

Avaliação dos níveis de miR-122 em exossomos plasmáticos e sua influência para o remodelamento do tecido adiposo de pacientes com obesidade e *in vitro*

Palavras-Chave: miR-122, Exossomos, Remodelamento

Autores(as):

Rhuan Thales de Almeida Martins, LABDIME - UNICAMP

Prof.^a Dr.^a. Adriana Souza Torsoni (orientadora), LABDIME - UNICAMP

Carolina Panzarin (coorientadora), LABDIME - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (MASLD) é definida pelo acúmulo de gordura no tecido hepático acima de 5% (Younossi et al., 2016). O acúmulo desses lipídios no interior dos hepatócitos é provocado pelo aumento da síntese *de novo* de lipídios a partir de nutrientes em excesso, do maior acúmulo de ácidos graxos (AG) proveniente da lipólise do tecido adiposo e o excesso de lipídios provenientes de uma dieta desbalanceada (Petta et al., 2016).

O desenvolvimento da MASLD envolve alterações no metabolismo hepático e tem-se destacado as alterações da modulação de miRNAs. Os miRNAs são moléculas de RNA de fita simples, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, que podem inibir a tradução por pareamento de bases com os mRNAs-alvos (Kim, V. N. (2005). Estudos apontam que os miRNAs podem ser liberados do tecido de origem para fluidos extracelulares, podendo atingir outros órgãos. Sendo assim, desempenham a função de biomarcadores de doenças pelos seus padrões em diferentes estados metabólicos, podendo ainda levar à comunicação e remodelamento do tecido alvo (Zhao et al, 2020). São conhecidas várias formas de transporte de miRNAs na circulação sanguínea, sendo algumas delas, encapsulados por vesículas extracelulares (EVs), uma família heterogênea de vesículas originadas a partir da rede endossômica ou da membrana plasmática, chamados de exossomos e microvesículas, respectivamente (Van Niel et al, 2018). Estudos recentes já identificaram níveis aumentados de miR-122 na circulação de pacientes com MASLD, porém ainda é pouco estudado as formas de transportes desses miRNAs (Zhao et al, 2020). O miR-122 é considerado um miRNA específico do fígado, e já foi demonstrado que ele foi capaz de se ligar e regular mRNAs relacionados com o metabolismo lipídico como α 1-acilglicerol-3-fosfato Aciltransferase (AGPAT1) e Proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), favorecendo o desenvolvimento da MASLD (Hsu et al., 2012; Yang et al., 2012).

Zhao e colaboradores (2020) investigaram que o transporte de miRNAs por EVs, incluindo miR-122, do fígado para o tecido adiposo, favoreceu o depósito de lipídios nos adipócitos. A comunicação entre fígado e tecido adiposo torna-se extremamente importante no contexto da obesidade, pelo papel importante destes tecidos no metabolismo lipídico e no armazenamento energético. Apesar dos esforços, na literatura ainda não há estudos que demonstrem a importância do miR-122 transportado por exossomos na comunicação entre o fígado e o tecido adiposo na MASLD. Nossa hipótese é de que os níveis de miR-122 estejam aumentados em exossomos de pacientes com obesidade e esteatose hepática, que podem ser captados pelos adipócitos e então levar ao remodelamento dessas células. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os níveis de miR-122 em exossomos e totais na circulação de pacientes com obesidade ou controles e investigar o envolvimento desse miRNA no remodelamento de adipócitos, por meio da modulação da expressão de miR-122 em modelo *in vitro*.

METODOLOGIA:

Casuística

Vinte pacientes com obesidade, grau II (IMC entre 35 e 39,9 kg/m²) ou grau III (IMC > 40 kg/m²), com indicação para cirurgia pelo Serviço de Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), foram selecionados para compor o grupo com obesidade (Grupo Ob). Para compor o grupo controle (C), foram selecionados vinte pacientes em cirurgias eletivas que não envolvessem doença hepática, como colecistectomia do mesmo hospital. O estudo foi conduzido de acordo com a Resolução Brasileira CNS nº 466/12 que ressalta salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes da pesquisa e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) sob protocolo CAAE: 44054421.7.0000.5404. Todos os participantes concordaram e receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Fragmentos do fígado, tecido adiposo visceral e subcutâneo e 15mL de sangue foram obtidos de pacientes adultos, maiores que 18 anos dos dois grupos mencionados.

