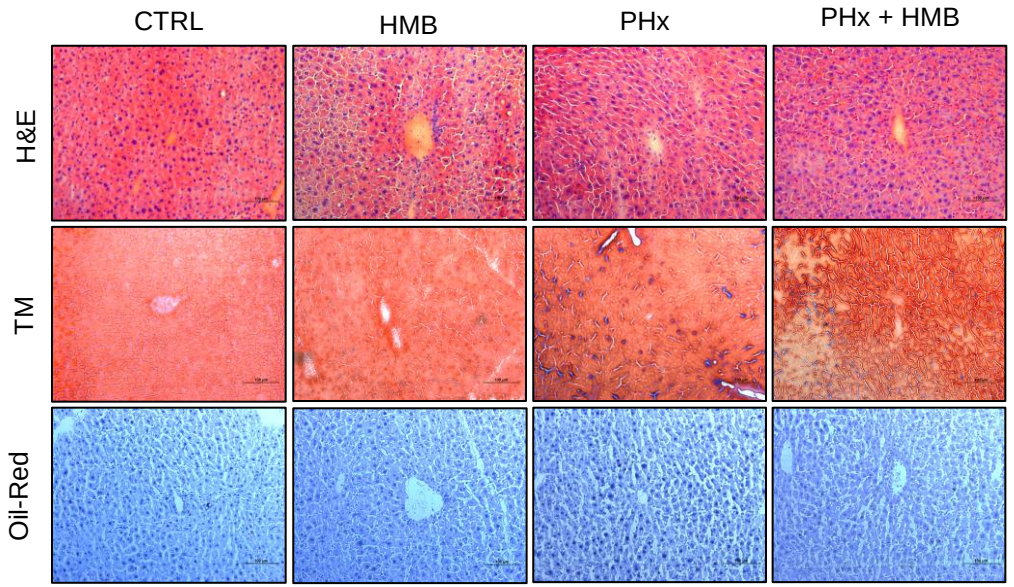


Figura 2. Efeitos da suplementação com HMB sobre a morfologia hepática após 7 dias de regeneração induzida por PHx. Confirmação da ausência de inflamação por coloração hematoxilina-eosina (H&E), de fibrose por tricrômio de Masson (TM) e de esteatose por Oil-Red após 7 dias de regeneração hepática. As imagens foram adquiridas com objetiva de 40x. As barras representam 100 µm.

Morfologicamente, as microfotografias não mostraram diferenças significativas nos aspectos histológicos do fígado, uma vez que não foi possível observar a presença de infiltrado, de esteatose ou de fibrose nos grupos submetidos à PHx (Figura 2). Após 7 dias de regeneração, a estrutura tubular típica do órgão se encontra restabelecida, o que pode explicar a ausência de alterações morfológicas.

