

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo  
fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com  
o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função  
moduladora dos microRNAs 1179 e 1254**

**LETÍCIA ROCHA GONÇALVES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

**Março  
2017**

LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

**Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função moduladora dos microRNAs 1179 e 1254**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes**

**Rio Claro - SP  
2017**

574.2    Gonçalves, Letícia Rocha  
G635a      Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no  
              processo fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não  
              tratadas com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a  
              função moduladora dos microRNAs 1179 e 1254 / Letícia  
              Rocha Gonçalves. - Rio Claro, 2017  
              102 f. : il., figs., tabs.

              Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
              Instituto de Biociências de Rio Claro  
              Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes

              1. Patologia. 2. Fibrose hepática. 3. HSCs. 4. Linhagem  
              celular LX-2. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função moduladora dos microRNAs 1179 e 1254

**AUTORA: LETICIA ROCHA GONÇALVES**

**ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro



Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. MARCIA REGINA COMINETTI  
Departamento de Gerontologia / Universidade Federal de São Carlos

Rio Claro, 24 de março de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais  
que tanto amo.

Ao meu namorado Fábio pelo  
companheirismo e amor incondicional  
compartilhados.

Aos meus familiares e amigos que  
confiam em mim.

À minha avó Leonor (*in memoriam*) por  
ter me ajudado a despertar o amor  
pelos estudos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à vida, a Deus, tudo de bom que nos circunda e nos permite ser o que quisermos;

À minha mãe Cecília Rocha por caminhar comigo, sempre unida a mim, nesta etapa maravilhosa que é a vida;

Ao meu companheiro, namorado e grande amigo Fábio Gonçalves de Oliveira, pelo apoio, pelos nossos estudos sobre o nosso ser, que tanto me deram força nesta fase e além disso, pelo amor incondicional compartilhados;

À minha professora e orientadora Karen, por confiar em mim, me receber de braços abertos, pelos ensinamentos e apoio nos meus momentos mais alegres e tensos do mestrado;

Aos meus irmãos Luiz Carlos, Leandro e Lenita Rocha Gonçalves, meu pai Luís Carlos Gonçalves e meus sobrinhos, Yara Beatriz e Luiz, pelo amor maravilhoso que nos enlaça;

À toda minha família Rocha que tanto amo;

Ao José Luís Gonçalves de Oliveira e Rosana Geromel de Oliveira, pelo apoio e confiança incondicional na realização desta minha tão sonhada etapa. À Letícia, ao Eduardo e à Cindy, pela torcida dessa minha conquista, juntamente com todos os outros componentes da família. Em especial a Rosimeire Geromel, por ter estado tão perto dessa minha etapa, transmitindo-me sempre muito carinho.

Aos meus eternos professores da graduação na Uniararas, por sempre transmitirem amor pela Biologia e pelo trabalho. Em especial à professora Cyntia que foi meu anjo da guarda, à professora Camila, que me cativou desde a sua primeira aula relacionada a biologia molecular e ao professor Carlos, pelo total apoio nas minhas escolhas e por defender tão bem a formação dos seus alunos;

Ao escritório Braghin e toda a família, por compartilharem comigo as coisas mais sagradas da existência, boas energias, amizade e carinho. Vocês estão no meu time e eu nos seus.

À minha doce amiga bióloga Camila Cristiane Pansa, pelo total apoio e amor a mim sempre transmitido;

À minha amiga-irmã Márcia, que foi uma das melhores pessoas que conheci nesses dois anos em Rio Claro, pela leveza e conversas extremamente construtivas durante várias horas, além das nossas refeições deliciosas;

Aos amigos de laboratório, em especial à minha parceira Brenda Oliveira, que marcou minha vida, com sua alegria, amizade e amor de amiga. À Juliana Miranda pela nossa amizade, desde que a Ju chegou eu gostei dela e cada dia mais admirava sua dedicação e sua vontade de aprender. À Letícia Scarinci, pela sua atenção e por ser como é, calma e cheia de boas energias. À Letícia Ramos por sua amizade e por sempre estar disposta a socorrer qualquer um, a qualquer hora. Ao kelvin Lima, pelas risadas que alegravam muito o laboratório. À Ana Paula, a consultora dos astros, por ser tão atenciosa e dedicada a todos e a tudo a sua volta. À Lara, pela espontaneidade mega engraçada e pelos fatos absurdamente cômicos que ocorrem na sua presença. Ao Caio, à Marina e à Priscila, por me darem sempre atenção e serem guerreiros. Cada qual com seu jeito, porém todos sempre unidos e sempre amigos;

Ao grupo da professora Márcia Regina Brochetto Braga, (Murilo Bazon e Amilcar) pelos cafés em conjunto, conselhos e os momentos compartilhados, todos sempre me cativaram;

À Cris, pela amizade, carisma e caronas que tanto me ajudaram;

Aos alunos de vários outros grupos do departamento que compartilharam ajudas e risadas nos corredores. Em especial ao João Rodolfo e ao Franco, por me socorrerem sempre;

A todos do departamento de Biologia, do programa de Ciências Biológicas, com ênfase em Biologia Celular e Molecular, pelo apoio e por permitir que eu torne o meu sonho real.

Aos meus amigos do IAC, em especial ao Pedro Ramos González pelos ensinamentos da biologia molecular, amizade e confiança. Aos meus amigos, sempre amigos, Alex Júnior Soares, Camila Chabi, Flávia Crivelari e Lísia Borges, pelas conversas, aprendizados e energias boas compartilhadas. E a todos os outros que compartilharam momentos especiais na minha iniciação científica.

À CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

*“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda a arte e de toda ciência verdadeira”*

**(Albert Einstein)**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-A</b> Representação ilustrativa de um fígado normal.....	15
<b>Figura 1-B</b> Células do tecido hepático a partir de um fígado lesionado.....	15
<b>Figura 2</b> Esquema do mecanismo de ação da Angiotensina (Ang).....	20
<b>Figura 3</b> Biogênese do miRNA.....	22
<b>Figura 4</b> Organograma dos modelos celulares investigados.....	27
<b>Figura 5</b> Representação esquemática dos vetores de clonagem.....	34
<b>Figura 6</b> Expressão relativa dos miRNAs 1179 e 1254.....	42
<b>Figura 7</b> Redes moleculares entre miRNAs.....	43
<b>Figura 8</b> Eletroforese em gel de agarose.....	44
<b>Figura 9</b> Confirmação da transfecção celular .....	45
<b>Figura 10-A</b> Análises de microscopia nas LX-2 2%, 10% e 10% tratada com Ang-(1-7).....	46
<b>Figura 10-B</b> mRNAs marcadores do processo fibrosante hepático.....	47
<b>Figura 10-C</b> Análise de microscopia de campo claro LX-2 2%, 10% e 10% tratadas com Ang-(1-7).....	50
<b>Figura 11-A</b> Análises de microscopia nas LX-2 pEP-miR controle, -1179 e -1254..	52
<b>Figura 11-B</b> mRNAs marcadores do processo fibrosante hepático.....	54
<b>Figura 11-C</b> Análise de microscopia de campo claro LX-2 2 pEP-miR controle, -1179 e 1254.....	56
<b>Figura 12</b> mRNA alvo do miRNA 1179.....	58
<b>Figura 13</b> mRNAs alvos do miRNA 1254.....	60
<b>Figura 14</b> mRNAs – elementos de adesão.....	63
<b>Figura 15</b> mRNAs – elementos estruturais e interação.....	67
<b>Figura 16</b> mRNAs – elementos de sinalização celular.....	71
<b>Figura 17</b> mRNAs – RT-PCR.....	75
<b>Figura 18</b> Expressão proteica de TGF $\beta$ -1.....	79
<b>Figura 19</b> Expressão proteica de $\alpha$ SMA, Mical2, TGF $\beta$ -2 e $\beta$ actina.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.....	37
<b>Tabela 2</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR.....	39
<b>Tabela 3</b> Alvos putativos dos miRNAs 1179 e 1254 e outros genes moduladores do citoesqueleto investigados.....	75

## Resumo

As doenças hepáticas são consideradas um problema sério em todo o mundo e vários elementos influenciam o desenvolvimento dessas patologias. Diabetes, doenças de síndrome metabólica, problemas nutricionais e infecção por vírus são elementos responsáveis pelo surgimento de doenças hepáticas. Não há nenhuma estratégia terapêutica eficaz disponível para tais doenças e, por isso, são necessários mais estudos para elucidar um entendimento molecular dos mecanismos celulares. As células estreladas hepáticas (HSCs) sustentam o desenvolvimento da fibrogênese hepática pela produção exacerbada de colágeno e outros elementos da matriz, quando ativadas. Além disso, algumas terapias alternativas apontam o peptídeo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] como importante elemento modulador da fibrogênese hepática. Entre os elementos alvo do heptapeptídeo, os microRNAs (miRNAs) apresentam alterações em seu perfil de expressão gênica. Essas pequenas moléculas vêm sendo amplamente investigadas por suas múltiplas funções no equilíbrio celular. Assim, para o desenvolvimento de novos fármacos é muito importante entender a função moduladora da Ang-(1-7) e dos miRNAs sobre a homeostase celular. Neste estudo, foram investigados por meio da linhagem HSCs humana LX-2 elementos moduladores do citoesqueleto dessas células em diferentes condições de cultivo: culturas quiescidas, ativadas/ pró-fibrosadas, ativadas/ pró-fibrosadas e tratadas com o peptídeo vasoativo e ativadas/ pró-fibrosadas que superexpressam os miRNAs 1179 ou o miRNA 1254, por serem esses uns dos miRNAs superexpressos quando com o tratamento com o peptídeo vasoativo. Utilizando ensaios de microscopia de fluorescência e análise de expressão gênica, os resultados apontaram para efeito modulador do peptídeo na reversão do processo fibrosante hepático; também foram apontados a característica deletéria da superexpressão do miRNA 1179 e o potencial controlador da fibrogênese modulada pela superexpressão do miRNA 1254. O conjunto de resultados reforça que o peptídeo atua na biologia dos sistemas de maneira a compensar modulações negativas e positivas na expressão gênica de células alvo, embora em nosso modelo atue favoravelmente na reversão do processo prófibrosante hepático.

**Palavras-chave: angiotensina (1-7); fibrose hepática; HSCs; Linhagem celular LX-2; microRNAs 1179 e 1254.**

### **Abstrat**

Liver diseases are considered a serious problem worldwide and several elements influence the development of these pathologies. Diabetes, diseases of metabolic syndrome, nutritional problems and virus infection are elements responsible for the emergence of liver diseases. However, no effective therapeutic strategy is available for such diseases, and therefore further studies are needed to elucidate a complete molecular view of cellular mechanisms. However, hepatic stellate cells (HSCs) are known to support the development of liver fibrogenesis by the exacerbated production of collagen and other matrix elements when activated. In addition, some alternative therapies point to the peptide Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] as a relevant modulatory element in the control of liver fibrogenesis. Considering the heptapeptide target elements microRNAs (miRNAs) changes their expression pattern in cells under the effect of the ang-(1-7). Such small molecules have been widely investigated for their multiple roles in cell balance and homeostasis. Thus, for the development of new drugs, it is very important to understand the modulatory function of Ang-(1-7) and miRNAs on cellular homeostasis. In this study, the human HSC strain LX-2 was investigated by cytoskeletal modulators of these cells under different culture conditions: quiescent, activated / pro-fibrous, activated / pro-fibrous and vasoactive peptide-activated fibroblasts overexpressing the 1179 miRNAs or 1254 miRNA. Using fluorescence microscopy assays and gene expression analysis, the results indicated a modulatory effect of the peptidum on the reversal of the liver fibrosing process. The deleterious characteristic of clone-1179 and the potential controller of fibrogenesis modulated by clone 1254 were also demonstrated. Moreover, the combined results reinforce that the pepetide acts in system biolgy in a manner to compensate negative and positive bias in gene expression in target cell; however the combined effect on profibrotic condition reversion still positive.

