

AVALIAÇÃO DA COMUNICAÇÃO ENTRE HEPATÓCITOS E ADIPÓCITOS ATRAVÉS DA SECREÇÃO DE VLDL E MIR-122 EM MODELO DE ESTEATOSE HEPÁTICA *IN VITRO*

Palavras-Chave: MIR-122, MASLD, VLDL

Autoras:

MARIA LAURA DELATORRE MALVEZZI, LABDIME – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. ADRIANA SOUZA TORSONI (orientadora), LABDIME - UNICAMP

Me. CAROLINA PANZARIN (coorientadora), LABDIME - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A esteatose hepática é a doença do fígado mais prevalente na população e é caracterizada por um acúmulo excessivo de lipídios, acima de 5% no interior dos hepatócitos. A esteatose hepática pode evoluir para esteatohepatite, cirrose, fibrose e, se não tratada, pode acarretar no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. A doença hepática gordurosa associada a disfunção metabólica (MASLD), antes denominada de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) afeta 20 a 30% da população mundial segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia. É diagnosticada pela presença de esteatose hepática e mais um dos seguintes itens: perímetro da cintura (acima de 94 cm em homens e acima de 80 cm em mulheres), hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, fração de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) baixa, glicemia elevada, hemoglobina glicada alta, diabetes tipo 2. Os fatores de risco para a MASLD são síndrome metabólica (SM), diabetes tipo 2 (DM2), hiperlipidemia (SALVOZA et al., 2016) e obesidade, sendo este último o fator de risco mais comum (HARRIS et al., 2019).

Cada vez mais a obesidade apresenta uma íntima relação com alterações hepáticas. Younossi e colaboradores (2016) demonstraram que, dentre os adultos com MASLD, 51,34% apresentavam obesidade. Ainda não é tão esclarecido o mecanismo pelo qual a obesidade está associada a patogênese da MASLD, entretanto, existem estudos que mostram que essa relação possa ser uma consequência do “crosstalk” desregulado entre órgãos extra-hepáticos e o fígado na obesidade (WANG et al., 2022). Na patogênese da MASLD ocorre um aumento do armazenamento ectópico de lipídios, que pode ser ocasionado pelo maior aporte dietético de lipídios, pela síntese exacerbada de ácidos graxos e triglicérides (TG) e pelo aumento da lipólise do tecido adiposo, alcançando o fígado e ocasionando seu armazenamento (PETTA et al., 2016). Estudos recentes demonstraram o aumento da secreção de VLDL (lipoproteína de muita baixa densidade) nos estágios iniciais da MASLD, como um mecanismo de compensação para conter o acúmulo hepático de lipídeo, porém esta resposta não foi suficiente para frear a doença (PANZARIN et al., 2022; NASSIR, 2022). Além do aumento de VLDL na circulação em modelos de MASLD, estudos vêm demonstrando que os níveis séricos de microRNAs (miRNAs), como miR-122, também estão aumentados (SALVOZA et al., 2016, ATIC et al., 2023, LI, Y.-J. et al., 2024). Um estudo *in vitro* demonstrou uma diminuição de miR-122 em linhagens celulares de hepatócitos humanos e de camundongos tratadas com ácidos graxos saturados (SIMINO et al., 2017), possivelmente decorrente de um aumento na secreção desse miRNA.

Os miRNAs são RNAs não codificantes e têm a função de regular a expressão gênica a nível pós-transcricional, principalmente através da repressão da tradução de mRNAs alvos (SHANG et al., 2023). O miR-122 é um microRNA específico do fígado e parece estar alterado em certas condições patológicas. Salvoza e colaboradores (2016) demonstraram que os níveis de miR-122 na circulação de pacientes com MASLD estavam significativamente aumentados em comparação com pacientes saudáveis, entretanto, em pacientes com cirrose hepática encontravam-se diminuídos. Segundo

alguns autores, os miRNAs como o miR-122 podem estar regulados positivamente ou negativamente a depender da gravidade da doença, sendo vistos como potenciais biomarcadores de patologias quando identificados na circulação sanguínea (SALVOZA et al., 2016, ATIC et al., 2023; CARVALHO et al., 2023; LI, Y.-J. et al., 2024). Os miRNAs circulam de forma livre no organismo, incorporados a vesículas extracelulares (como exossomos) ou incorporados a lipoproteínas, como a lipoproteína de alta densidade (HDL) e VLDL, esta última sendo ainda pouco estudada (WILLEIT et al., 2017).