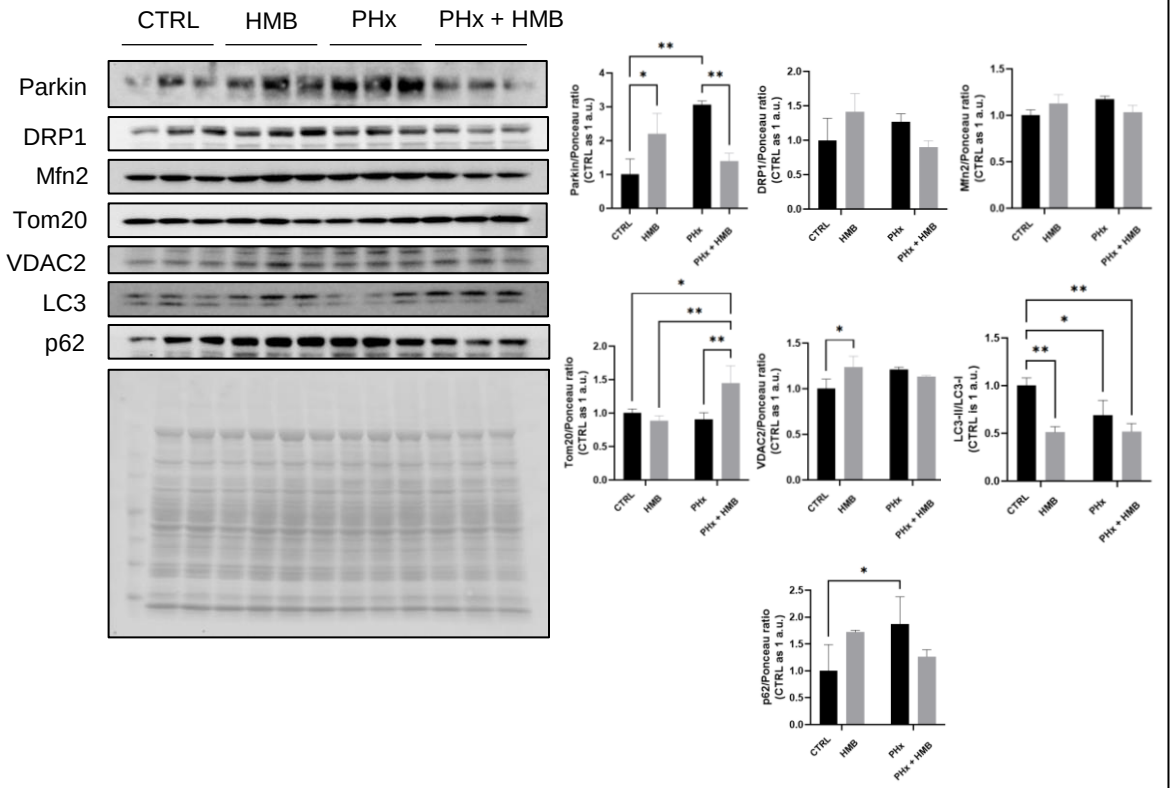


Figura 3. Efeitos da suplementação com HMB sobre a via de mitofagia após 7 dias de regeneração hepática. Análise de Western blot e densitometria dos níveis de Parkin, DRP1, Mfn2, Tom20, VDAC2, p62 e LC3 no fígado de camundongos WT. A coloração de Ponceau S foi usada para normalizar o carregamento. Os dados representam médias ± SD (Two-Way ANOVA: ** p < 0,05; ** p < 0.01 e *** p < 0.001; n = 3*).

As análises de Western Blotting demonstraram modulações no conteúdo de importantes proteínas associadas com a via de mitofagia (Figura 3). Corroborando com pesquisas realizadas anteriormente por nosso grupo, a suplementação elevou o conteúdo de Parkin no fígado intacto de forma significativamente estatística, indicando o HMB como um possível modulador dessa proteína através da ingestão.

Durante a lesão hepática, o estresse gerado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à queda do potencial de membrana das mitocôndrias induz apoptose e inflamação dos hepatócitos. Desse modo, a mitofagia mediada por Parkin desempenha um importante papel no controle de qualidade da rede mitocondrial durante a regeneração hepática, sendo ativada em momento de estresse (LI et al., 2017).

Nossos resultados demonstram que o grupo PHx + HMB apresentou uma menor conversão de LC3-I para LC3-II, a qual se associa com a formação do autofagossomo, vesícula de dupla membrana que engolfa as mitocôndrias danificadas e se funde aos lisossomos que possuem as enzimas as quais farão a degradação da organela (NGUYEN; PADMAN; LAZAROU, 2016). Outra proteína analisada foi p62, um dos receptores de autofagia que é translocado para a mitocôndria a fim de conectá-la ao autofagossomo, o qual também se encontra em níveis mais baixos no grupo PHx + HMB. Desse modo, o menor conteúdo de tais proteínas pode indicar que a mitofagia está sendo menos ativada. Corroborativamente, observamos uma queda no conteúdo de Parkin e um aumento de Tom20, podendo sinalizar um menor grau de estresse oxidativo com preservação da rede mitocondrial nos animais suplementados com HMB.