**Key words: angiotensin-(1-7); hepatic fibrosis; HSCs, LX-2 cell line; microRNA 1179 and 1254**

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	13
1.1. Fibrose hepática .....	13
1.2. Elementos celulares e moleculares da fibrose hepática .....	14
1.2.1. Células estreladas hepáticas .....	14
1.2.2. O citoesqueleto .....	18
1.3. O sistema renina-angiotensina e sua correlação com a fibrose hepática: o papel da Ang-(1-7) .....	19
1.4 Biogênese do MicroRNA (miRNA) .....	21
1.4.1.Terapêutica baseada em miRNA para doenças hepáticas .....	24
1.5. Análises Preliminares .....	25
2. Objetivos .....	25
2.1.Objetivo geral .....	25
2.2.Objetivos específicos.....	26
3.Material e métodos .....	26
3.1.Cultura celular, curva de crescimento e tratamentos.....	26
3.2 Extração de RNA total e miRNA, e transcrição reversa.....	28
3.2.1. Extração de RNA total .....	28
3.2.2. Transcrição reversa: RNA .....	29
3.2.3. Extração de miRNA.....	29
3.2.4. Transcrição reversa: miRNA .....	30
3.2.5. Análise de bioinformática .....	30
3.3. Clonagens dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254 .....	31
3.3.1.Extração do DNA genômico (gDNA) de células LX-2 .....	31
3.3.2.Amplificação das sequências precursoras dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254 por PCR..	31
3.3.3.Digestão com enzimas de restrição .....	32
3.3.4.Reação de ligação.....	32
3.3.5.Transformação bacteriana e sequenciamento das sequências sense e anti-sense do vetor pEP-miR.....	33
3.3.6.Estabelecimento dos clones celulares .....	34
3.4. Análises de Microscopia .....	36
3.4.1.Marcação de núcleo e citoesqueleto .....	36

3.4.2. Marcação de lipídios pelo método <i>Oil Red 3</i> .....	36
3.6. Análise de expressão gênica por reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) .....	38
3.7. Análise por <i>Western blot</i> .....	40
3.9. Análises estatísticas.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1. Análises preliminares .....	42
Com o aumento expressivo da expressão dos miRNAs em análise, optou-se pela obtenção de um clone celular que superexpressasse tais moléculas, para uma análise funcional dos mesmos no equilíbrio e na transdiferenciação das células LX-2. ....	43
4.2. Análise das clonagens dos hsa-miR 1179 e hsa-miR 1254 .....	44
4.3. Análises dos clones celulares .....	45
4.5. Análises morfofisiológicas e moleculares das células LX-2 .....	46
4.6. Redes de interações moleculares: avaliação do perfil de expressão de genes moduladores do citoesqueleto.....	57
4.6.1. mRNA alvo do miRNA 1179.....	58
4.6.2. mRNAs alvo do miRNA 1254 .....	59
4.6.3. Outros elementos moduladores do citoesqueleto: elementos de adesão.....	62
4.6.4. Elementos estruturais e de interação células a células .....	66
4.6.5. Elementos de sinalização celular .....	70
5. Níveis da expressão proteica de TGFB-1 nas células LX-2 ativadas tratadas e não tratadas com Ang-(1-7) e LX-2 ativadas clones 1179 e 1254 pelo método de ELISA .....	79
6. Níveis da expressão das proteínas $\alpha$ -SMA, Mical 2 e TGF $\beta$ -2 nos grupos celulares LX-2 investigados.....	80
7. Conclusão .....	83
8. Referências bibliográficas .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fibrose hepática

O fígado, a maior glândula que funciona como glândula endócrina e exócrina, é o segundo maior órgão do corpo humano e desempenha várias funções importantes no organismo como: síntese e secreção de bile, gliconeogênese, síntese de proteínas, metabolização de substâncias tóxicas, armazenamento de vitamina entre outras (Junqueira, Carneiro, 2004). Este órgão é dividido em células parenquimatosas e não parenquimatosas. Os hepatócitos, pertencentes às células do parênquima, são as principais células do fígado e correspondem a 80% do volume total do órgão. Estes estão organizados em unidades denominadas lóbulos hepáticos e são responsáveis pela atividade metabólica e pela secreção de componentes da bile. As células não parenquimatosas compreendem as células de *Kupffer*, células endoteliais sinusoidais e células estreladas hepáticas (HCS) (Bloom, Fawcett, 1994; Senoo et al., 2010).

As doenças hepáticas crônicas são consideradas graves problemas de saúde pública e causou a morte de mais de 1,5 milhões de pessoas por ano, segundo levantamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2012). Agentes químicos e biológicos podem promover patologias no fígado como: fibrose hepática, esteatose hepática alcoólica e não alcoólica, carcinoma hepatocelular, hepatite e cirrose.

A fibrose é um processo patológico comum a todas as doenças do fígado e pode ser desencadeada na permanência da lesão hepática por um período considerável. A resposta inicial à lesão hepática é o recrutamento de células inflamatórias que secretam citocinas reguladoras da resposta inflamatória. Classicamente são secretados o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), entre outros. Desempenham importante papel na fibrogênese hepática, pois, estimulam a proliferação, migração e ativação de células produtoras de matriz extracelular (MEC). Entre as células do tecido hepático que desempenham importante papel na produção dos elementos da MEC estão as HSC



(ROCKEY, 2001; REYNAERT et al., 2002; HERNANDEZ-GEA, FRIEDMAN, 2011; LEE, FRIEDMAN, 2011), que atuam favorecendo o processo de estabelecimento da fibrose, quando ativadas; (SENOO et al., 2010). A MEC que é constituída por colágenos (I, III, IV e VI), elastina, ácido hialurônico e glicoproteínas estruturais, correspondem a menos de 3% da área de uma secção histológica do fígado (HERNANDEZ-GEA, FRIEDMAN, 2011), mas, durante lesões crônicas, seus componentes podem aumentar aproximadamente 06 vezes (BATALLER, BRENNER, 2005), principalmente, colágeno I e III e fibronectina (HERNANDEZ-GEA, FRIEDMAN, 2011).

Em quadros clínicos em que a lesão hepática evolui para um grau mais elevado de comprometimento, existe a perda da arquitetura do órgão (Senoo, 2004), que é resultante de alterações metabólicas que acometem o órgão. Em consideração aos diferentes tipos de lesões que acometem o tecido hepático, nas lesões agudas, a expressão exacerbada de elementos da MEC será transitória e a morfo-fisiologia do tecido hepático será restaurada à sua condição normal. E em lesões crônicas e havendo persistência no acúmulo de MEC, haverá uma substituição progressiva do parênquima hepático por tecido cicatricial, resultando em cirrose (BATALLER, BRENNER, 2005). Infelizmente, embora muito dos aspectos moleculares correlacionados com o processo fibrosante hepático tenham sido estudados, ainda não existe um tratamento eficaz contra a fibrose hepática (Friedman, 2010).

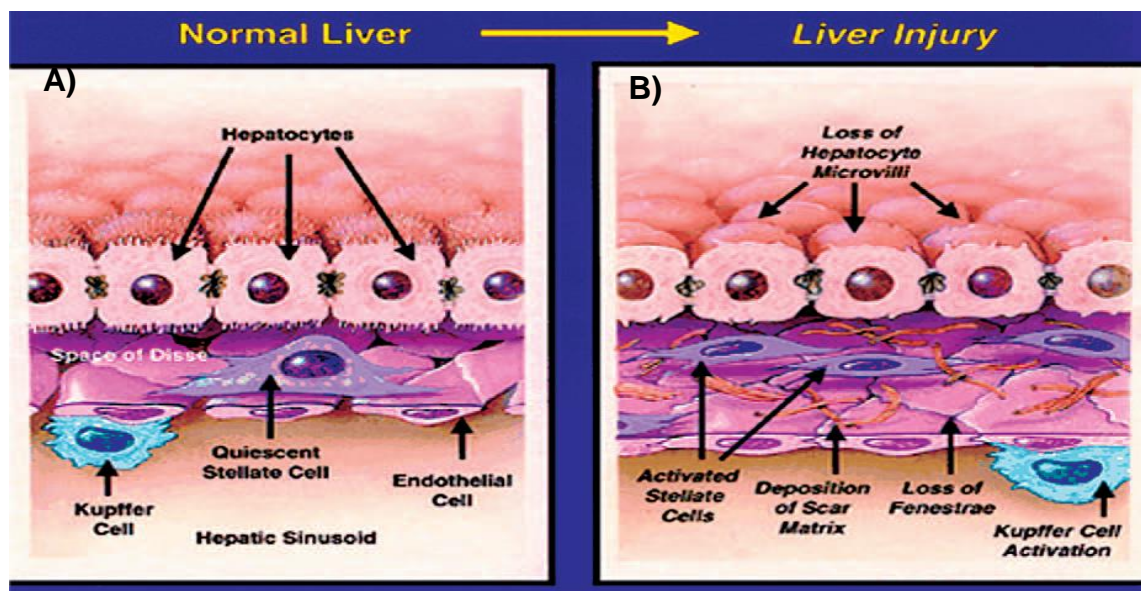
## **1.2. Elementos celulares e moleculares da fibrose hepática**

### **1.2.1. Células estreladas hepáticas**

As HSCs, também conhecidas como células de Ito ou células perisinusoidais, foram caracterizadas como *sternzellen* (célula em forma de estrela) (HENDERSON, FORBES, 2008), residem no espaço de Disse, entre os hepatócitos e os sinusóides (IWAISAKO et al., 2012), (Figura 1). Estudos realizados na década de 1980 já demonstraram que essas células são as principais produtoras de colágeno no fígado (FRIEDMAN et al., 1985).

As HSCs têm a função de acumular gotículas de lipídeos que são ricas em vitamina A (retinol) (Senoo, 2004; Winau et al., 2008). No fígado saudável as células estreladas encontram-se no estado quiescência, apresentando baixas taxas de mitose e de síntese de proteínas da matriz extracelular, acumulam gotículas de gordura no citoplasma e apresentam morfologia de estrela. As gotículas de gordura são compostas por lipídios neutros, principalmente por triglicerídios e ésteres de colesterol, envolvidos por uma monocamada de fosfolípido. Na lesão hepática, as células do tecido epitelial liberam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de recrutar e ativar as células de Kupffer, plaquetas, células inflamatórias e as células estreladas. Em consequência há a modulação do fenótipo alterado para o estado ativado (miofibroblasto). Neste estado ocorre a perda das gotículas de gordura e da forma estrelar, além do aumento na síntese de componentes da MEC, como proteínas estruturais, de colágeno e de adesão (Figura 1) (GRESSNER, WEISKIRHSCN, GRESSNER 2007; KISSELEVA e BRENNER 2008 e ALBERTS 2010).

**Figura 1:** Representação ilustrativa de um fígado normal (A) e células do tecido hepático a partir de um fígado lesionado (B). (A) Células do tecido hepático com fenótipo normal. (B) Há a ativação das células de Kupffer e das células estreladas, ocorrendo a perda da forma estrelar e das gotículas de gordura, além do aumento na síntese de componentes da MEC.



Quando há transdiferenciação celular várias vias de sinalização estão ativadas e o envolvimento de quinases e fosfatases se faz presente. Particularmente, a via de proteínas quinases, como a via AKT1, que se caracteriza como uma serina/treonina, estimulam a divisão celular (STEILING et al. 2004). O gene *AKT1*, pertence à família da Akt, que é composta por três membros: Akt1 (PKB- $\alpha$ ), Akt2 (PKB- $\beta$ ) e Akt3 (PKB- $\gamma$ ). A fosforilação e ativação da Akt são conhecidas por atuar em uma variedade de estímulos, como fatores de crescimento (DATTA et al. 1999), citocinas e hormônios, de maneira dependente da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (FRANKE et al. 1995), sugerindo uma importante função desta via na atividade mitogênica celular. A AKT1 é descrita como responsável pela ativação direta da HSC, devido a relação com o aumento da transcrição e tradução de colágeno tipo 1 e a expressão de vários fatores fibrogênicos, como o PDGF (Li et al. 2014). A síntese protéica é regulada em vários níveis e envolve vários mecanismos de sinalização intracelular. Desse modo, a via quinase - Akt apresenta uma função chave neste processo de fibrose (FUJITA et al. 2007).

Outra quinase envolvida é a ROCK2, a qual está associada à Rho (ROCK), que é um efetor para a pequena GTPase Rho, e desempenha uma função central em diversas atividades celulares, incluindo a adesão celular, citocinese e expressão gênica, principalmente através de uma alteração na dinâmica do citoesqueleto de actina (TANAKA et al., 2006). A proteína Rho pertence à superfamília da Ras GTPases monoméricas. Estudos sugerem que a Rho está implicada em diversas funções fisiológicas associadas com o citoesqueleto de actina-miosina, tal como citocinese, motilidade celular e contração do músculo liso (AMANO, et al., 1996). Sabe-se que esta via de sinalização envolve a Rho quinase (ROCK), que desempenha uma função crucial na contração do músculo liso, sob a regulação da atividade da proteína fosfatase das Cadeias Leves da Miosina (MLCP) (WEBB, 2003). ROCK fosforila a subunidade de ligação à MLCP, inibindo a sua atividade e assim promove o estado fosforilado das Cadeias Leves Reguladoras da Miosina (MLC), ou seja, o estado contraído do músculo liso (AMANO et al., 2000). Tal como outras proteínas ligadas a GTP, a Rho exibe tanto a atividade de ligação GTP/GDP e a atividade GTPase, funcionando como um interruptor molecular, alternando entre

um estado inativo, ligado ao GDP (GDP-Rho) e um estado ativo, ligado GTP (GTP-Rho) (NOBES, 1994). Para o estado ativo, a Rho interage com efetores como por exemplo o ROCK2. É conhecido por regular a morfologia celular, incluindo a formação de fibras de estresse de actina-miosina e complexos de adesão focal (WANGUE et al., 2009).