Isolamento e Quantificação de Exossomos

Os exossomos foram isolados a partir do plasma dos pacientes utilizando o kit *SeraMir Exosome RNA Amplification* (System Biosciences®, Cat. Nº RA800A-1), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a extração de RNA para análise dos níveis de miR-122 por RT-PCR.

Experimentos *in vitro*

A linhagem celular 3T3-L1, doada gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando M. Simabuco (UNIFESP), foi mantida em meio de cultura para pré-adipócitos composto por DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e cultivada em até 70% de confluência.

Para diferenciação em adipócitos maduros, as células foram incubadas por 3 dias com o meio de diferenciação I, composto por DMEM suplementado com 10% de FBS, 1µM de dexametasona, 0,5mM de metilisobutilxantina (IBMX) e 1µg/ml de insulina. Em seguida, foi utilizado meio de diferenciação II, composto por DMEM suplementado com insulina 1µg/ml por mais 3 dias. Após esse período de diferenciação, confirmado pela observação de acúmulo de gordura (aproximadamente após 5 dias), o meio foi substituído por meio de manutenção de adipócitos, composto por DMEM suplementado com 10% de SFB e 1µg/ml de insulina.

As células 3T3-L1 diferenciadas foram transfectadas com mimético de miR-122 (mimic 10nM, mirVana Ambion ID MC11012) e controle negativo (CN - 10nM, mirVana Ambion ID 4464058) por 48h para avaliação do envolvimento de miR-122 com o remodelamento dos adipócitos (acúmulo de lipídios, e genes envolvidos com metabolismo de lipídios e inflamação).

Avaliação de conteúdo lipídico por *Oil-Red O*

Após a transfecção com o mimético de miR-122, as células foram utilizadas para análise de miR-122 por RT-PCR ou para avaliação de gotículas de lipídios por *Oil-Red*.

Coloração por *Oil-Red*

As células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Foi adicionada a solução de *Oil-Red* em cada *well* da placa para incubação por 10 minutos e posterior lavagem com água para retirar o excesso do corante. Para a visualização, foi adicionado PBS e um microscópio óptico foi utilizado.

Análise de miRNA e mRNAs por PCR em Tempo Real

Fragmentos de fígado e tecido adiposo visceral e subcutâneo foram coletados dos pacientes para avaliação da expressão de miR-122-5p. A linhagem celular 3T3-L1, após tratamentos específicos também foi utilizada para avaliação da expressão gênica de miR-122 e seus genes alvos envolvidos com o metabolismo lipídico e citocinas inflamatórias. A purificação dos miRNAs nas amostras em questão foi realizada utilizando o reagente RNeasy Lysis Buffer (MRC), de acordo com as orientações do fabricante. Para amostras de plasma e exossomos foi utilizado miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) ou RNeasy Lysis Buffer (MRC) para extração e purificação de miRNAs. TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para conversão de pequenos RNAs não-codificantes em cDNA. Os níveis de miR-122 foram determinados utilizando um kit para detecção por Real-Time PCR. U6snRNA foi utilizado como controle endógeno para miRNAs extraídos das células e miR-39 spike-in como controle exógeno para exossomos e plasma. Para avaliação da expressão de mRNA foi utilizado RPLP0 como controle endógeno. A análise da expressão gênica foi feita por Real time PCR, na plataforma ABI 7500 FAST e os dados obtidos foram expressos como valores relativos determinados pelo método de ciclo limiar comparativo (Ct) (2-ΔΔCt) de acordo com as recomendações do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Diversos estudos já demonstraram um aumento de miR-122 no plasma de pacientes com obesidade e/ou MASLD (Tobaruela-Resola *et al.*, 2024). Assim buscamos identificar se nossos resultados estavam condizentes com a literatura. Foi observado níveis de miR-122 aumentados no plasma de pacientes com obesidade em comparação ao grupo controle (Fig. 1A). Pelo fato do miR-122 ser produzido exclusivamente no tecido hepático (Lagos-Quintana *et al.*, 2002), possivelmente esteja acontecendo uma exportação do fígado para a circulação. Para entender se este aumento no plasma poderia ser decorrente do transporte por exossomos, estes foram isolados do plasma dos pacientes de ambos os grupos, utilizando o kit *SeraMir Exosome RNA Amplification* (System Biosciences®, Cat. Nº RA800A-1). Não foi identificada diferença estatística entre os grupos nos níveis de miR-122 em partículas de exossomos (Fig. 1B), sugerindo que, possivelmente, este aumento de miR-122 no plasma seja decorrente do transporte deste miRNA por outras partículas extracelulares, como lipoproteínas.

