

Efeitos da gordura interesterificada ou parcialmente hidrogenada na modulação de miRNAs e seus alvos envolvidos com o metabolismo lipídico hepático em camundongos

Palavras-Chave: Interesterificação, hidrogenação, microRNA.

Arthur Agostini Birck, FCA, UNICAMP

Me. Carolina Panzarin, FCA, UNICAMP (Coorientadora)

Prof.^(a) Dr.^(a) Marciane Milanski Ferreira, FCA, UNICAMP (Orientadora)

INTRODUÇÃO:

Os efeitos deletérios dos ácidos graxos (AGs) *trans* favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e mortalidade. Isso ocorre, pois os AGs *trans* são estruturalmente similares aos AGs saturados. Dessa forma, a interesterificação de óleos vegetais se tornou a alternativa mais eficiente e vantajosa para a indústria (RIBEIRO et al., 2007).

O processo de interesterificação promove a hidrólise das ligações ésteres de triacilglicerol (TG) e, posteriormente, a distribuição aleatória da posição dos AGs *sn*-1, 2 e 3 na molécula de glicerol (RIBEIRO et al., 2007). Como consequência, há um aumento de AGs saturados na posição *sn*-2 do TG, conformação que contribui para maior absorção destes AGs, que já foram associados a distúrbios metabólicos, como o aumento do depósito de lipídios no fígado.

Diversos estudos já demonstraram efeitos deletérios da ingestão de gordura

interesterificada em camundongos, como aumento do ganho de peso, alterações na homeostase glicêmica e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático e adiposo branco (MIYAMOTO et al., 2020).

Mais recente, foi identificado que o excesso de ácidos graxos saturados levou a alterações de microRNAs (miRNAs) que tem como alvos mRNAs relacionados ao metabolismo lipídico hepático. O tratamento de células hepáticas com palmitato levou a uma diminuição dos níveis de miR-122 e a um aumento de miR-370 (SIMINO et al., 2017).

Dessa forma, os miRNAs são moléculas de RNA não codificantes, considerados moduladores epigenéticos por reprimirem a tradução proteica (CUI et al., 2017). O miRNA mais abundante no fígado é o miR-122. Ele está relacionado com o aumento do risco de obesidade e resistência à insulina em jovens adultos, assim como o agravamento da esteatose hepática. Em estágios iniciais de

esteatose hepática, os níveis de miR-122 estão aumentados, porém com a evolução para esteatohepatite os níveis diminuem (HOCHREUTER et al., 2022). Estudos demonstram que elevados níveis de miR-122 diminui o conteúdo proteico e de transcritos de enzimas envolvidas com a síntese de TG, como a α 1-acilglicerol-3-fosfato Aciltransferase (AGPAT1) e com a síntese de novo de AG, como a Acetil-Coa carboxilase α (ACCA) (QIANG et al., 2018).

Assim como o miR-122, o miR-370 e o Let-7 também regulam o metabolismo lipídico hepático. Os níveis de miR-370 e de Let-7 se elevam na esteatose hepática e se mantêm até a esteatohepatite ou cirrose. Nesse contexto, Let-7 tem como alvo importante o gene *Prkaa2*, que codifica AMPK α 2, um importante sensor energético responsável por ativar vias catabólicas. Níveis elevados de Let-7 regulam negativamente *Prkaa2*, que então pode reprimir a β -oxidação (SIMINO et al., 2021). Já o miR-370 parece regular a expressão de miR-122 e também o gene carnitina palmitoiltransferase 1 α (*Cpt1a*), responsável pelo transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria para o início da β -oxidação (SIMINO et al., 2017).

Desse modo, faz-se necessário entender se as alterações promovidas pela gordura interesterificada estão relacionadas com a modulação de miRNAs e seus alvos envolvidos no metabolismo lipídico hepático de camundongos, algo ainda não explorado na literatura científica.