O processo de ativação das HSCs é dividido em 2 fases: A primeira fase, ou fase inicial, é caracterizada pelo aumento da expressão de receptores da membrana, tornando a célula mais responsivas aos estímulos parácrinos dos hepatócitos, espécies reativas de oxigênio e lipopolissacarídeos. O segundo estágio é conhecido como perpetuação. Neste estágio as HSCs assumem o fenótipo de miofibroblasto e também passam a liberar citocinas e quimiocinas que contribuem para a permanência no estado ativado (GRESSNER, WEISKIRHSCN, 2006). O aumento da proliferação, contratilidade, quimiotaxia, expressão de componentes da MEC, e de metaloproteinases e seus inibidores, dão um novo remodelamento e depósito de MEC nos sítios de injúria (FRIEDMAN, 2008). Também liberam vitamina A e gotículas de lipídios.

Para minimizar a fibrose, existem vários mecanismos que são desencadeados pelas HSC, dentre eles a apoptose, senescência e reversão (FRIEDMAN, 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que as HSC podem reverter seu fenótipo e a avaliação mecanística de tais processos é imprescindível para elucidar detalhes moleculares que subsidiem o futuro desenvolvimento de novas terapias no controle e/ ou reversão da fibrose hepática. Porém, essas avaliações somente foram possíveis após o estabelecimento da linhagem LX-2 por Xu et al. (2005). A LX-2 consiste em uma linhagem celular estabelecida partir de células estreladas hepáticas de fígado humano normal, que foi imortalizada sob o tratamento em baixas condições de soro. Nessas condições de cultivo, a LX-2 expressa o fenótipo quiescida, que é encontrado no fígado normal. Sob altas concentrações de soro, a célula LX-2 se transdiferencia e assume o fenótipo ativado (fibrosante, encontrado na lesão hepática). Sendo assim, dependendo da concentração de soro em que é cultivada, esta linhagem celular expressa os dois fenótipos, por isso é indicada como modelo de estudo dos mecanismos moleculares e celulares que são

desencadeados no processo fibrosante hepático. Atualmente, a linhagem LX-2 tornou-se uma aliada no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e na elucidação de particularidades mecanísticas da fibrose hepática.

### **1.2.2. O citoesqueleto**

O citoesqueleto consiste de uma complexa rede de proteínas distribuídas de maneira dinâmica, que participa dos processos de plasticidade, transporte e sinalização celular, além de ser o principal determinante da morfologia celular (BRAY, 1981; BRADY, 2003).

De acordo com Alberts et al. (2010) e Eitzen, (2003), os componentes do citoesqueleto são os filamentos intermediários, os microtúbulos e os microfilamentos, também conhecidos como filamentos de actina. Os filamentos intermediários revestem a face interna do envoltório nuclear e no citosol são distribuídos sob a forma de microtrabéculos, proporcionando resistência mecânica. Os microtúbulos, que são encontrados frequentemente estruturados em um arranjo citoplasmático em forma de estrela, têm origem no centro da célula interfásica. Podem se reorganizar rapidamente e formar o fuso mitótico na divisão celular, cílios e flagelos, determinando a posição de organelas delimitadas por membrana e o direcionamento do transporte intracelular. Já os filamentos de actina, revestem a face interna da membrana plasmática de células animais, dando resistência e forma a elas. Esses elementos colaboram com a organização de lamelipódios e filapódios, usados para explorar o território e o anel contrátil, que se organiza de maneira transiente para promover a divisão celular. Eles são responsáveis pela distribuição das proteínas de membrana e tráfego intracelular.

Como regra, a eficiência destes filamentos se dá devido a presença de centenas de moléculas acessórias que tanto interligam os filamentos entre si quanto os conectam aos outros componentes celulares. A estrutura citoesquelética, engloba toda a extensão da célula, unindo uma extremidade a outra. Por sua vez, as células são capazes de reorganizar-se estruturalmente em um curto tempo, pois as moléculas proteicas que compõem o citoesqueleto, são pequenas subunidades

repetitivas, que pode se dissociar em uma região e se reassociar em outra região. (ALBERTS et al., 2010).

O fenótipo expresso pelas HSCs quiescidas ou ativadas são singulares e mostram que estas representam uma população celular heterogênea, em termos de função e expressão de proteínas citoesqueléticas (GUMA et al., 2001). Desse modo, quando há transdiferenciação celular ocorre uma reorganização e expressão de proteínas de citoesqueleto, como  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e desmina, genes de adesão, como o grupo das integrinas, que estabelecem conexão entre a matriz extracelular e a fibra citoesquelética da actina (CALDERWOOD et al., 2000; ALBERTS et al., 2010), além de outras moléculas mediadoras da sinalização imediata como quinases e fosfatases. Além disso, durante a transdiferenciação, são observados o aumento de citocinas pró inflamatórias e o aumento na produção dos componentes da MEC, principalmente do colágeno I e III (BURT, 1993; FRIEDMAN, 1999; KISSELEVA, BRENNER, 2006).

Neste contexto, fica evidente a necessidade de explorar o potencial terapêutico existentes nas interações biológicas envolvendo moléculas do citoesqueleto, como opção de suprimir a ativação das células estreladas hepáticas e impedir o processo de fibrose.

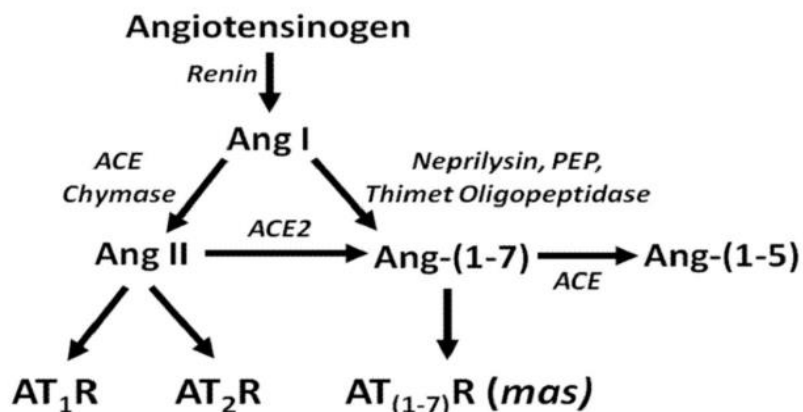
### **1.3. O sistema renina-angiotensina e sua correlação com a fibrose hepática: o papel da Ang-(1-7)**

O sistema renina-angiotensina (SRA) se estabelece quando o composto denominado angiotensinogênio, produzido principalmente no fígado e liberado na circulação, é clivado pela ação da enzima renina e se converte no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I). A partir desse ponto, o catabolismo da Ang I pode direcionar o sistema a duas rotas metabólicas que resultam na produção de dois peptídeos bioativos, a Angiotensina II (Ang II) e Ang-(1-7).

Esses dois compostos se diferenciam em suas extremidades carboxi-terminais, que lhes conferem atividades biológicas opostas. A formação do octapeptídeo vasoconstritor e pró-inflamatório, Ang II, é catalisada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA ou ACE). Por outro lado, o heptapeptídeo

vasodilatador Ang-(1-7), que possui atividades anti-proliferativa, anti-trombótica e anti-angiogênica é derivado a partir da Ang I pela mediação de enzimas, tais comoneprilisinas, prolilendopeptidase e oligopeptidase *thimet* (FERRARIO et al., 1997), ou ainda a partir de Ang II, pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2 ou ACE2) (TURNER et al., 2002) (Figura 2). Os dois peptídeos encontram-se aproximadamente em quantidades equimolares e seus mecanismos de ação são intermediados pelo envolvimento de receptores celulares específicos (FERRARIO et al., 2005). A Ang II interage com os receptores de Angiotensina do tipo I (AT1) e o do tipo II (AT2), e a Ang-(1-7) atua nas células pela sua interação com o receptor MAS, o qual medeia as principais ações cardiovasculares e alguns efeitos renais dessa Angiotensina (Ang) (SANTOS et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004; SANTOS et al., 2005; FERREIRA, SANTOS, 2005; SANTOS et al., 2006; SIMÕES, SILVA et al., 2006) e/ou AT2 (SILVA et al., 2007). (Figura 2).

**Figura 2:** Esquema do mecanismo de ação da Ang II e Ang (1-7). Adaptado (Paizis et al., 2002; Martinez et al., 2003; Tallant e Clark, 2003; Heralth et al., 2007; Turner et al., 2001; Vickers et al., 2002) Legendas: Ang – Angiotensina; ECA ou ACE - Enzima conversora de Angiotensina (ECA ou ACE); AT1R - Receptor de Angiotensina tipo 1; AT2R - Receptor de Angiotensina tipo 2 e AT1-7R - Receptor de Angiotensina tipo 1-7.



Particularmente a Ang- (1-7) tem um número de ações importantes, incluindo vasodilatação (FERRARIO et al., 2005; MARANGONI et al., 2006) e inibição da proliferação celular (TALLANT et al., 2005; GROBE et al., 2007), bem como anti-hipertensão (BENTER et al., 1995) e efeitos antiarrítmicos (FERREIRA et al., 2001). A Ang-(1-7) exerce ações opostas à Ang II, conferindo ao sistema uma influência

dual em vários tecidos (MACHADO et al., 1999; KUCHARWICZ et al., 2002; FERRARIO, CHAPPELL, 2004; FERREIRA, SANTOS, 2005; SIMÕES, SILVA et al., 2006). Há estudos que sugerem que a Ang II poderia mediar e exacerbar a fibrose hepática pela ativação das células estreladas e pelo estímulo ao TGF $\beta$ 1 (BATALLER et al., 2000; BISSELL et al., 2001; JONSSON et al., 2001; YANG et al., 2002; FRIEDMAN, 2003; BATALLER, BRENNER, 2005). Por outro lado, existem indícios de que o antagonismo à Ang II, através do tratamento com inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) ou com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos do tipo 1 (AT1), pode exercer um efeito benéfico nas hepatopatias (BATALLER et al., 2000; GIRGRAH et al., 2000; YANG et al., 2002). Outros estudos ainda evidenciaram o efeito benéfico da Ang-(1-7) sobre a fibrose hepática utilizando antagonista do receptor MAS[7-D-Ala]-Ang-(1-7) (A779). O tratamento do fígado fibrótico com A779 diminui os níveis de TGF- $\beta$ 1, demonstrando que a estimulação do receptor MAS apresenta um papel protetor contra fibrose (PEREIRA et al., 2006). Em outro estudo, a infusão de Ang-(1-7) em ratos com ducto biliar ligado, diminuiu a expressão de RNAs mensageiros (RNAm) de colágeno 1 e reduziu também os níveis transcricionais e protéicos de  $\alpha$ -SMA, promovendo uma redução da fibrose e indicando uma inibição das células estreladas pela Ang-(1-7) (LUBEL et al., 2009).

O tratamento com inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT $_1$ , mostrou-se benéfico nas doenças do fígado. Estes resultados demonstram como a Ang II/AT $_1$ /TGF- $\beta$ 1 atuam no fígado como agentes mediadores da fibrose (GIRGRAH et al., 2000; LEE et al., 2000). Dessa maneira, a Ang-(1-7) é um alvo em potencial para desenvolvimento de futuras terapias voltadas para doenças crônicas do fígado (PAIZIS et al., 2005).