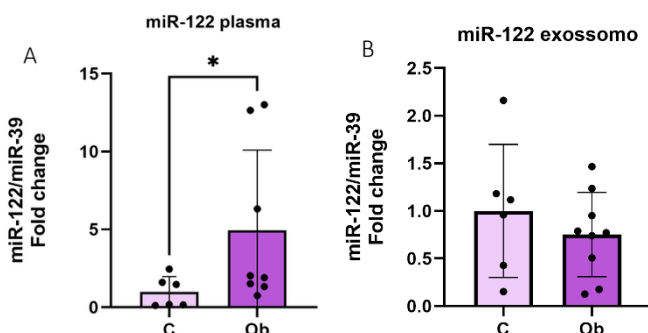


Figura 1. (A) Níveis de miR-122 detectados por PCR-RT no plasma de pacientes com obesidade e controle. (B) Níveis de miR-122 em exossomos de pacientes com obesidade e controle. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Foi realizado teste t para comparação entre os grupos. *indica a diferença estatística $p < 0,05$ identificada por teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

Com o aumento de miR-122 na circulação de pacientes, possivelmente este miRNA possa atingir outros tecidos e então contribuir para o fenótipo de obesidade. Como miR-122 pode regular de forma direta o metabolismo lipídico (Hu *et al.*, 2021), hipotetizamos que este possa atingir o tecido adiposo, por ter como função principal o estoque energético em forma de lipídios. Dessa forma, foi avaliado o remodelamento de adipócitos maduros frente a superexpressão de miR-122. Foi utilizada a linhagem celular 3T3-L1 diferenciada em adipócitos. Foi avaliado os níveis de miR-122 em 3 grupos com tempos de tratamento de 24h, 48h e 72h. Todos os tempos avaliados responderam com a superexpressão de miR-122, comparado com o controle, como esperado (Fig. 2A). Assim, foi escolhido o tempo de 48h para análise do remodelamento dos adipócitos, devido à sua utilização em estudos já publicados por nosso grupo (Simino *et al.*, 2023).

Em seguida, foram avaliados os níveis de mRNAs envolvidos com o metabolismo lipídico, inflamação e resposta à insulina nos adipócitos frente a superexpressão de miR-122. Foi identificado um aumento nos genes *Acaca* e *Scd1* com a utilização do mimético, sugerindo aumento da síntese de ácidos graxos nos adipócitos (Fig. 2B-C). Os níveis de *Pparg* e *Srebf1*, fatores de transcrição importantes para a adipogênese e diferenciação de adipócitos maduros (Josani; Kakar; Raha, 2021), apresentaram-se aumentados no grupo tratado com mimético de miR-122 comparados com o CN (Fig. 2D-E).

Genes envolvidos com o catabolismo de ácidos graxos, *Cpt1a* e *Prkaa2* (Fig. 2F-G) estavam aumentados no grupo tratado com mimético de miR-122, demonstrando um possível mecanismo contra regulatório para o acúmulo de lipídios. *Atp5b1*, responsável pela etapa inicial da biossíntese de fosfolipídios e triacilgliceróis, estava diminuída no grupo tratado com miR-122 (Fig. 2H), como esperado, pois já se sabe que miR-122 pode inibir a tradução da enzima AGPAT1, por ser um alvo direto (Lou *et al.*, 2022).