METODOLOGIA:

Animais

O estudo, aprovado pelo Comitê de Ética da UNICAMP (nº 6128-1/2022), utilizou 26 camundongos machos Swiss divididos em três grupos alimentados por um período de 8 semanas com dietas normocalóricas e normolipídicas a base de óleo de soja (SOJA), óleo de soja interesterificado (INTER) e óleo de soja parcialmente hidrogenado (TRANS).

Análise de miRNA e mRNAs por PCR em Tempo Real

Foi realizada a técnica de PCR-RT para a avaliação dos níveis de miRNAs, como também a avaliação de seus mRNAs alvos. Foi conduzida a extração de miRNA e RNA com RNazol RT (MRC) de acordo com as recomendações do fabricante. O kit TaqManTM MicroRNA *Reverse Transcription* (*Applied Biosystems* – Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para conversão de RNAs em cDNA. A análise da expressão gênica foi feita por Real time PCR, na plataforma ABI 7500 FAST e foram expressos como valores relativos determinados pelo método de ciclo limiar comparativo (Ct) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle endógeno, U6snRNA e Actb foram utilizados para miRNA e mRNA, respectivamente.

Western Blotting

Foi realizada a técnica de Western Blotting para avaliação do conteúdo proteico de alvos dos miRNAs analisados por PCR-RT. Primeiramente foi realizada a extração de proteínas com tampão contendo triton X-100, seguido pela quantificação proteica pelo método de Biureto. As amostras contendo 100ug de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12% para separação por

eletroforese (SDS- PAGE), e transferidas pelo método molhado para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio (5% de albumina; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 2 horas, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários e secundários específicos. Como controle endógeno, foi utilizado GAPDH para cálculo da quantificação dos níveis proteicos. O sinal foi detectado através de quimioluminescência e as bandas identificadas no fotodocumentador para a captura de imagens de géis de eletroforese foram quantificadas através de densitometria óptica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Figura 1

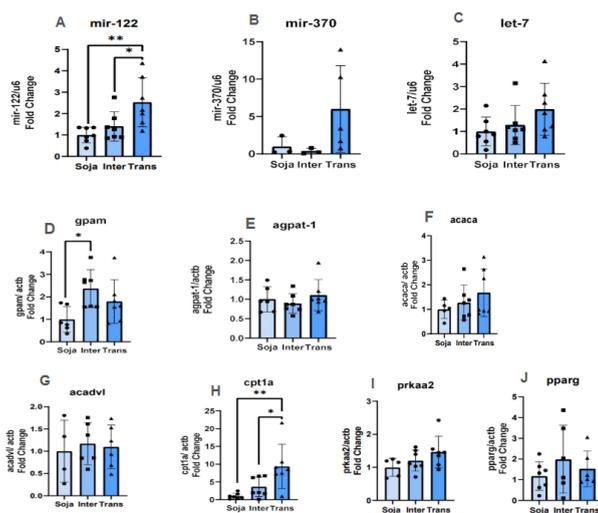


Figura 1- Níveis de miR-122 (A), miR-370 (B), Let-7 (C), Gpam (D), Agpat-1 (E) e Acaca (F), Acadvl (G), Cpt1 α (H), Ppar-y (I) e Prkaa2 (J) no tecido hepático de camundongos Swiss alimentados com dietas normocalóricas feitas a base de óleo de soja (SOJA), gordura interesterificada (INTER) ou com ácido graxos trans (TRANS) por 8 semanas, analisados por PCR Real Time. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. n = 3-7 animais/grupo p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)

Primeiramente, foi investigado se o consumo de ácidos graxos interesterificados e trans poderia levar a alterações na modulação de miRNAs importantes do tecido hepático. Diante disso, os níveis de miR-122 (Fig.1 A),

estavam aumentados no grupo TRANS em relação ao SOJA (p=0,005) e em relação ao INTER (p=0,04). Este resultado é semelhante ao encontrado em modelos de esteatose hepática simples, no qual há um aumento dos níveis de miR-122 em pacientes com acúmulo ectópico de gordura em comparação com indivíduos saudáveis (HOCHREUTER et al., 2022). No entanto, não houve alteração na expressão de miR-370 e Let-7 (Fig.1 B-C) nos grupos analisados.