#### **1.4 Biogênese do MicroRNA (miRNA)**

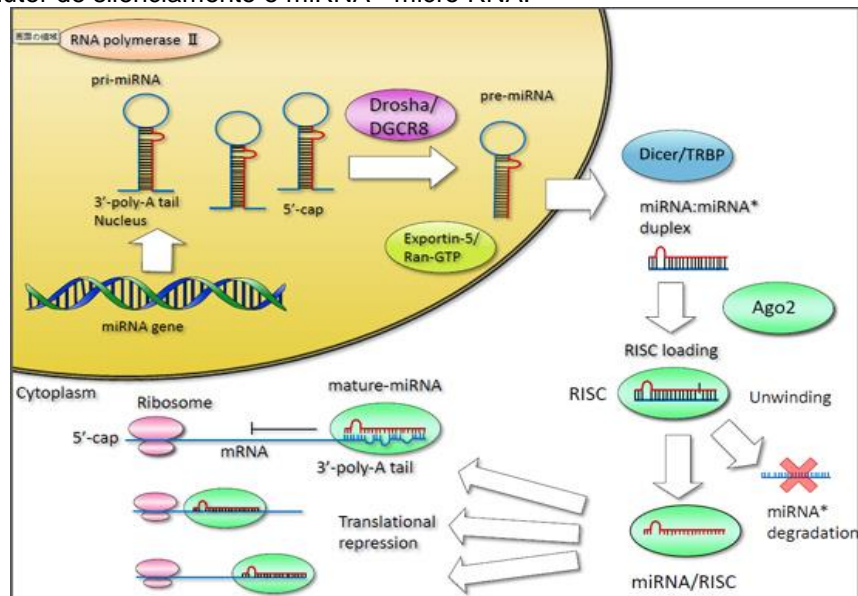
Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificadores, que desempenham um papel importante na regulação gênica, sendo esta uma característica conservada das células eucarióticas (MOLNÁR et al., 2007).

A transcrição de um gene de miRNA é gerado, no núcleo celular, a partir de



um transcrito primário (pri-miRNA) que é processado pela enzima Drosha em um miRNA precursor (pre-miRNA). Este apresenta uma estrutura em forma de grampo de cabelo (*hairpin*). Em seguida é exportado para o citoplasma e uma endonuclease RNase III não-específica, denominada Dicer, reconhece esse duplex de RNA e os cliva, liberando uma das fitas, denominada de fita guia ou miRNA maduro, o qual fará parte do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), os quais apresentam como componente central proteínas Argonautas (AGO) (BARTEL, 2009; SCHWARZ et al., 2003). Tendo aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (LAGOS-QUINTANA et al., 2001), esses miRNAs maduros se ligam a porção 3'-UTR (3'- não traduzida) de mRNAs específicos e podem então provocar a parada da tradução ou a degradação desse mRNA (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014) (Figura 3).

**Figure 3:** Biogênese do miRNA. HAYES, CHAYAMA, 2016. Legenda: Ago2 - Agornaut; RISC - complexo indutor de silenciamento e miRNA - micro RNA.



Os miRNAs também são encontrados na corrente sanguínea e espaços extracelulares (VALADI et al., 2007). Estes são distribuídos em microvesículas e exossomos circulantes, atuando como mensageiros que apresentam o potencial de influenciar as funções de células e tecidos em locais distantes de origem. No entanto

mais estudos precisam esclarecer o mecanismo de atuação desses miRNAs, os quais estão sendo utilizados como biomarcadores para várias patologias, devido a sua grande estabilidade no soro e plasma (STARKEY et al., 2011). Além disso, os miRNAs podem interagir com diferentes moléculas mensageiras alvo, controlando níveis transcricionais e traducionais das moléculas alvo dentro de uma complexa rede de interações sistêmicas (GRIFFITH-JONES et al., 2005). Segundo Friedman (2009), os miRNAs atuam sobre a regulação de quase todos os processos biológicos das células e estão envolvidos no equilíbrio celular e no estabelecimento de patologias humanas. Conseqüentemente, podem ser ferramentas para o diagnóstico e prognóstico das mais diversas patologias (GARZON et al., 2010, MENDEL, OLSON, 2012).

Têm sido relatados estudos de padrões de alta expressão de miRNAs específicos em órgãos, como no coração, o miR-1 é que representa esse padrão, no cérebro o miR-9, miR-133 e miR-206, no pâncreas, o miR-7 e o miR-375, na tireoide o miR-16 e no fígado o miR-122 (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Essas características associadas em diferentes órgãos, podendo ser no mesmo organismo, podem ser chamadas de assinaturas de expressão gênica. As quais são dinâmicas, ou seja, sensíveis a alterações durante o desenvolvimento, mudanças no ambiente, presença de doenças e terapia com drogas (BIRCHLER, VEITIA, 2007; ECKHARDT et al., 2004).

Particularmente no fígado, de acordo com Teng (2015), os miRNAs miR-21, miR-221/222 e miR-181b promovem a fibrose hepática através do TGF- $\beta$ , enquanto miR-9b, miR-101, miR-122 e miR-214-3p previnem a fibrose pela inibição da síntese de colágeno e da ativação da via TGF- $\beta$ . Além disso, nas células estreladas hepáticas, os miR-15b e miR-16 atuam aumentando a apoptose, reduzindo o número de células ativadas e atenuando a fibrose (GUO et al., 2009). A baixa expressão de miR-27a e 27b, aumenta a expressão do receptor retinóide X- $\alpha$ , permite que as células estreladas ativadas apresentem o fenótipo quiescida (JI et al., 2009); a superexpressão de miR-150 e miR-194 inibiu a ativação da célula estrelada e a produção de componentes da matriz extracelular, via inibição da expressão de c-myb e rac (VENUGOPAL et al., 2010).

A regulação da expressão dos miRNAs pode ser uma alternativa terapêutica em diversas patologias. Normalizando o padrão de expressão de miRNAs que se apresentam super- ou sub-expressos, inibindo ou induzindo a expressão respectivamente (THUM et al., 2007; VAN ROOIJ, OLSON, 2007). Com a combinação dessas duas ferramentas, torna-se possível identificar não somente genes regulados por miRNAs, mas também processos celulares afetados por miRNAs específicos (TAKAHASHI et al., 2013), sendo uma avaliação de extrema importância para elucidação de seu papel em várias redes regulatórias celulares.

#### **1.4.1. Terapêutica baseada em miRNA para doenças hepáticas**

O grande número de miRNAs no genoma humano e a abundância de mRNAs controlados por essas moléculas sugerem ampla possibilidades oferecidas pelos padrões de expressão de miRNAs (ANDREOLI et al., 2014). Evidências mostram que os miRNAs exercem uma função crucial no desenvolvimento de muitas doenças humanas, podendo ser também marcadores do progresso, prognóstico, diagnóstico e na avaliação de resposta aos tratamentos (BLENKIRON, et al., 2007). Grandes empresas na área biotecnologia farmacêutica, como a Merck, Regulus e RoHSC, estão se movimentando para utilizar miRNAs como diversas oportunidades terapêuticas (GRANT, 2014).

Segundo Lorenzi e Zanette (2015), a terapêutica baseada em miRNA é com o uso de drogas inibidoras de miRNAs, como o medicamento Miravisen, que está em fases de testes. Este medicamento é para o tratamento da hepatite C, que atua como inibidor do miR-122 e em testes com humanos, verificou-se que doses de 5mg/ kg, durante quatro semanas, houve a eliminação completa da contagem viral (LINDOW; KAUPPINEN, 2012, JANSSEN et al., 2013).

A compreensão da biologia dos miRNAs e a sua função nos processos patogênicos é uma nova e estimulante fronteira na medicina (CARVALHO-OLIVEIRA, et al., 2012).

### 1.5. Análises Preliminares

Considerando o processo de fibrose hepática e a investigação de elementos-chaves que regulam a reversão do processo fibrosante, investigamos miRNAs que atuam como elementos moduladores do equilíbrio celular e na reversão do processo pro-fibrosante hepático. Utilizando células estreladas hepáticas humanas, LX-2, que possuem a capacidade de se transdiferenciar em cultura celular do estado quiescente para o fibrosado, foi investigado o papel da Ang-(1-7) na expressão de 752 miRNAs utilizando a plataforma no *miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR - Human miRNA PCR panel I+II* (V4.M, Exiqon). Os resultados foram analisados, e utilizando com o *software GenEx* (<http://www.exiqon.com/qpcr-software>) e 12 miRNAs se destacaram nas análises prévias, cada um dos quais correlacionados com uma ou mais vias de sinalização que cooperam com a transdiferenciação celular (dados do laboratório não publicados). Para este estudo, foram escolhidos os miRNAs 1179 e 1254 por se correlacionarem diretamente com vias de sinalização que modulam os elementos do citoesqueleto, considerando-se as vias moleculares descritas no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEEG - <http://www.kegg.jp>) e ferramentas online de bioinformática como DIANA TOOLS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>). Particularmente, o algoritmo KEEG é um recurso de banco que compila informações correlatas a vias de sinalização celular, utilizando-se da biologia dos sistemas. O algoritmo DIANA TOOLS analisa possíveis redes de interações dos miRNAs com as vias do KEEG, de maneira estatisticamente segura ( $p < 0.001$ ). Após essas análises preliminares os dois microRNAs em destaque foram escolhidos para a análise funcional dos mesmos na modulação do citoesqueleto celular e na transdiferenciação das células LX-2.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Analisar elementos do citoesqueleto em cultura de células LX-2 tratadas e não tratadas com o peptídeo vasoativo Ang-(1-7) e a função moduladora dos miRNA 1179 e 1254, visando a caracterização de mecanismos de atuação do peptídeo na

organização do citoesqueleto celular na fibrose hepática.

## **2.2.Objetivos específicos**

1. Estabelecer e selecionar clones celulares LX-2 superexpressando os miRNAs-1179 e -1254;
2. Avaliar o efeito do peptídeo vasoativo, da Ang-(1-7) e das clones celulares LX-2 selecionados na modulação do citoesqueleto das células LX-2 cultivadas sob diferentes condições em ensaios, por meio de análises de microscopia e de expressão gênica;
3. Investigar a expressão de proteínas centrais no processo de transdiferenciação celular da LX-2 e de proteínas moduladoras do citoesqueleto, por ensaios de Western blot;
4. Integrar os resultados dentro do contexto da biologia dos sistemas.

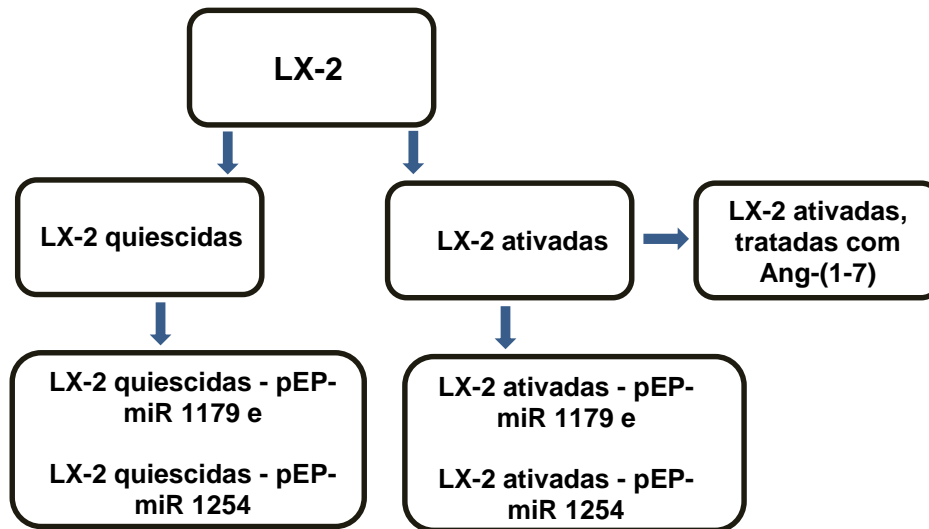
## **3.MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1.Cultura celular, curva de crescimento e tratamentos**

Para o estudo da fibrose hepática, culturas da linhagem hepática de célula estrelada humana LX-2 (*SCC064 EMD MILLIPORE*) foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 0,1% de antibiótico *Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti, Gibco)* (*Thermo fisher*) a 37°C, em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e acrescido de 2%, ou 10% de soro bovino fetal (SBF). As diferentes concentrações de SBF modulam a fisiologia das células LX-2. Células cultivadas em meio de cultura contendo 2% de SBF mantêm o estado quiescida; células cultivadas em meio contendo 10% de SBF apresentam fenótipo ativado (miofibroblasto). Para avaliar o efeito da Angiotensina-(1-7) no metabolismo das células LX-2 e na reversão do quadro fibrosante, as células foram cultivadas em meio contendo 10% SBF e tratadas com 10<sup>-7</sup> M do heptapeptídeo. Para avaliar o efeito do miR-1179 e 1254 na modulação do processo fibrosante hepático, clones celulares foram estabelecidos e cultivados em 2% e em 10% de SBF. As culturas foram mantidas até que atingissem, aproximadamente, 90% de confluência. A figura 4, apresenta um organograma referente aos diferentes tratamentos e cultivos das

células LX-2, que foram realizados nesse trabalho.