Em comparação, o grupo PHx apresentou acúmulo de LC3-II, p62 e Parkin, podendo sinalizar uma maior ativação da via mitofágica possivelmente em resposta a um maior estresse oxidativo.

Em ambos os grupos não fomos capazes de observar alterações na dinâmica mitocondrial, uma vez que não houve alteração nos níveis de DRP1 e Mfn2, proteínas responsáveis por realizar, respectivamente, fissão e fusão de mitocôndrias.

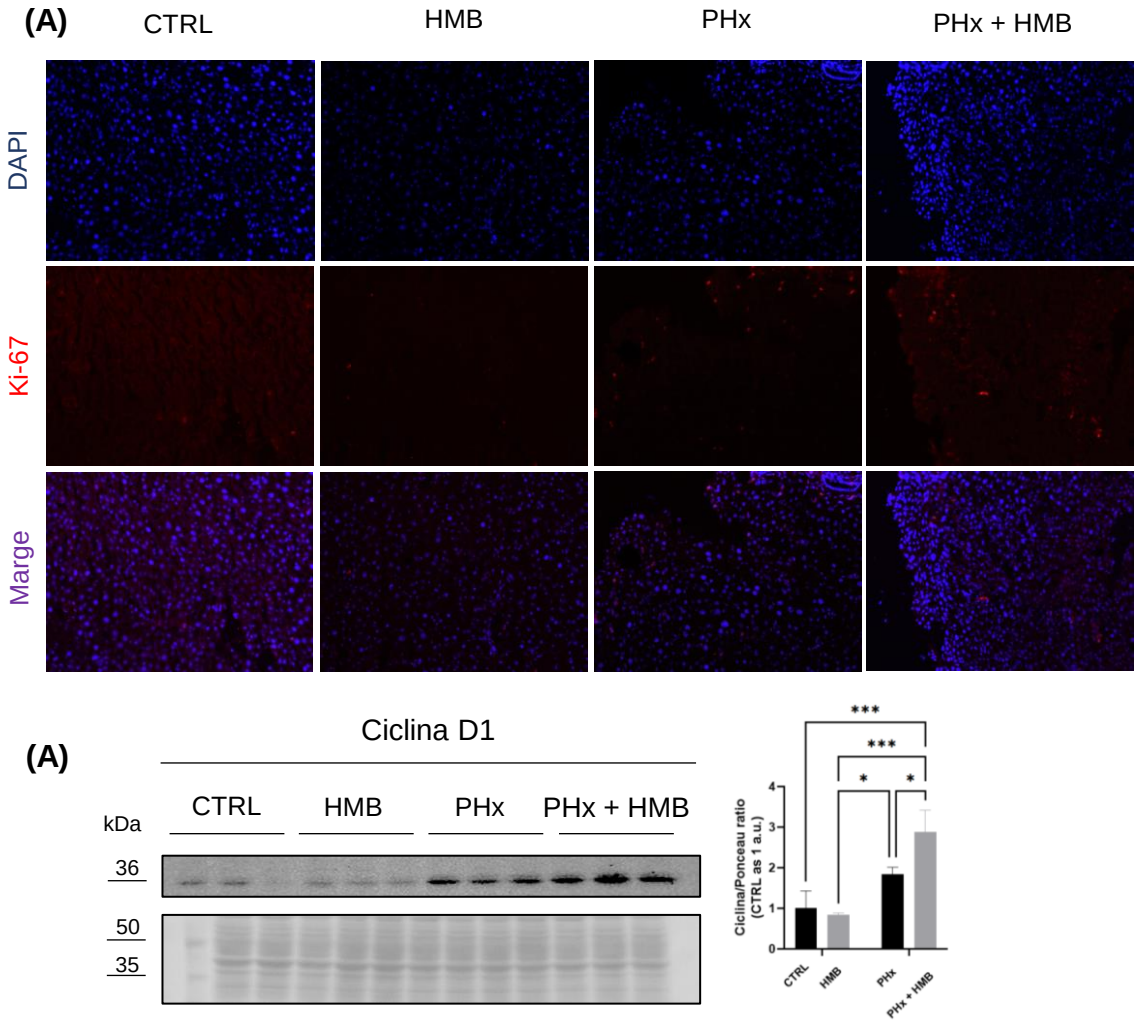


Figura 4. Efeitos da suplementação com HMB sobre o ciclo celular após 7 dias de regeneração hepática. **(A)** Imunofluorescência representativa da localização e expressão de KI-67 (vermelho) no fígado intacto e lesionado de camundongos WT. **(B)** Análise de Western blot e densitometria dos níveis de ciclina no fígado de camundongos WT. A coloração de Ponceau S foi usada para normalizar o carregamento. Os dados representam médias ± SD (Two-Way ANOVA: * $p < 0,05$; *** $p < 0.001$; $n = 3$).

Estudos anteriores já demonstraram que a proliferação dos hepatócitos contribui para a regeneração do fígado após PHx (MICHALOPOULOS, 2013). Tendo isso em vista, avaliamos através de imunofluorescência a presença de células positivas para Ki67, uma proteína expressa nas fases G1 a M do ciclo celular (MILLER et al., 2018), a fim de estimar a proliferação celular do tecido. Fomos capazes de observar que ambos os grupos submetidos à PHx positivaram para Ki67, contudo, ainda se faz necessário realizar a contagem das células positivas a fim de comparar os grupos a nível estatístico.