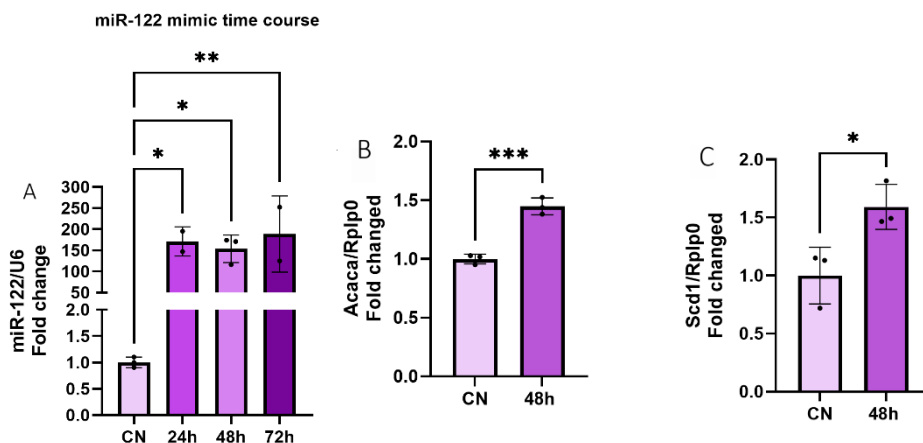
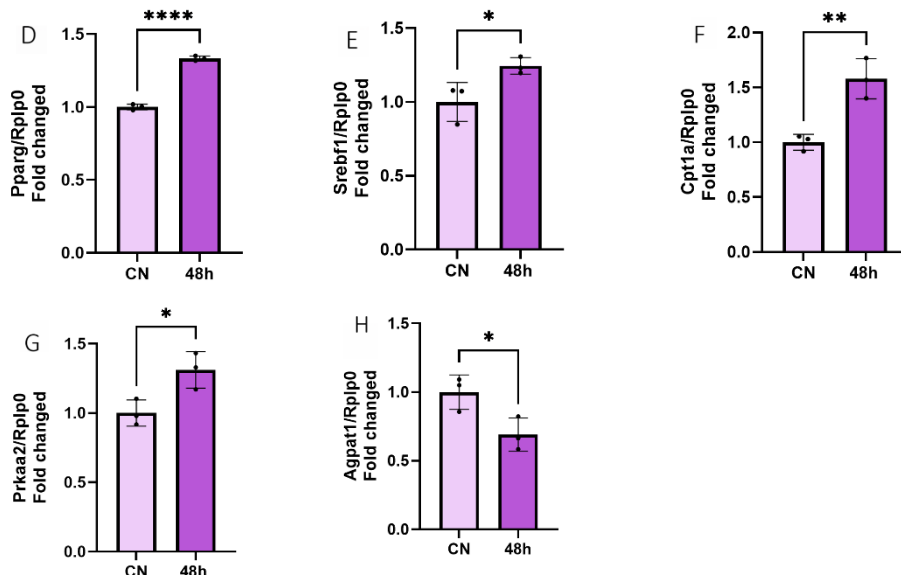


Figura 2. (A) Quantificação relativa por PCR real time de miR-122 nos grupos transfectados com mimético de miR-122 por 24h, 48h e 72h e CN. Quantificação relativa de (B) *Acaca*, (C) *Scd1*, (D) *Pparg*, (E) *Srebf1*, (F) *Cpt1a*, (G) *Prkaa2* e (H) *Atp5b1*, transcritos associados com o metabolismo de lipídios dos grupos com superexpressão de miR-122 e CN após 48h de transfecção. Dados expressos como



média +/- EPM. One-way ANOVA foi aplicado, seguido do teste de Dunnett para comparação de média entre mimic miR-122 (24, 48 e 72h) e CN. Foi utilizado teste t para comparação entre dois grupos. * indica diferença de $p < 0,05$; ** indica diferença de $p < 0,01$; *** indica diferença de $p < 0,001$; **** indica diferença de $p < 0,0001$.

Por último, a transfecção com mimético de miR-122 aumentou os níveis de Il1b, Tnf e IL6, mRNAs que codificam citocinas inflamatórias (Fig. 3A-C). Além disso, foi apontado a diminuição dos níveis de Ptpn1 por se tratar de um alvo validado de miR-122, mas quando aumentado relaciona-se a resistência à insulina (Fig. 3D). No entanto, genes envolvidos com a sinalização da insulina não foram alterados, sugerindo que a superexpressão de miR-122 pode induzir um estado inflamatório, sem causar resistência à insulina em adipócitos maduros (Fig. 3E-G).