**Figura 4:** Organograma referente aos diferentes tratamentos nas células LX-2 realizados nesse trabalho. Sendo que, a linhagem celular LX-2 foi cultivada tanto a 2% de soro bovino fetal (SBF), sendo estas as LX-2 quiescidas, quanto a 10% de SBF, sendo estas as células LX-2 ativadas. As LX-2 ativadas, tratadas com Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], são as células LX-2 cultivadas a 10% de SBF, tratadas com o peptídeo; as LX-2 quiescidas – pEP-miR 1179 ou 1254, são as células cultivadas a 2% de SBF, transfectadas o miRNA 1179 ou -1254; referente as LX-2 ativadas – pEP-miR 1179 ou 1254, são as células LX-2 cultivadas a 10% de SBF, transfectadas com pEP-miR 1179 ou -1254.



Dessa maneira os diferentes tratamentos celulares realizados, serão descritos da seguinte forma:

- As células LX-2 cultivadas a 2% de SBF: LX-2 quiescidas;
- As LX-2 cultivadas a 10% de SBF: LX-2 ativadas;
- A cultura celular LX-2 cultivadas a 10% de SBF, tratadas com Ang-(1-7): LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7);
- As células LX-2 cultivadas a 2% de SBF, transfectadas com o pEP-miR 1179 ou 1254: LX-2 quiescidas clone 1179 ou 1254;
- As LX-2 cultivadas a 10% de SBF, transfectadas com o pEP-miR 1179 ou 1254: LX-2 ativadas clone 1179 ou 1254.

Para a análise da curva de crescimento das LX-2, sob os diferentes tratamentos

citados anteriormente,  $1,5 \times 10^5$  células foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. A curva de crescimento foi monitorada com base no dia em que as células foram colocadas na garrafa até o dia em que atingiram 90% de confluência. O ensaio foi repetido seis vezes para cada condição. O tempo de duplicação foi calculado com base na fórmula  $t \cdot \ln(2) / \ln(A/A_0)$ , onde A= número de células no tempo t; A<sub>0</sub>= número inicial de células (Legrier et al., 2007).

### **3.2 Extração de RNA total e miRNA, e transcrição reversa**

#### **3.2.1. Extração de RNA total**

Após as culturas celulares atingirem 90% de confluência, as mesmas foram coletadas utilizando solução de tripsina-PBS/ EDTA (1X PBS/EDTA: 137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,68 mM EDTA, pH 7,4) e utilizadas na extração de RNA total com *TRIZOL® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.)*, seguindo as recomendações do fornecedor.

Para tanto, as células foram ressuspensas em TRIZOL® e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Para 1 mL de TRIZOL®, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (*Merck*), seguido de agitação vigorosa do microtubo por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, resultando em uma mistura trifásica, da qual o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Ao sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico (100%) para cada 1 mL de TRIZOL®, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de TRIZOL®. Os microtubos foram invertidos 5 vezes seguido de centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o RNA precipitado foram colocados em um fluxo laminar por 5 minutos, para garantir a secagem deste.

Posteriormente o RNA foi ressuspendido em 32 µL de água livre de RNase e quantificado. As amostras foram analisadas com o auxílio do aparelho

espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare), utilizando-se a razão A260/A280 e A260/A230 para se avaliar a qualidade do RNA extraído.

### 3.2.2. Transcrição reversa: RNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído dos grupos celulares, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As reações de transcrição reversa foram realizadas com 1 µg do RNA extraído, 10 µM de oligonucleotídeos (10 x RT *Random primer*), 8 mM de dNTPs [25 x dNTP Mix] e 1,25 U de transcriptase reversa (*Multi Script™ Reverse Transcriptase*) conforme as especificações do fabricante. Com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S®* (Eppendorf), as reações foram incubadas a 25°C por um intervalo de 10 minutos, seguido de incubação a 37°C por 120 minutos e inativação enzimática a 85°C por 5 minutos, conforme as orientações do fornecedor. As amostras de RNA total extraídas foram armazenadas a -80°C, enquanto que o cDNA sintetizado foi diluído (1:10) e estocado a -20°C até sua utilização.

### 3.2.3. Extração de miRNA

Para a análise da expressão de miRNAs dos diferentes grupos de LX-2, os mesmos foram extraídos por meio do miRNAse minikit (*Qiagen®*), seguindo as recomendações do fabricante.

Para isso, as células foram ressuspensas em 700 µL de *QIAzol Lysis Reagent* e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 140 µL de clorofórmio para cada amostra e a mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 3 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 1,5 x v/v de etanol. As amostras foram então transferidas para as minis colunas (*RNeasy® Mini Column - Qiagen®*) e, logo, foram centrifugadas a 8.000 rpm, por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e foram adicionados 700 µL de tampão RWT (*Qiagen®*) em cada uma das colunas, com posterior centrifugação a 8.000 rpm, por 15 segundos à temperatura ambiente. Descartou-se os filtrados e foram



adicionados 500 µL de tampão RPE (*Qiagen*®) às colunas, seguido de nova centrifugação a 8.000 rpm por 15 segundos à temperatura ambiente.

Repetiu-se o descarte dos filtrados e 500 µL de tampão RPE foram adicionados, seguido de centrifugação a 8.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte dos filtrados, as colunas foram colocadas em novos microtubos de 1,5 mL, com posterior centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. As colunas foram então transferidas para microtubos de 1,5 ml e foram adicionados 50 µL de água livre de RNase diretamente sobre as membranas das colunas, com posterior centrifugação à temperatura ambiente por 1 min a 8.000 rpm. Os filtrados foram quantificados no espectrofotômetro *NanoVue™ Plus (GE Healthcare)* a 260nm, utilizando a razão A260/A280 (260 nm - absorbância de DNA / 280 nm – absorbância de proteína) e A260/A230 (230 nm – absorbância de contaminantes, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol).

#### **3.2.4. Transcrição reversa: miRNA**

O cDNA foi transcrito a partir das extrações dos RNA total enriquecidos com miRNAs, utilizando-se o *MiScript II RT Kit (Qiagen*®), seguindo as recomendações do fabricante. Nestas reações, foram utilizadas 2 µg de RNA total enriquecidos com miRNAs, 20 mM de tampão (5 x *MiScript HiSpec Buffer*), 10 mM de oligonucleotídeos (10 x *MiScript Nucleics Mix*), 10 mM da enzima transcriptase reversa (*MiScript Reverse Transcriptase Mix*), água livre de RNases em quantidade suficiente para um volume final de 20 µL. Com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S® (Eppendorf)*, a mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguido de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos, para inativação da transcriptase reversa.

#### **3.2.5. Análise de bioinformática**

A análise dos miRNAs de interesse para o presente estudo foi realizada por bioinformática, utilizando informações disponíveis em banco de dados como mirDB (<http://mirdb.org/miRDB/>), MiRBase (<http://www.mirbase.org/>) e Target Scan

(<http://www.targetscan.org/>). As sequências maduras dos miRNAs e os oligonucleotídeos dos genes de interesse foram analisadas e desenhadas em ferramentas básicas de bioinformática como o Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)) e o Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), respectivamente. Vias de sinalização foram analisadas utilizando-se o KEGG (<http://www.kegg.jp>), DIANA TOOLS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) e CYTOSCAPE (<http://www.cytoscape.org>)

### **3.3. Clonagens dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254**

#### **3.3.1.Extração do DNA genômico (gDNA) de células LX-2**

As células LX-2 crescidas em 10% de SBF foram utilizadas na extração do DNA genômico, adaptando-se metodologia descrita por Sambrook; Green (2012). Para isso, as células foram ressuspensas em uma solução contendo 0,15 M NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS e 50 mM Tris-HCl pH 7,6. Após a lise celular, o DNA genômico foi precipitado e purificado utilizando extração com fenol-clorofórmio. A verificação da qualidade e concentração do DNA preparado foram avaliadas em espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare) utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 ~ 2.0.

#### **3.3.2.Amplificação das sequências precursoras dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254 por PCR**

Inicialmente as sequências precursoras dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254 foram identificadas em bancos de dados, miRBase (<http://www.mirbase.org/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e analisadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Seguindo as orientações do fornecedor do plasmídeo *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.). Para as clonagens, foram consideradas as sequências precursoras dos microRNAs, acrescidas de 100 bases nos flancos (à montante e a jusante), permitindo assim que os oligonucleotídeos fossem desenhados e amplificados do fragmento precursor, por meio de reações de PCR convencional.

Foram inseridas bases correspondentes aos sítios das enzimas *Bam* HI e *Nhe* I, respectivamente aos oligonucleotídeos da sequência precursora do hsa-miR-1179 direto (sense: 5' TCGAGGATCCTAGCAACAGTTGTGTGGTTTT – 3') e (anti-sense: 5' TCGAGCTAGCAAAGTCAATTCCAGATCCTGA – 3'). Para a clonagem do hsa-miR-1254, o mesmo procedimento foi adotado. Aos oligonucleotídeos (sense: 5' TCGAGGATCCAGCTTCTGCAACATAGTGAGG – 3') e (anti-sense: 5' TCGAGCTAGCCTATAGCAATCTGCCCATCTG – 3') foram inseridas bases correspondentes aos sítios das enzimas *Bam* HI e *Nhe* I, respectivamente.

Para amplificar a região do genoma correspondente às inserções das sequências do hsa-miR-1179 e do hsa-miR-1254 foram realizadas reações de PCR convencional, sendo utilizados aproximadamente 50 ng de gDNA. Os fragmentos de PCR foram purificados com *Agencourt AMPure XP PCR Purification* (Beckman Coulter), quantificados em espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare) utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 ~ 2.0 e utilizados em digestões enzimáticas para clonagem.

### **3.3.3. Digestão com enzimas de restrição**

Posteriormente à amplificação dos fragmentos por PCR, estes foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nhe* I (*NEW ENGLAND BioLabs®*), conforme as especificações do fabricante. Concomitantemente o vetor *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (*Cell Biolabs Inc.*) também foi digerido com as enzimas *Bam* HI e *Nhe* I.

O inserto e o vetor digerido, foram submetidos a purificação com *MinELUTE®*, *Gel Extraction Lit* (*Quiagen*), quantificados e submetidos a reações de ligação enzimática.

### **3.3.4. Reação de ligação**

Os insertos e os vetores previamente digeridos e purificados foram ligados em reações de ligação, conforme Sambrook et al. (1989). O inserto e vetor foram ligados em reações de ligação utilizando aproximadamente 2 µg do vetor digerido, 6 µg do inserto digerido, 10% v/v de tampão (10 X *T4 DNA Ligase Buffer* – *NEW*

ENGLAND BioLabs®), 10% v/v de ATP e 10% v/v de enzima (*T4 DNA Ligase* – NEW ENGLAND BioLabs®), incubados a 16°C por um intervalo de 16 h.

### **3.3.5. Transformação bacteriana e sequenciamento das sequências sense e anti-sense do vetor pEP-miR**

Os plasmídeos recombinantes foram utilizados na transformação de bactérias DH5 $\alpha$  (F-,  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk, mk+), phoA, supE44,  $\lambda$ -, thi-1, gyrA96, relA1), utilizando o antibiótico ampicilina para seleção, adaptando a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989).

Em seguida, colônias de bactérias recombinantes de hsa-miRNA1179 e de hsa-miRNA1254 foram analisadas por PCR. Para isso foram feitas reações com um volume final de 15  $\mu$ l e foram utilizados os oligonucleotídeos específicos de cada miRNA. As reações de PCR foram feitas realizadas utilizando 10  $\mu$ M dos oligonucleotídeos sense e anti-sense, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solução tampão para PCR (1X), 250  $\mu$ M de dNTP, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) e uma colônia bacteriana, removida da placa de Petri com o auxílio de uma ponteira de 2  $\mu$ l.

O DNA plasmidial dos clones de interesse foi purificado por mini preparações de DNA, utilizando-se protocolo adaptados de Sambrook et al. (1989). Para isso, colônias de bactéria foram cultivadas em meio Luria Bertani líquido [1 L: 10 g de Triptona, 5 g de Extrato de Levedura e 171 mM NaCl] por um intervalo de 12 h. Em seguida as bactérias foram coletadas por centrifugação. Os precipitados foram tratados respectivamente com as soluções P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 100  $\mu$ g/ mL RNase) e P2 (200 mM NaOH, SDS 1%), seguido de precipitação dos plasmídeos com a solução P3 (3M acetato de potássio, pH 5,3) e isopropanol. Os plasmídeos precipitados foram lavados com etanol 70%, liofilizados e ressuspensos em água estéril. Em seguida foram utilizados em reações de digestão enzimática com *Bam* HI e *Nhe* I (NEW ENGLAND BioLabs®), para a seleção final de clones.