Outra proteína analisada foi a ciclina D1 que, quando fosforilada, libera o fator de transcrição E2F que progride a célula da fase G1 para S do ciclo celular. Estudos demonstraram Parkin como um importante coordenador da renovação da ciclina na fase G1/S (BARTEK; HODNY, 2014). Desse modo, a presença de Parkin regula negativamente a expressão de ciclina D1 (YEO et al., 2012), dados que corroboram com o observado por meio de Western Blotting. Os animais pertencentes ao grupo PHx + HMB, os quais apresentaram um menor conteúdo de Parkin, possuíram níveis significativamente maiores de ciclina quando comparados ao grupo PHx. A partir disso hipotetizamos que a suplementação com HMB pode estar acelerando a progressão dos hepatócitos no ciclo celular.

CONCLUSÃO

Nossos resultados parecem indicar que o HMB pode modular as vias de mitofagia e autofagia, além de atuar na capacidade regenerativa do fígado. No entanto, ainda precisamos entender se essa relação entre as vias analisadas impacta positivamente no processo de regeneração hepática.

BIBLIOGRAFIA

BAPTISTA, Igor L. *et al.* Leucine and HMB differentially modulate proteasome system in skeletal muscle under different sarcopenic conditions. **PloS one**, [*S.l.*], v. 8, n. 10, out. 2013. ISSN 1932-6203. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076752. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124592/. Acesso em: 11 abr 2022.

BARTEK, Jiri; HODNY, Zdenek. PARK2 orchestrates cyclins to avoid cancer. **Nature genetics,** [*S.l.*], v. 46, n. 6, p. 527-528, jun 2014. ISSN 1546-1718. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.2992. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24866187/. Acesso em: 27 jul 2022.

GIRÓN, María D. *et al.* β-Hydroxy-β-methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. **PloS one**, [*S. l.*], v. 10, n. 2, fev. 2015. DOI: http://doi.org/10.1371/journal.pone.0117520. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25658432/. Acesso em: 04 abr 2022.