Além disso, não foi observado relação entre aumento da expressão de miR-122 no TRANS com a diminuição dos níveis dos alvos analisados, *Gpam* (Fig.1 D) e *Agpat-1* (Fig.1 E). Possivelmente, a modulação de miR-122 possa ser uma alteração inicial ao desenvolvimento de doenças hepáticas.

Nos marcadores de lipogênese, a expressão de *Acaca* (Fig.1 F) não foi diferente, assim como a expressão de *Agpat1*. Entretanto, a expressão de *Gpam*, alvo predito de miR-122 e envolvido com a síntese de triacilglicerol, aumentou no INTER em comparação ao SOJA (p=0,021). Este resultado reforça análises anteriores ainda não publicadas em que foi visto o aumento de *Srebp*, *Ppar-y* e *Fas* no grupo INTER.

O marcador de oxidação lipídica *Acadvl* (Fig.1 G) não apresentou diferença entre os grupos. Em relação ao SOJA, os níveis de *Cpt1 α* (Fig.1 H), enzima relacionada com a β -oxidação, estavam aumentados no TRANS (p=0,002), dado que corrobora com análises ainda não publicadas do grupo em que foi visto o aumento de *Cpt1 α* e *Pgc1 α* no mesmo grupo.

A expressão gênica de *Prkaa2* (Fig.1 I), que codifica a subunidade $\alpha 2$ da AMPK, enzima que pode ser ativada por fosforilação (P-AMPK), e a expressão de *Ppar- γ* (Fig.1 J), envolvido com acúmulo de gordura hepática, não foram diferentes entre os grupos.

Outros resultados interessantes acerca da interesterificação são encontrados quando os camundongos são expostos em um tempo de experimentação maior e com uma ingestão de gorduras com maior teor de ácido graxo saturado, como o óleo de palma. Portanto, estes resultados reforçam a preocupação acerca da ingestão de gordura parcialmente hidrogenada, como também de gordura interesterificada, mesmo com a exposição ao consumo normocalórico e normolipídico.

De forma concordante com os níveis de transcritos analisados, o conteúdo proteico de P-AMPK (Fig.2 A), ACADVL (Fig.2 B) e AGPAT-1 (C) não tiveram diferenças significativas entre os grupos.

O conteúdo proteico de Ppar- γ (D) foi significativamente maior no grupo INTER em comparação ao grupo controle (SOJA), apesar da ausência de diferença nos níveis de mRNA. Esta proteína é um receptor nuclear que está envolvido com a superexpressão de genes relacionados ao armazenamento de gordura e à lipogênese, como *Gpam*, que estava mais expressa no grupo INTER. Portanto, este dado sugere que o consumo de gordura interesterificada pode levar a um aumento da síntese de TG no tecido hepático.