Os clones selecionados foram submetidos a preparação em maior escalada por mini preparações de plasmídeos, seguindo metodologia descrita por Sambrook; Green (2012). Essa estratégia consiste no crescimento das colônias em 100 mL de

meio Luria Bertani líquido seguido de uma centrifugação em tubos de 50 mL. Os precipitados que formaram, foram tratados com as soluções P1, P2 e P3, e o plasmídeo foi lavado com isopropanol e LiCl a 8 M. O isolamento e o sequenciamento de Sanger, foram realizados no Centro de Genômica da ESALQ – Piracicaba/ SP.

Considerando as especificidades dos clones, oligonucleotídeos apropriados foram utilizados nas reações de sequenciamento (pEP-miR-Seq *sense*: 5' – TCCTCAGCCGTCGCTTCATG – 3' e pEP-miR-Seq *anti-sense*: 5' – GTGTGGGGAACTCCATCGC – 3'). Para analisar a eficácia das clonagens, os resultados de sequenciamento foram submetidos ao software *BioEdit* v7.2.5 (Tom Hall – Ibis Biosciences).

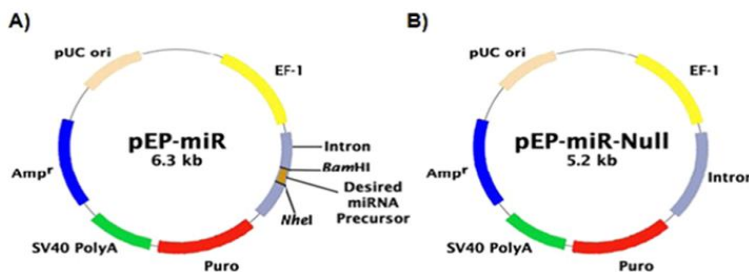
### **3.3.6. Estabelecimento dos clones celulares**

Para o estabelecimento dos clones, LX-2-pEP-miR-Controle, LX-2-pEP-miR-1179, LX-2-pEP-miR-1254, células LX-2 crescidas em 10% de FBS foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes utilizando *Lipofectamine*® 2000 *Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As condições de transfecção foram adaptadas de acordo com recomendações do fornecedor. Para o estabelecimento de controles experimentais, o vetor *miRNASelect*™ *pEP-miR Null Control Vector* (Cell Biolabs Inc.) foi utilizado nas transfecções. Os vetores originais utilizados estão representados esquematicamente na Figura 5.

O vetor *miRNASelect*™ *pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc. - Figura 5A) permite a clonagem das sequências de DNA precursoras de miRNA entre os sítios de *Bam* HI e *Nhe* I e possui a região promotora EF-1 $\alpha$  (que garante alta taxa de expressão em células de mamíferos). Além disso, possui o marcador de resistência à Puromicina (seleção estável de células transfectadas), o sinal SV40 PoliA (que garante a terminação da transcrição), a origem de replicação pUC (que promove alta taxa de replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*) e o gene de resistência à ampicilina para a seleção de clones bacterianos. Quando da transfecção celular, o plasmídeo viabiliza a expressão exógena do miRNA clonado nas células eucariotas.

O vetor controle *miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector* (Cell Biolabs Inc. - Figura 5B) é parecido ao vetor de clonagem de expressão, exceto pela ausência do precursor de miRNA e dos sítios de clonagem *Bam* HI e *Nhe* I.

**Figura 5** - Representação esquemática dos vetores de clonagem. A) Vetor de clonagem *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.) utilizado no estabelecimento dos clones LX-2 quiescidas clone 1179, LX-2 quiescidas clone 1254, LX-2 ativadas clone 1179 e LX-2 ativadas clone 1254. B) Vetor controle *miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector* (Cell Biolabs Inc.) utilizado para estabelecimento dos clones LX-2 quiescidas clone Controle e LX-2 ativadas clone Controle.



Fonte: Cell Biolabs Inc

Para a realização das transfecções,  $2 \times 10^4$  células LX-2, foram cultivadas em meio contendo 10% de SBF em placas de 24 poços. Os plasmídeos foram diluídos à concentração de  $3 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ , em microtubos de 1,5 mL contendo  $50 \mu\text{L}$  meio Opti-MEM, e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em um novo microtubo de 1,5 mL, foram diluídos  $2 \mu\text{L}$  de Lipofectamine® 2000 em  $50 \mu\text{L}$  de meio Opti-MEM, seguido de incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foi realizada a mistura do conteúdo dos dois microtubos, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, para que o complexo de transfecção fosse formado. Posteriormente, adicionou-se à placa de 24 poços contendo as células,  $300 \mu\text{L}$  de meio DMEM com 2% e 10% de SBF, para respectivas células, seguida de incubação à  $37^\circ\text{C}$ .

Depois de 6 horas de transfecção, trocou-se o meio da placa por DMEM com 10% de SBF, para respectivas células, e novamente, a placa foi incubada à  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. O meio foi então substituído por DMEM com 10% de SBF, para respectivas células, contendo puomicina nas concentrações recomendadas. Após subcultivos de aproximadamente duas semanas, os clones isolados das células

transfectadas foram separados em microplacas individuais, até que a linhagem fosse considerada permanente. Os clones de interesse, correspondentes as novas linhagens LX-2 clones, sendo estas células estáveis, foram utilizados nos ensaios e armazenadas em nitrogênio líquido.

### **3.4. Análises de Microscopia**

#### **3.4.1. Marcação de núcleo e citoesqueleto**

Para a análise de todos os grupos celulares investigados nesse trabalho, as células foram cultivadas em duas diferentes concentrações de SBF (2% ou 10% de SBF) na presença ou ausência de Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M. Para isso,  $1,6 \times 10^4$  células foram cultivadas em placas de 24 poços e crescidas até a confluência de aproximadamente 90%. Em seguida, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 3,7% e Triton 0,05% e incubadas com solução de albumina bovina (BSA) a 1%, por 2 horas. Para a imunomarcação do citoesqueleto foi utilizada Faloidina-TRICT (*Sigma*) a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em BSA a 0,5%, por 2 horas; após sucessivas lavagens em tampão salina de fosfato (PBS) (PBS 0,5x = 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/2$ ) o núcleo celular foi contra corado em 3 minutos, com 4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) (*Sigma-Aldrich*) na concentração de 3,33 ng/  $\mu\text{L}$  diluído com PBS 0.5x, após sucessivas lavagens, com PBS 0.5x, foram montadas lamínulas com N-propilgalato que foram analisadas em microscópio *OLYMPUS* BX51. Para análise da Faloidina-TRICT, a excitação máxima foi de 541 nm e emissão máxima 572 nm e do DAPI foi utilizada excitação máxima 372 nm e emissão máxima 456nm.

#### **3.4.2. Marcação de lipídios pelo método *Oil Red 3***

Para as análises das gotículas de lipídios, foram submetidos todos os grupos celulares investigados nesse trabalho (LX-2 quiescidas, LX-2 ativadas, LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), LX-2 quiescidas clone 1179 ou 1254 e LX-2 ativadas clone 1179 e 1254. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, sendo fixadas com solução formol cálcio, por 30 minutos, com posterior lavagem

em PBS 0,5x. Em seguida, foi adicionado propilenoglicol 100% (*Merk*), que permaneceu por um intervalo de 5 minutos, seguido da adição da solução de *oil red* a 0,7%, por 7 minutos, sob agitação. Em seguida, o material foi incubado em propilenoglicol 85% V/V por 3 minutos e lavado com água destilada. Por último, foi adicionada hematoxilina, por 1 minuto. Após sucessivas lavagens com água corrente, as lâminas foram montadas com auxílio de glicerina e analisadas em microscópio óptico, utilizando-se microscopia de contraste de fase (*OLYMPUS BX51*).

### 3.5. Análise de expressão gênica em reações de polimerização em cadeia semi quantitativa (RT-PCR)

Células LX-2 quiescidas e ativadas - clone 1179 e -1254, foram submetidas a extração de RNA, seguido de reações de transcrição reversa, para a síntese de cDNA, como descrito no item 3.2.

Os cDNAs foram utilizados como moldes em reações de PCR. Genes de vias específicas ao processo fibrosante e outros ao citoesqueleto foram amplificados utilizando os seguintes conjuntos de iniciadores (TABELA 1) (*Life Technologies*):

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR de genes de vias correlacionados ao processo fibrosante, com suas respectivas T<sub>m</sub> e tamanho do *Amplicón*.

Gene	Primer Sense (5´- 3´)	Primer Antisense (5´- 3´)	TM	Tamanho do Amplicón (pb)
<i>FN1</i>	ACGCATCACTTGCCTTCTA	CCACAGAGTAGACCACACCA	49	350
<i>SMAD3</i>	CTTTGAGGCTGTCTACCAGT	TGACAACAATGGGTTGAGTA	44	294
<i>SMAD4</i>	TCACCTGGAATTGATCTCTC	ATGCTATCTGCAACAGTCCT	45	313
<i>SMAD7</i>	AGCCCTCTCTGGATATCTTC	CTGTACGCCTTCTCGTAGTC	49	286
<i>Vimentina</i>	GCTCAGATTCAGGAACAGCA	TTCCAGGGACTCATTGGTTC	49	285

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir do programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). As PCRs foram realizadas utilizando temperaturas de anelamento adequadas, e os produtos foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com gel vermelho (*GelRed*<sup>TM</sup> –



UNISCIENCE), e fotografados utilizando DNR – Bio *Imaging Systems Minibis Pro*, *Model Minibis 16mm* e o programa *Imaging Systems – Gel Capture*. O gene endógeno de referência utilizado foi a  $\beta$ -actina. Os amplicons gerados apresentam tamanho entre 270 a 300pb. As bandas foram quantificadas com *Software Image J* versão v1.49n.

### **3.6. Análise de expressão gênica por reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

Para as análises através de qRT-PCR os cDNAs de LX-2 quiescidas, LX-2 ativadas, LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), LX-2 quiescidas e ativadas clones 1179 e - 1254, foram utilizados em reações contendo *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. Essas reações mensuraram a expressão de genes correlatos ao processo fibrosante e a elementos do citoesqueleto. As reações foram realizadas adaptando as recomendações do fornecedor do reagente em placas de 96 poços (*MicroAmp® Optical 96 Well Reacion Plate – Applied Biosystems*), que foram seladas com o adesivo óptico (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film – Applied Biosystems*) ao final do procedimento.

Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para todos os genes avaliados e as análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ( $\Delta$ CT), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras. Os níveis dos genes alvos foram normalizados pelos níveis do controle endógeno ( $\beta$ -actina), os amplicons apresentaram em média 120 pb e os resultados foram calculados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo normalizado ( $2^{-\Delta C_t}$ ). A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho *ABI 7500 Applied Biosystems*.

Genes de vias específicas ao processo fibrosante e outros ao citoesqueleto foram amplificados utilizando os seguintes conjuntos de iniciadores (Tabela 2) (*Life Technologies*):

**Tabela 2:** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR de genes relacionados ao processo fibrosante e a elementos do citoesqueleto, juntamente com o tamanho do Amplicón.