A compreensão da relação entre os mecanismos de transporte de miRNAs e sua função nos tecidos alvos não é totalmente esclarecida e ainda existe muita divergência na literatura (FLORIJN et al., 2019; WILLEIT et al., 2017). Diante disso, é desconhecido se as VLDLs são capazes de transportar miR-122 e contribuir para a comunicação entre hepatócitos e adipócitos em um cenário de MASLD. Assim, nossa hipótese é a de que, com a sobrecarga lipídica nos hepatócitos, há um maior efluxo de VLDL que pode carrear miR-122 até os adipócitos e induzir o remodelamento deste tecido, através do aumento da adipogênese, lipogênese e inflamação. Portanto, o objetivo deste projeto consiste em avaliar os efeitos da secreção de VLDL e miR-122 hepáticos sobre o remodelamento de adipócitos em modelo de esteatose *in vitro*.

METODOLOGIA:

Linhagens celulares

Para os experimentos *in vitro* foi utilizada a linhagem celular de hepatócitos Hepa1c1c7 (HEPA, ATCC® CRL-2026™), derivada de carcinoma hepatocelular de camundongo. As células HEPA foram mantidas em meio de cultura a-MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de P/S (Penicilina e Streptozotocina). Também foi utilizada a linhagem de células 3T3-L1 (ATCC® CL-173™), derivada de fibroblasto de camundongo que, em condições apropriadas, se diferenciam em adipócitos maduros. As células foram mantidas em meio DMEM com 10% SFB e 1% de P/S. Para a diferenciação dos adipócitos foi utilizado meio DMEM completo (10% de SFB e 1% de P/S), suplementado com 1uM dexametasona, 0,5 mM metilisobutil-xantina (IBMX) e 10 ug/mL insulina durante 3 dias e mais 3 dias com meio DMEM + 10 ug/mL de insulina. Após esse período de diferenciação, confirmado pela presença de gordura (aproximadamente após 10 dias), o meio foi substituído por meio DMEM completo.

Tratamento de hepatócitos com NEFA

Primeiramente, para mimetizar uma sobrecarga lipídica como a que ocorre na esteatose hepática, as células HEPA foram plaqueadas e tratadas com NEFA, que consiste em um mix de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados que foram identificados em excesso na circulação de camundongos com obesidade (Tabela 1, Liu et al, 2015). O tratamento consistiu em um *time course* de 6, 12 e 24 horas com NEFA (500uM) diluído em NaOH e albumina; o grupo controle (C) foi tratado com NaOH e albumina nas mesmas proporções. Em seguida, as células e o meio de cultura foram coletados para posteriores análises.

Tabela 1. Composição do mix de ácidos graxos não esterificados (NEFA)

Ácido graxo	Nomenclatura	% no mix	Classificação
Palmítico	16:0	16	Saturado
Esteárico	18:0	32	Saturado
Oleico	18:1	26	Monoinsaturado
Linoleico	18:2	18	Poliinsaturado
Araquidônico	20:4	8	Poliinsaturado
Total		100	

Saturado (48%); Monoinsaturado (26%); Polinsaturado (26%).

Inibição da produção de VLDL em hepatócitos *in vitro*

Em seguida, células HEPA foram tratadas com dicloridrato de dimaprit (Tocris® #0506) a fim de inibir a secreção de VLDL. Os hepatócitos foram tratados com o veículo (NaOH) como controle; NEFA (500uM), e NEFA (500uM) combinado com dimaprit (200uM) por 12 horas. O dimaprit foi administrado 4h e 8h após o tratamento com NEFA.

Tratamento de 3T3-L1 com meio condicionado de hepatócitos

Após identificar o tempo de exposição com NEFA em que houve aumento de miR-122 no meio extracelular da HEPA, foi utilizado o meio condicionado (CM) destas células para o tratamento de 3T3L-1 diferenciadas em adipócitos maduros. Como controle, foi utilizado o CM de hepatócitos sem NEFA. Após 6 horas de exposição com o CM, as células foram coletadas para análise de miR-122 por RT-PCR.

Coloração com Oil red- O

As células HEPA tratadas com NEFA e C foram fixadas com paraformaldeído 4% diluído em PBS e coradas por 10 minutos com Oil Red-O. Após lavagem com PBS, as imagens foram capturadas com um microscópio ótico.

Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A extração de pequenos RNAs com RNAzol RT e BD (MRC). O kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (applied biosystems – Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para transcrição dos RNAs em cDNA. Para avaliar a expressão gênica de miR-122, U6snRNA foi utilizado como controle endógeno para miRNAs extraídos das células e miR-39 como controle exógeno para o meio celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ao avaliar a modulação dos níveis de miR-122 frente à sobrecarga lipídica, foi observado que a expressão de miR-122 hepático foi maior no tratamento com NEFA 6h em comparação ao grupo C e foi observada uma diminuição da expressão de miR-122 com NEFA por 24 horas em relação ao NEFA 6h (Fig. 1A). No meio de cultura, foi observada uma maior expressão de miR-122 no tratamento com NEFA por 12 horas em relação ao grupo C, além de uma tendência de aumento de expressão no grupo tratado com NEFA por 6 horas em comparação ao grupo C (Fig. 1B). Esses resultados corroboram os dados da literatura em que é observado um aumento de miR-122 em pessoas com diagnóstico de MASLD (SALVOZA et al., 2016, ATIC et al., 2023, LI, Y.-J. et al., 2024). A fim de confirmar o acúmulo de lipídios, uma análise Oil Red-O demonstrou uma maior presença de gotículas lipídicas nas células HEPA com tratamento NEFA 12h em relação ao grupo C (Fig. 2A-B).

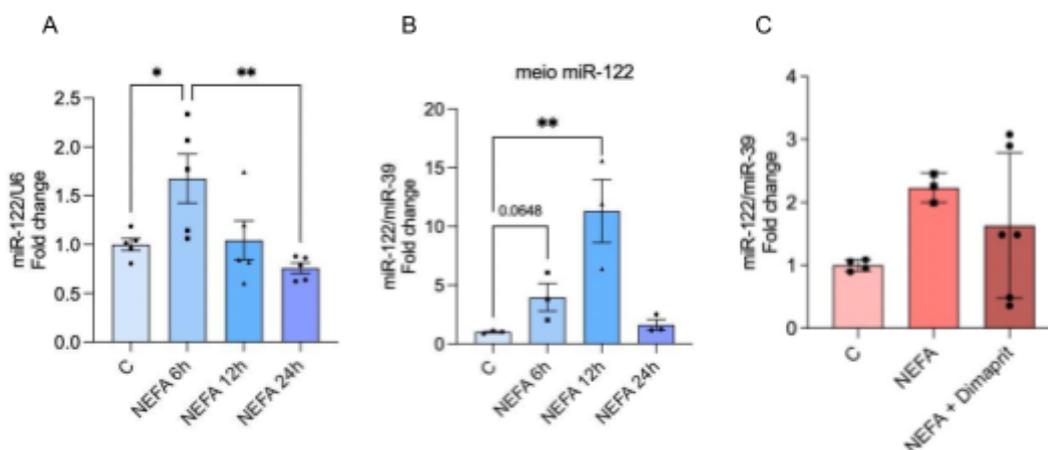


Figura 1. Análise da expressão de miR-122 por qRT-PCR nos grupos C, NEFA 6h, NEFA 24h nas células Hepa1c1c7 (A) e no meio de cultura (B); análise da expressão de miR-122 no meio celular por RT-PCR nos grupos controle (CT),

NEFA, NEFA + Dimaprit (C). One-way ANOVA foi aplicado seguido por pos-hoc Tukey para comparação de média entre os grupos. *indica diferença de $p < 0,05$; **indica diferença de $p < 0,01$.

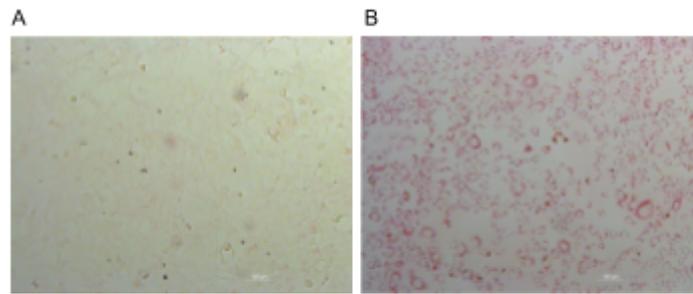


Figura 2. Coloração Oil Red-O nas células Hepa1c1c7 tratadas com meio controle (A) e NEFA por 12 horas (B).

Para investigar se o aumento da exportação de miR-122 em hepatócitos com sobrecarga lipídica ocorre por meio da secreção de VLDL, avaliamos os níveis de miR-122 no meio celular da HEPA tratadas com NEFA combinado com Dimaprit. Como resultado, esperávamos que houvesse uma diminuição dos níveis de miR-122 no meio extracelular comparado com o grupo NEFA, entretanto essa diferença não foi vista. O dimaprit age como agonista de receptores H2, modulando o nível de cálcio intracelular e AMPc, ou seja, não age especificamente na secreção de VLDL. Além disso, esta substância foi testada com esta finalidade apenas em estudos *in vivo*, o que dificultou na determinação da concentração e tempo de exposição ideal (NIKFAR; RASOULI, 2020) (**Fig. 1C**). Portanto, estamos padronizando a substituição de dimaprit por siRNA para ApoB, proteína chave na maturação de VLDL.