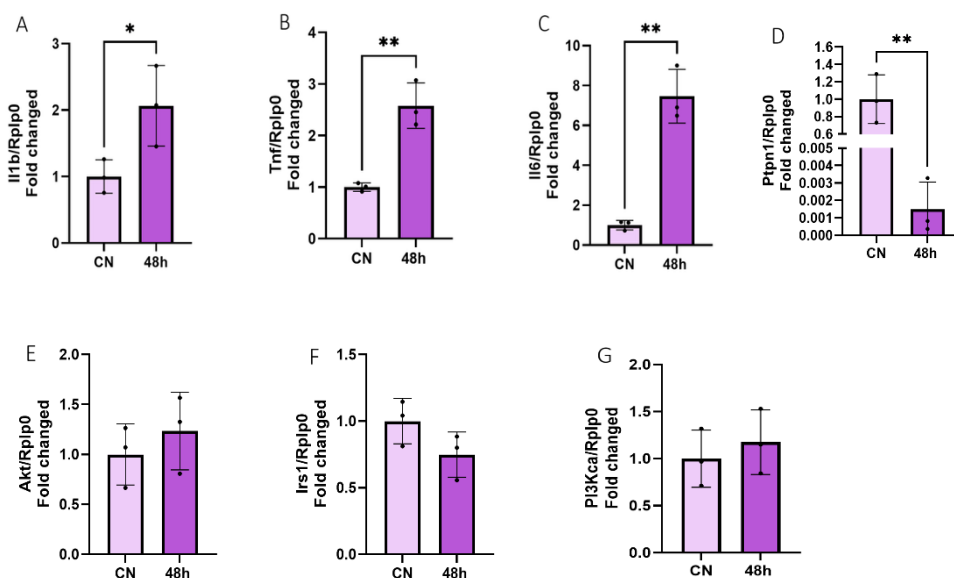


Figura 3. Quantificação relativa por PCR real time de (A) Il1b, (B) Tnf, (C) Il6, (D) Ptpn1, (E) Akt, (F) Irs1 e (G) PI3K de adipócitos maduros transfectados com miR-122 ou CN após 48 horas. Dados expressos como média +/- EPM. Foi utilizado teste t onde: * indica diferença de $p < 0,05$; ** indica diferença de $p < 0,01$.

CONCLUSÕES:

É sugerido que a superexpressão de miR-122 promoveu a lipogênese, a diferenciação em adipócitos e a inflamação. Além disso, o excesso de ácidos graxos sintetizados pode estar sendo direcionado preferencialmente para a produção de fosfolipídios e esfingolipídios, em vez de triacilgliceróis, devido à redução na expressão de *Agpat1*. O estudo demonstrou o aumento expressivo de miR-122 no plasma de pacientes com obesidade, embora possivelmente o transporte desse miRNA não foi através de exossomos. Dessa forma, concluímos que esse transporte possa ser feito através de outras vias, o que precisa ser melhor investigado.

BIBLIOGRAFIA

ATIC, A. I., Thiele, M., Munk, A., & Dalgaard, L. T. (2023). **Circulating miRNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease**. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 324(2), C588–C602.

BANDIERA, S., Pfeffer, S., Baumert, T. F., & Zeisel, M. B. (2015). **MiR-122 - A key factor and therapeutic target in liver disease**. *Journal of Hepatology*, 62(2), 448–457.

CHU, D. T., Bui, N. I., & Le, N. H. (2023). **Adrenoceptors and SCD1 in adipocytes/adipose tissues: The expression and variation in health and obesity**. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 194, 311–332.

HSU, S.-H., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., Yu, L., Bai, S., Perle, K. I., Chivukula, R. R., Mao, H., Wei, M., Clark, K. R., Mendell, J. R., Caligiuri, M. A., Jacob, S. T., Mendell, J. T., & Ghoshal, K. (2012). **Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver**. *The Journal of Clinical Investigation*, 122.