KAMIYAMA, Y; OZAWA, K; HONJO I. Changes in mitochondrial phosphorylative activity and adenylate energy charge of regenerating rabbit liver. **Journal of biochemistry,** *[S.l]*, v. 80, n. 4, p. 875-881, out 1976. ISSN 0021-924X. DOI: https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131350. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1010850. Acesso em: 06 abr 2022.

LI, Deming *et al*. Delayed Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Aged Nos2 Knockout Mice. **Cell journal,** [*S.l.*], v. 19, n. 2, p. 218-230, jul-set 2017. ISSN 2228-5806. DOI: https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4878. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28670514. Acesso em: 20 abr 2022.

LIU, Wei *et al*. Weighted Gene Coexpression Network Analysis in Mouse Livers following Ischemia-Reperfusion and Extensive Hepatectomy. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, *[S.l]*, v. 2021, dez 2021. ISSN 1741-427X. DOI: https://doi.org/10.1155/2021/3897715. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35003298. Acesso em: 03 abr 2022.

NGUYEN, Thanh N.; PADMAN, Benjamin S.; LAZAROU, Michael. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. **Trends in cell biology,** *[S.l]*, v. 26, n. 10, p. 733-744, out 2016. ISSN 1879-3088. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27291334. Acesso em: 22 abr 2022.

MICHALOPOULOS, George K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. **Comprehensive Physiology,** *[S.l]*, v. 3, n. 1, p. 485-513, jan 2013. ISSN 2040-4603. DOI: https://doi.org/10.1002/cphy.c120014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720294. Acesso em: 01 abr 2022.

MILLER, Iain *et al.* Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. Cell Reports, *[S.l]*, v. 24, n. 5, p. 1105-1112, jul 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067968/. Acesso em: 27 jul 2022.

MITCHELL, Claudia; WILLENBRING, Holger. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. **Nature protocols**, *[S.l]*, v. 3, n. 7, p. 1167–117, jun. 2008. ISSN 1750-2799. DOI: https://doi.org/10.1038/nprot.2008.80. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600221. Acesso em: 12 abr 2022.

MOHAN, Divya *et al*. Evaluation of Mesenchymal Stem Cells with Conditioned Media and m-EGF for Regeneration of Liver Tissue After Partial Hepatectomy in Wistar Rats. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology,** *[S.l]*, v. 55, n. 6, p. 739-760, nov. 2021. ISSN 1421-9778. DOI: https://doi.org/10.33594/000000473. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34816679. Acesso em: 01 abr 2022.

REHMAN, Hasibur *et al.* NIM811 prevents mitochondrial dysfunction, attenuates liver injury, and stimulates liver regeneration after massive hepatectomy. **Transplantation,** *[S.l]*, v. 91, n. 4, p. 406-412, fev 2011. ISSN 1534-6080. DOI: https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318204bdb2. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131897. Acesso em: 06 abr 2022.

SMITH, Helen J.; MUKERJI, Pradip; TISDALE, Michael J. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by {beta}-hydroxy-{beta}-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. **Cancer research**, [*S. l.*], v. 65, n. 1, p. 277-283, jan. 2005. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15665304/. Acesso em: 04 abr 2022.

SPRINGER, Maya Z.; MACLEOD, Kay F. In Brief: Mitophagy: mechanisms and role in human disease. **The Journal of pathology,** *[S.l]*, v. 240, n. 3, p. 253-255, nov 2016. ISSN 1096-9896. DOI: https://doi.org/10.1002/path.4774. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27453450. Acesso em: 07 abr 2022.

YAO, Calvin W.S. et al. Parkin Pathway Activation Mitigates Glioma Cell Proliferation and Predicts Patient Survival. **Cancer Research**, *[S.l]*, v. 72, n. 10, p. 2543-2553, mai 2012. DOI: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3060. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22431710/. Acesso em: 27 jul. 2022.

ZANCHI, Nelo E. et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. **Amino acids**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 1015-1025, abr. 2011. DOI: http://doi.org/10.1007/s00726-010-0678-0. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20607321/. Acesso em: 04 abr 2022.