Para avaliar a comunicação entre hepatócitos e adipócitos a partir dos níveis de miR-122, as células 3T3-L1 foram tratadas com CM de HEPA tratadas com NEFA (CM NEFA) ou controle (CM C) por 6 horas, mas nenhuma diferença foi detectada nos níveis de miR-122 (**Fig. 3**).

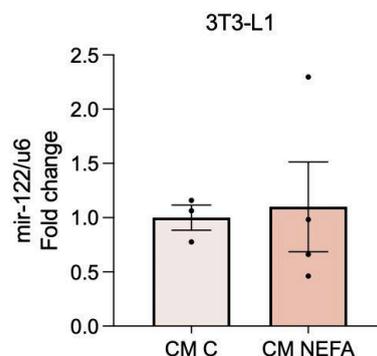


Figura 3. Análise da expressão de miR-122 nas células 3T3-L1 por qRT-PCR nos grupos CM C e CM NEFA. Test-t foi aplicado seguido por pos-hoc Tukey para comparação de média entre os grupos.

CONCLUSÕES:

Os níveis de miR-122 em hepatócitos frente a sobrecarga lipídica respondem de forma semelhante ao encontrado em estudos *in vivo*, caracterizado pelo aumento significativo no início e diminuição após o agravamento da doença em comparação com indivíduos saudáveis. A inibição da secreção de VLDL em hepatócitos não foi efetiva com dimaprit e será reavaliada com a utilização de siRNA de ApoB, uma proteína chave na maturação de VLDL.

BIBLIOGRAFIA:

ATIC, A. I., et al. Circulating miRNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Physiology**. v. 324, n. 2, p. C588–C602, 2023.

CARVALHO, G. B., et al. Association between circulating micro-ribonucleic acids and metabolic syndrome in older adults from a population-based study. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 58, p. 320–325, 2023.

HARRIS, Rebecca et al. Obesity is the most common risk factor for chronic liver disease: results from a risk stratification pathway using transient elastography. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 114, n. 11, p. 1744-1752, 2019.

LI, Y.-J., et al. Circulating microRNA expression and nonalcoholic fatty liver disease in adolescents with severe obesity. **World Journal of Gastroenterology**, p. 332–345, v. 30, n. 4, 2024.

Liu TW, Heden TD, Matthew Morris E, Fritsche KL, Vieira-Potter VJ, Thyfault JP. High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: Implications for in Vitro Studies. *Lipids*. 2015;50(10):997–1008.

NASSIR, F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 824, v. 12, n. 6, p. 824, 13 jun. 2022.

NIKFAR, A.; RASOULI, M. Hypolipemic effects of histamine is due to inhibition of VLDL secretion from the liver: involvement of both H1 and H2-receptors. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1782436>, 2020.

PANZARIN, Carolina et al. Hepatic microRNA modulation might be an early event to non-alcoholic fatty liver disease development driven by high-fat diet in male mice. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 4, p. 2655-2666, 2022.

PETTA, Salvatore et al. Pathophysiology of non alcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, p. 2082, 2016.

SALVOZA, Noel C. et al. Association of circulating serum miR-34a and miR-122 with dyslipidemia among patients with non-alcoholic fatty liver disease. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153497, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Esteatose hepática. Sociedade Brasileira de Hepatologia. Disponível em: <https://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>. Acesso em: 21 jul. 2025.

SHANG, Renfu et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. **Nature Reviews Genetics**, p. 816-833, 2023.

SIMINO, L.; FANTE, T. de; FONTANA, M. F.; BORGES, F. O.; TORSONI, M. A.; MILANSKI, M.; VELLOSO, L. A.; TORSONI, A. S. Lipid overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote metabolic impairment after new challenge to high-fat diet. *Nutrition & Metabolism*, v. 14, n. 16, p. 1–15, 2017.

WANG, Ya-Di et al. New insight of obesity-associated NAFLD: Dysregulated “crosstalk” between multi-organ and the liver?. **Genes & Diseases**, 2022.

WILLEIT, Peter et al. Circulating microRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 347-357, 2017.

YOUNOSSI, Z. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, 1 jul. 2016.