HU, Y., Du, G., Li, G., Peng, X., Zhang, Z., & Zhai, Y. (2021). **The miR-122 inhibition alleviates lipid accumulation and inflammation in NAFLD cell model**. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 127(5), 385–389.

JOSAN, C.; KAKAR, S.; RAHA, S. Matrigel® enhances 3T3-L1 cell differentiation. *Adipocyte*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 361–377, 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21623945.2021.1951985>.

KIM, V. N. (2005). **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:5, 6(5), 376–385.

LOU, J., Wu, J., Feng, M., Dang, X., Wu, G., Yang, H., Wang, Y., Li, J., Zhao, Y., Shi, C., Liu, J., Zhao, L., Zhang, X., & Gao, F. (2022). **Exercise promotes angiogenesis by enhancing endothelial cell fatty acid utilization via liver-derived extracellular vesicle miR-122-5p**. *Journal of Sport and Health Science*, 11(4), 495–508.

MOORE, J. B. (2019). **Conference on “Getting energy balance right” Silver Medal Lecture From sugar to liver fat and public health: systems biology driven studies in understanding non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis**.

OBESITY: preventing and managing the global epidemic. **Report of a WHO consultation**. (2000). World Health Organization Technical Report Series, 894.

PANZARIN, C., Simino, L. A. de P., Mancini, M. C. S., Ignácio-Souza, L. M., Milanski, M., Torsoni, M. A., & Torsoni, A. S. (2022). **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*, 49(4), 2655–2666.

PETTA, S., Gastaldelli, A., Rebelos, E., Bugianesi, E., Messa, P., Miele, L., Svegliati-Baroni, G., Valenti, L., & Bonino, F. (2016). **Pathophysiology of non alcoholic fatty liver disease**. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12).

Simino, L. A. P., Baqueiro, M. N., Panzarin, C., Lopes, P. K. F., Góis, M. M., Simabuco, F. M., Ignácio-Souza, L. M., Milanski, M., Ross, M. G., Desai, M., Torsoni, A. S., & Torsoni, M. A. (2023). **Hypothalamic $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) is downregulated by TNF α -induced Let-7 overexpression driven by fatty acids**. *FASEB Journal*, 37(9).

SODUM, N., Kumar, G., Bojja, S. L., Kumar, N., & Rao, C. M. (2021). **Epigenetics in NAFLD/NASH: Targets and therapy**. *Pharmacological Research*, 167.

TOBARUELA-RESOLA, A., Fermín, · Milagro, I., Elorz, M., Benito-Boillos, A., Herrero, J. I., Mogna-Peláez, P., Tur, J. A., Alfredo Martínez, · J, Abete, I., & Ángeles Zulet, · M. (123 C.E.). **Circulating miR-122-5p, miR-151a-3p, miR-126-5p and miR-21-5p as potential predictive biomarkers for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease assessment**. *Journal of Physiology and Biochemistry*.

VAN DER VAART, J. I.; BOON, M. R.; HOUTKOOPER, R. H. The Role of AMPK Signaling in Brown Adipose Tissue Activation. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 1122, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1122, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/5/1122/htm>

VAN NIEL, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). **Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228.

WANG, X., He, Y., MacKowiak, B., & Gao, B. (2021). **MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases**. *Gut*, 70(4), 784–795.

YANG, Y. M., Seo, S. Y., Kim, T. H., & Kim, S. G. (2012). **Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid**. *Hepatology*, 56(6), 2209–2220.

YOUNOSSI, Z. M., Blissett, D., Blissett, R., Henry, L., Stepanova, M., Younossi, Y., Racila, A., Hunt, S., & Beckerman, R. (2016). **The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe**. *Hepatology*, 64(5), 1577–1586.

YOUNOSSI, Z. M., Golabi, P., Paik, J. M., Henry, A., van Dongen, C., & Henry, L. (2023). **The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review**. *Hepatology*, 77(4), 1335–1347.

ZHAO, Y., Zhao, M. F., Jiang, S., Wu, J., Liu, J., Yuan, X. W., Shen, D., Zhang, J. Z., Zhou, N., He, J., Fang, L., Sun, X. T., Xue, B., & Li, C. J. (2020). **Liver governs adipose remodelling via extracellular vesicles in response to lipid overload**. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–17.