<b>Gene</b>	<b>Primer Sense(5'- 3')</b>	<b>Primer Antisense(5'- 3')</b>	<b>Tamanho do Amplicón (pb)</b>
<i>AKT1</i>	CGGGCACATTAAGATCACAG	TCATTGTCCTCCAGCACCTC	98
<i>Col1A1</i>	ATGACGTGATCTGTGACGAG	AAATTCCTCCGGTTGATTTTC	110
<i>Col1A2</i>	AGCTGTTGGTAACGCTGGTC	CAGGATTACCAGGAGGTCCA	98
<i>CTGF</i>	GCTGACCTGGAAGAGAACAT	ACAGCGATTCAAAGATGTCA	81
<i>Desmina</i>	CTACACCTGCGAGATTGACG	TGTTGTCTCTGGTAGCCACTG	110
<i>EPCAM</i>	GGTTGTGGTGATAGCAGTTG	GCCTTCTCATACTTTGCC	93
<i>FEZ1</i>	GAGATCTCCCTCCTGAAGCA	CTTCAGCTGTGCCTTGAGAC	93
<i>FEZF1</i>	GTAACCAGTGTGGCAAAGCA	TGCCACAGAATTCACACACA	99
<i>IQGAP3</i>	TTCTTCCCAGAGACCACGGA	AGCCGGAAGAGGAAGAGACT	92
<i>ITGA2</i>	CACAGCAATGTGGGAATCAG	AGGTGAGAAGCTGGCTGAGA	86
<i>ITGA5</i>	TTGAGTCATTCGCCTCTGG	CCTCCGCGTCTAAGTTGAAG	217
<i>ITGA6</i>	AAATGCAGGCACTCAGGTTC	AGATCCCAGCGAGAATAGCC	107
<i>ITGAM</i>	CGGGAGTTCAACGTGACAGT	TTCCGGTAGGACAGGTCAAG	98
<i>ITGB1</i>	AATGAAGGGCGTGTTGGTAG	TTTCCTGCAGTAAGCATCCA	81
<i>ITGB6</i>	AGCAAAGTAGCAGGCATCGT	TCCAAGACAGTTGACATGGAGT	86
<i>ITGB8</i>	AGATTGCTGCTGGTGATG	ACAGTTTCCGTCATTGGG	86
<i>MICAL1</i>	TTCTACTGCCTCCAGCACCT	CCTGGTGGCATGCTATTCTC	110
<i>MICAL2</i>	TCCAGGCCTTCAACATTCTC	AGGTGGTCACCTTGGACTTG	93
<i>MICAL3</i>	TCCATAGATACCGCCCTGAC	AGCAATGTCAAAGGCCAGTT	89
<i>Ocludina</i>	AAAGAAGTCTCCCGTTTGGGA	GCAGATCCCTTCACTTGCTT	89
<i>PDGF</i>	CCCAGGAATTAAGTCCGGTCAA	ACAGCCACAATTTCTCCAC	84
<i>RAF1</i>	TAGGCCTCGTGGACAGAGAG	CTGTCCAAGTCCGATTGGGTC	81
<i>ROCK2</i>	ATGACACAGATGTGCGGAGA	CTTGATCATCTGCTGGGTCA	95
<i>TGFB1</i>	GACTCGCCAGAGTGGTTATC	GGAGCTGAAGCAATAGTTGG	80
<i>TGFB2</i>	GCACCTCCACATATACCAGT	GGCAATAACATTAGCAGGAG	80
<i>TJ</i>	GAACGAGGCATCATCCCTAA	GCTGCGAAGACCTCTGAATC	80
<i>Tubulina</i>	TCCAAGAAGCAGTAGCAGC	GAACAGGCAGCTTCTTCTTAGC	96
<i>WASL</i>	CCTCTTCACTTTCTCGGCA	AGCAACACCACTGCACTTCT	109
$\alpha$ -SMA	AATCCTGACCCTGAAGTACC	TAGAAAGAGTGGTGCCAGAT	84
<i>B-actina</i>	ATTGCCGACAGGATGCAGAA	GTAAGTTCGCTCAGGAGGAG	87

<i>B-catenina</i>	CCATTCCATTGTTTGTGCAG	CTTCTGCAGCTTCCTTGTC	87
-------------------	----------------------	---------------------	----

Os oligonucleotídeos foram desenhados como descrito no item 3.5.

### **3.7. Análise por *Western blot***

Os extratos celulares totais de LX-2 de todos os grupos celulares investigados nesse trabalho, a partir de células cultivadas em diferentes concentrações de SBF na presença ou ausência de Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M, foram preparados com a solução de tampão de lise (Triton X-100 0,5%, Tris HCl pH 7,2 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 1mM) acrescentada de 1 mM de inibidor de protease para cada extrato celular e incubados a 4°C por 25 minutos. O produto lisado foi, então, homogeneizado por sonicação (sonicador *Fisher Scientific, Sonic Dismembrator*, model 500), em 40% de amplitude por 20 segundos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos sob refrigeração de 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e as proteínas quantificadas em espectrofotômetro (595 nm), seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976). Para construção da curva padrão, utilizamos uma concentração padrão de albumina sérica bovina (BSA) a 500 ng/  $\mu$ L, em diversa diluições. Para cada amostra, 90  $\mu$ g de proteína juntamente com 4% (w/v) SDS e 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol na proporção 1:1, foram utilizados. Cada uma das amostras foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e, em seguida, submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% para separação das amostras, sob 300 V e 50 mA, durante aproximadamente 1 h e 30 minutos.

Após a eletroforese, as proteínas contidas nos géis foram preparadas para a transferência para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Os géis foram submersos em solução de transferência (25 mM Tris-HCl, 0,192 M de glicina, 10% metanol) por 10 minutos e as transferências foram realizadas por 30 minutos a uma corrente elétrica fixa de 18V, 300 mA, pelo aparelho transferidor do tipo *Semi-Dry*. Após o término da transferência, as membranas foram bloqueadas em Bloto [5% de Leite em pó desnatado contendo TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6)].

Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T (1M Tris-HCl pH 7.6, 5 M NaCl, 1% Twew 20), durante 7 minutos, e em seguida incubadas

com os anticorpos primário  $\alpha$ -SMA (*Sigma-Aldrich* A5228),  $\beta$ -actina, TGFB2 e Mical 2 (Cell Signaling). Os anticorpos foram diluídos em TBS nas concentrações de 1:350, 1:750, 1:500, 1:350, respectivamente. As incubações foram realizadas de uma maneira que as membranas foram mantidas a 4 °C por um período mínimo de 12 horas, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com TBS-T e incubadas a com o anticorpo secundário policlonal anti IgG de Coelho conjugado a peroxidase (*Cayman*) diluído com TBS na razão 1:6000 para  $\beta$ -actina, TGFB2 e MICAL2 e monoclonal Anti-rato IgG (*Sigma-Aldrich*) na concentração de 1:8000 para  $\alpha$ -SMA, por 3 horas, sob agitação a temperatura ambiente. Após, as membranas foram submetidas a sucessivas lavagens e em seguida reveladas. A detecção de sinais foi realizada com o *Western Blotting Luminol Reagent Kit* (GE) de acordo com as especificações do fornecedor.

Após a revelação e secagem dos filmes, as bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do software *Quantity One®*, *Biorad*) onde a densidade ótica de cada banda foi aferida.

### **3.8.ELISA**

Os sobrenadantes de todas as condições estudadas foram coletados para análise da produção de TGF- $\beta$ 1 utilizando-se o produto comercial *Multispecies* TGF- $\beta$ 1 (Invitrogen™ #KAC1688). Essa análise se baseia no teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), através do método de sanduíche, ou captura. Este método consiste na presença de um anticorpo primário específico ao antígeno, adsorvido no poço da microplaca. Em seguida o antígeno presente no sobrenadante é adicionado. Depois o segundo anticorpo específico ao antígeno marcado com uma enzima é adicionado. Esta enzima reage com o substrato fazendo com que o cromógeno mude de cor. A intensidade da coloração é diretamente proporcional a concentração de TGF- $\beta$ 1 na amostra. A análise da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm utilizando o leitor RChisto Infinite M200 PRO TECAN. Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

### **3.9. Análises estatísticas**

Os resultados das análises de qPCR foram estatisticamente analisados com o auxílio do programa Graph Pad *Prism*® 3.0 software, através do teste *One Way* ANOVA seguido de análise de *Dunnett*. O nível de significância adotado foi de  $*p \leq 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%.

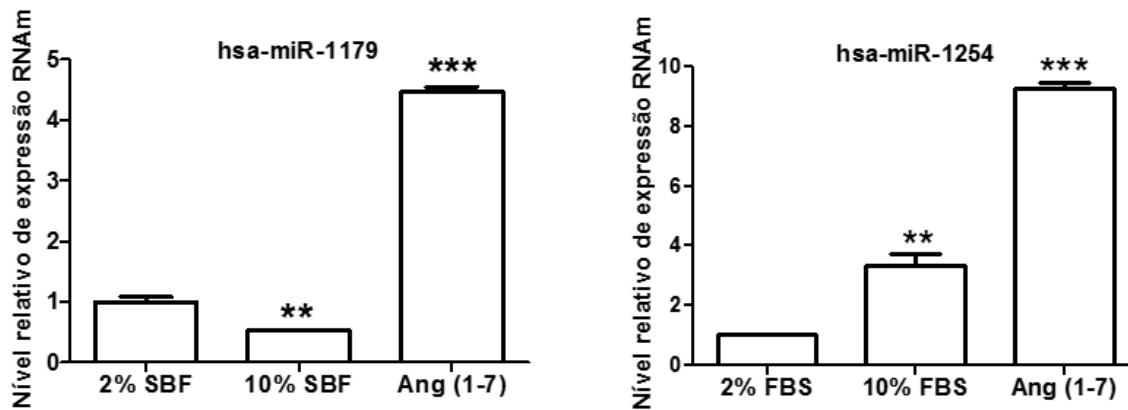
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Análises preliminares**

Considerando as análises prévias, objetivou-se avaliar os efeitos pontuais dos miRNAs-1179 e 1254 na transdiferenciação celular e na alteração do citoesqueleto da células LX-2, de maneira comparativa aos resultados obtidos quando do tratamento com a Ang-(1-7).

Inicialmente foi avaliado o efeito das diferentes condições de cultivo celular no padrão de expressão dos miR-1179 e miR-1254 (Figura 6).

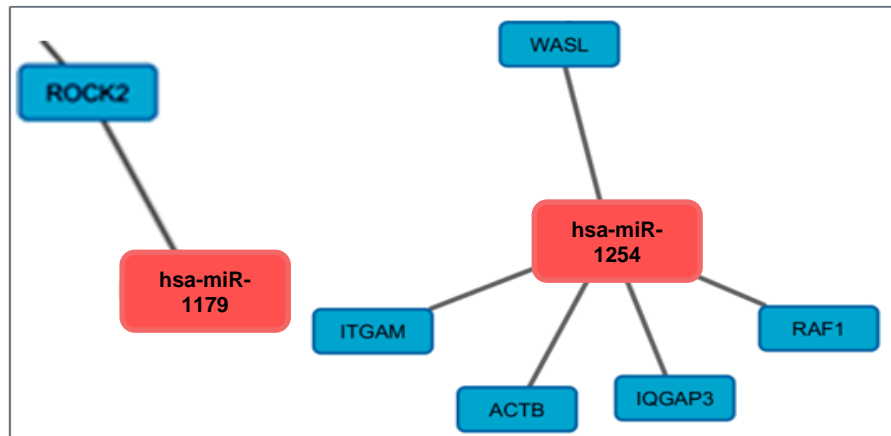
**Figura 6** - Nível de expressão relativa dos miRNAs hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254 em células LX-2 cultivadas a 2 e 10% de SBF e a 10% de SBF, tratada com Ang-(1-7). A expressão gênica relativa apresentada nos gráficos foi normalizada em relação ao gene  $\beta$ actina. Para análise estatística foi utilizado o teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ . Legenda: SBF – Soro bovino fetal



Com o aumento expressivo da expressão dos miRNAs em análise, optou-se pela obtenção de um clone celular que superexpressasse tais moléculas, para uma análise funcional dos mesmos no equilíbrio e na transdiferenciação das células LX-2.

Inicialmente foram construídas redes de interações moleculares que representam moléculas de RNA mensageiro que interagem com os hsa-miR 1179 e hsa-miR 1254. Para essas análises moléculas correlatas a sinalização celular, que envolvam elementos do citoesqueleto foram escolhidas no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e utilizando o algoritmo *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org/>), as pequenas redes foram construídas. A Figura 7 apresenta o painel geral dos miRNAs-1179 e -1254, e as moléculas que a eles se correlacionam.

**Figura 7:** Redes moleculares entre miRNAs, mRNAs e proteínas referente aos miRNAs 1179 e 1254, selecionados previamente, com seus alvos putativos. Considerando o banco de dados miRDB e o *Cytoescape*.

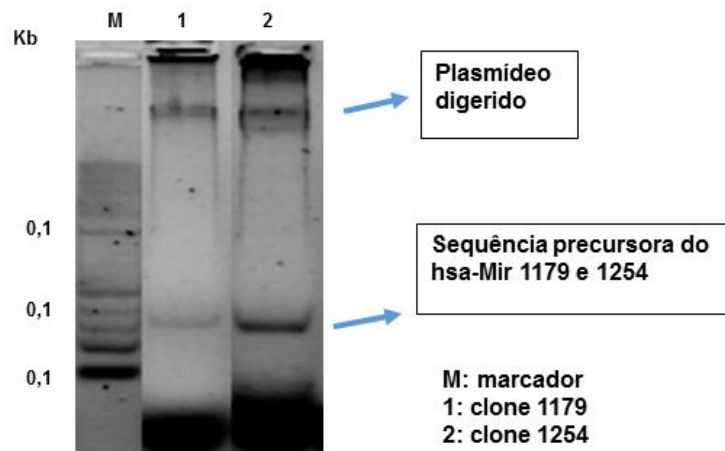


Fonte: (Santos, R. A. C. 2015).