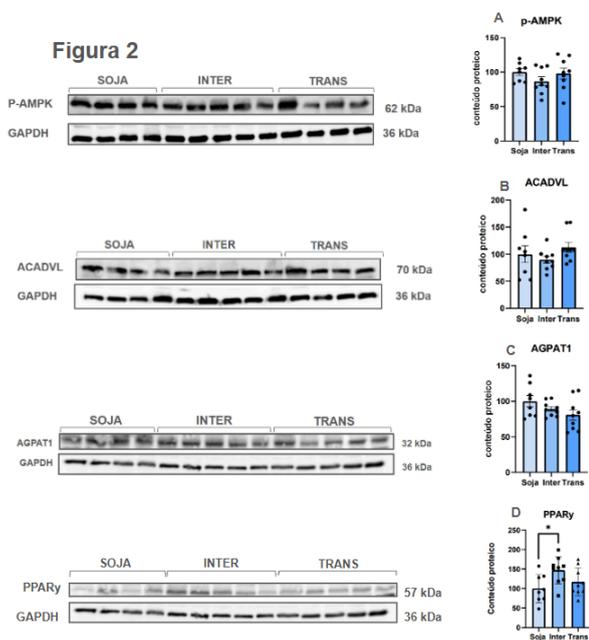


Figura 2- Conteúdo proteico de P-AMPK (A), ACADVL (B), AGPAT-1 (C) e PPAR γ (D) por Western Blotting no tecido hepático de camundongos Swiss alimentados por 8 semanas com dieta feita com óleo de soja (SOJA), dieta com gordura interesterificada (INTER) e dieta rica em ácidos graxos trans (TRANS). Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. n= 8-9 animais/grupo. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)

CONCLUSÕES:

O consumo de uma alimentação normolipídica a base de óleo de soja parcialmente hidrogenado levou ao aumento dos níveis de miR-122, porém este aumento não foi associado com a regulação negativa de seus alvos, tanto em relação ao níveis de mRNAs, quanto ao conteúdo proteico destes.

Entretanto, foi observado alterações no metabolismo lipídico hepático que possibilitaram a investigação, como o aumento nos níveis de marcadores relacionados com a β -oxidação no grupo TRANS e o aumento nos níveis de marcadores de lipogênese no grupo INTER, dados que corroboram com análises anteriores.

O aumento de miR-122 no grupo TRANS pode ser um indício de que há um

maior acúmulo de lipídeos hepáticos, já que níveis aumentados de miR-122 ocorre em situações de esteatose hepática simples.

Dados não publicados do escore histológico de esteatose, mostram que o grupo TRANS estava com nível aumentado em relação ao SOJA e INTER, demonstrando que houve mudanças morfológicas na estrutura do hepatócito.

Embora os níveis dos marcadores de lipogênese estejam aumentados no INTER, não há evidências de maior acúmulo lipídico hepático no escore histológico e não há aumento de peso nesse mesmo tempo de experimentação (8 semanas), em análises já feitas pelo grupo.

Pode-se hipotetizar que, por ser uma dieta normocalórica, os efeitos metabólicos ainda são iniciais. De forma concordante com a hipótese, foi visto anteriormente que o consumo de gordura interesterificada por 16 semanas levou a um aumento de peso significativo em relação ao grupo SOJA (MIYAMOTO et al., 2018), evidenciando que outros efeitos podem demorar mais semanas para serem vistos.

Mais análises são necessárias para complementar e explicar de forma mais aprofundada os achados apresentados acerca da interesterificação química e hidrogenação parcial de óleos e gorduras, visando, no futuro, a compreensão dos efeitos dessas gorduras na saúde da população humana.

BIBLIOGRAFIA

- CUI, J. et al. Nutrition, microRNAs, and Human Health. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 1, p. 105–112, 17 jan. 2017. Acesso em: 9 jan. 2024.
- HOCHREUTER, M. Y. et al. MicroRNAs in non-alcoholic fatty liver disease: Progress and perspectives. **Molecular Metabolism**, p. 101581, ago. 2022.
- MIYAMOTO, J. É. et al. Interesterified palm oil impairs glucose homeostasis and induces deleterious effects in liver of Swiss mice. **Metabolism**, v. 112, p. 154350, 1 nov. 2020.
- MIYAMOTO, J. É. et al. Interesterified soybean oil promotes weight gain, impaired glucose tolerance and increased liver cellular stress markers. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, p. 153–159, 1 set. 2018.
- QIANG, J. et al. High Fat Diet-Induced miR122 Regulates Lipid Metabolism and Fat Deposition in Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) Liver. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 5 out. 2018.
- RIBEIRO, A. P. B. et al. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química Nova**, v. 30, p. 1295–1300, 1 out. 2007. Acesso em: 9 jan. 2024.
- SIMINO, L. A. P. et al. MicroRNA Let-7 targets AMPK and impairs hepatic lipid metabolism in offspring of maternal obese pregnancies. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8980, 26 abr. 2021.
- SIMINO, P. et al. 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. 1, 20 fev. 2017.