#### 4.2. Análise das clonagens dos hsa-miR 1179 e hsa-miR 1254

Após as clonagens moleculares das sequências precursoras dos miRNAs 1179 e -1254 no vetor de expressão pEP-miR e posterior transformação em bactérias DH5 $\alpha$ , seguida de purificação, os plasmídeos recombinantes foram isolados e digeridos com as enzimas de restrição apropriadas. A partir de eletroforese em gel de agarose a 1.0%, foi confirmada a digestão nos sítios de restrição *Bam* HI e *Nhe* I, sendo o plasmídeo e as sequências precursoras dos miRNAs 1179 e -1254 (Figura 8). Os clones obtidos foram utilizados na transfecção celular.

**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 1.0%, corado com gel red, contendo a digestão, nos sítios de restrição *Bam* HI e *Nhe* I, de dois produtos de PCR de colônia, sendo M: marcador; 1: - clone 1179; 2: clone1254.

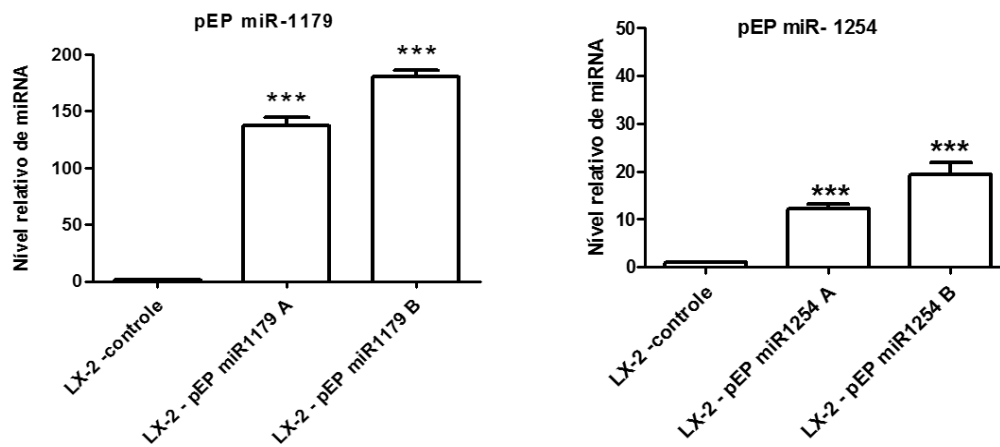


### 4.3. Análises dos clones celulares

Após a transfecção celular, clones estáveis foram selecionados e a eficácia da transfecção, foi avaliada pelo padrão de expressão dos miRNAs 1179 e 1254. A Figura 9 apresenta os resultados. As células controle representam células LX-2 não transfectadas e crescidas em 10% de SBF. Os clones 1179 e 1254 foram selecionados para serem avaliados na modulação dos elementos do citoesqueleto. A superepressão dos clones foi inicialmente objetivada, visando mimetizar os efeitos da Ang-(1-7) nas células estreladas, que nos ensaios preliminares demonstraram um aumento exacerbado.



**Figura 9:** Confirmação da transfecção celular por reação de qPCR. Nível de expressão relativa do miRNA hsa-miR-1179 e -1254 nos clones estabelecidos em relação às células LX-2 controle. A expressão gênica relativa apresentada nos gráficos foi normalizada em relação ao gene  $\beta$ -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde  $***p \leq 0.001$ .



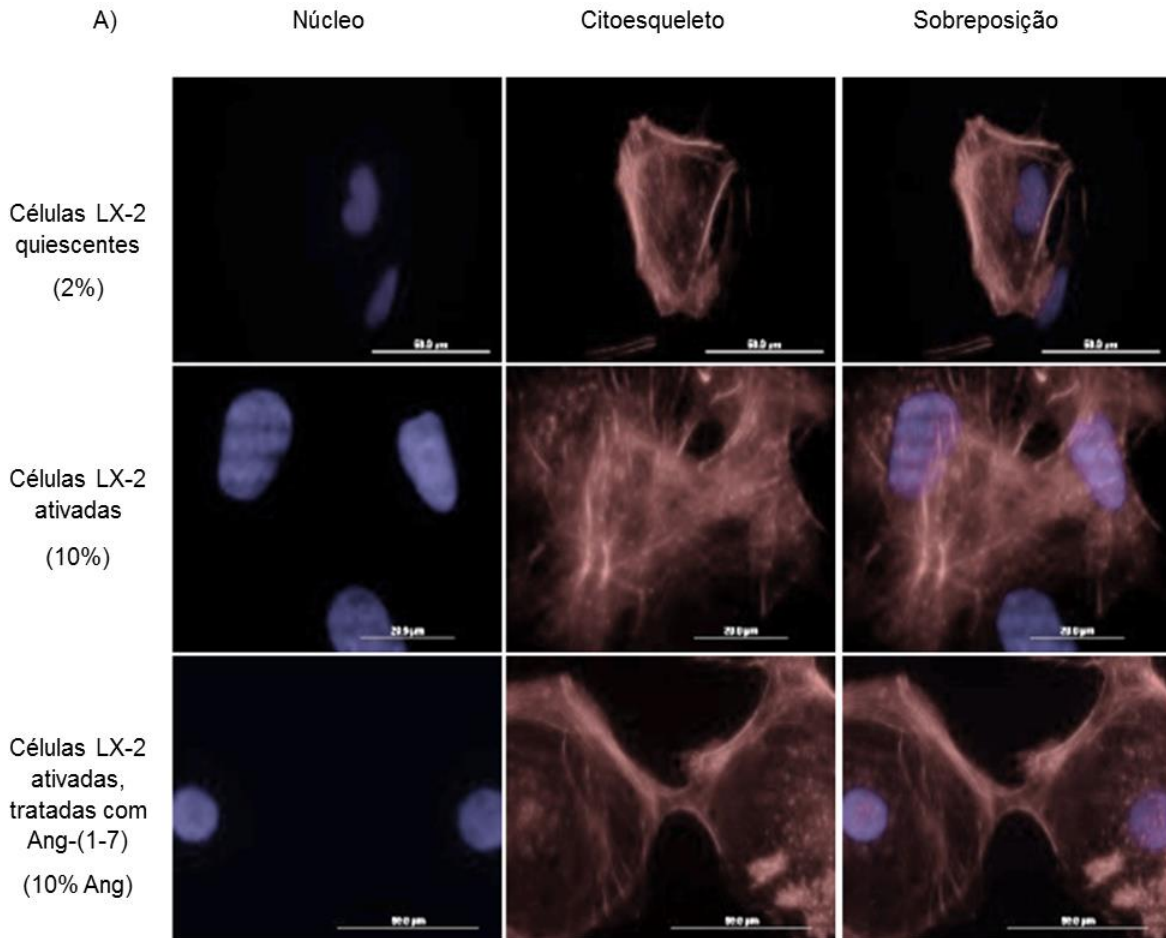
#### 4.4. Curva de crescimento das células LX-2

As análises demonstraram que as células LX-2 quiescidas possuem uma taxa de duplicação populacional de 41,7 horas e nas células ativadas essa taxa de duplicação (DT) é de 30,2 horas. Para as células tratadas com o heptapeptídeo o DT se assemelhou ao tempo encontrado nas células quiescidas e nas células tranfectadas com os pEP-miR 1179 e 1254, se assemelharam ao DT das células ativadas.

#### 4.5. Análises morfofisiológicas e moleculares das células LX-2

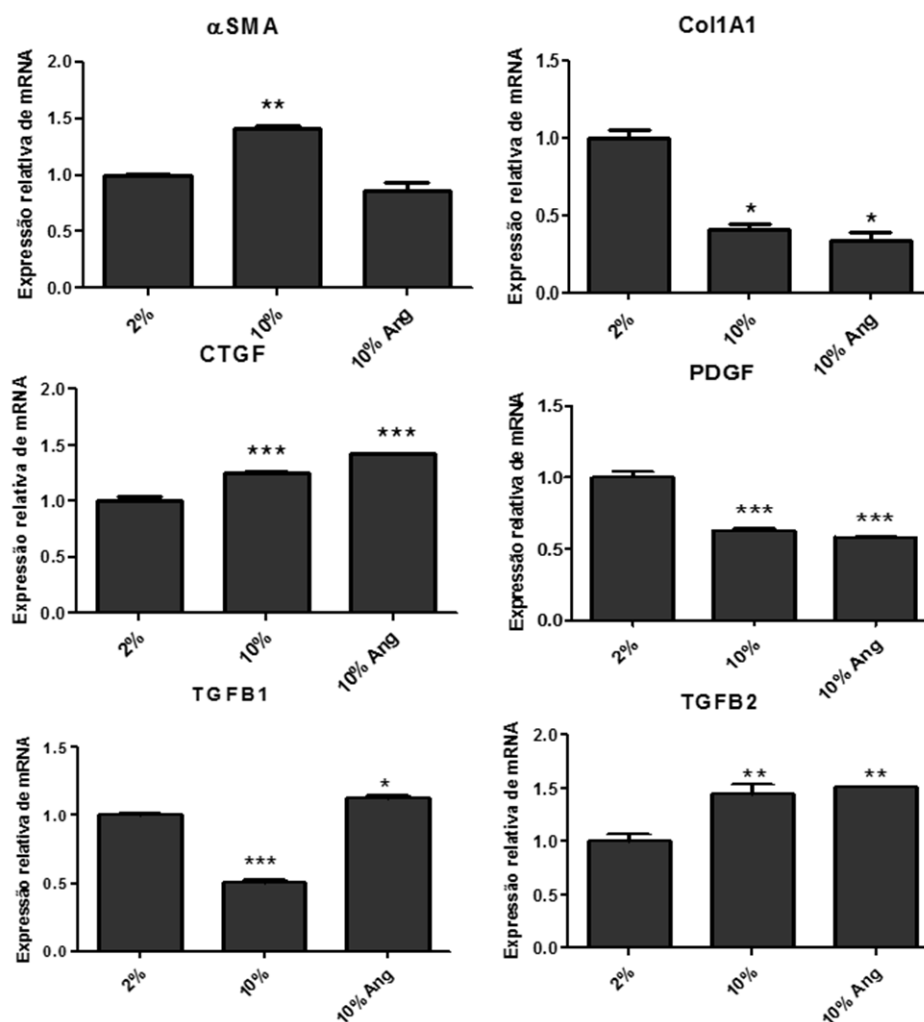
Para se avaliar o efeito das diferentes condições de cultura na modulação do processo fibrosante hepático e nas alterações do citoesqueleto foram realizadas várias análises. Inicialmente foi avaliado o efeito das diferentes concentrações de SBF na transdiferenciação celular assim como o efeito modulador do peptídeo Ang-(1-7) (Figura 10- A, B e C).

**Figura 10-A:** Análises de microscopia de células LX-2 quiescidas, ativadas e ativadas, tratadas com Ang.(1-7). (A): Investigação das alterações morfológicas nos filamentos de actina e núcleos.



Após as análises em microscópio de fluorescência, foram observadas alterações nas estruturas investigadas. Na Figura 10-A, observamos uma considerável despolimerização dos filamentos de actina nas células quiescidas; opostamente, tais despolimerizações não são observadas nas células ativadas e nessa condição de cultivo observa-se uma maior concentração de actina fibrilar. Quando das células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), foi novamente observada despolimerização dos filamentos de actina, como é observado nas células quiescidas. Em relação ao núcleo, não foram observadas alterações na sua forma.

**Figura 10-B.** Para as análises de expressão gênica foram utilizados RNAs oriundo das diferentes culturas das células, LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%) e LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang). Foram investigados os níveis de expressão dos mRNAs:  $\alpha$ SMA, Col1A1, CTGF, PDGF, TGF $\beta$ -1 e TGF $\beta$ -2. Os gráficos foram construídos utilizando-se o *software Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A LX-2 quiescida foi utilizada como controle.



Para avaliação das expressões gênicas foram realizados ensaios de qRT-PCR, e os genes investigados se caracterizam como marcadores do processo fibrosante hepático (Figura 10-B). A análise dos resultados demonstra que o gene  $\alpha$ -SMA aumenta a sua expressão em 50% nas células LX-2 ativadas quando comparado com os valores observados para as células quiescidas. Paralelamente, as ativadas, tratadas com o heptapeptídeo apresentaram reduzidos níveis de expressão do gene  $\alpha$ -SMA, que se assemelha com os níveis da cultura quiescida.

Os resultados do nosso modelo concordam com o descrito na literatura de que  $\alpha$ -SMA é regulada durante a ativação das células estreladas e apresenta um papel funcional durante a cicatrização do fígado. Essa proteína pode, ainda, influenciar na migração e na contratibilidade da célula estrelada, sendo estes fenótipos importantes durante o processo de fibrose (Weymouth et al., 2012). Uma vez, que a expressão de  $\alpha$ -SMA diminuiu nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7) e se assemelha aos níveis das culturas quiescidas. Dessa maneira, podemos interpretar como positiva a participação desse peptídeo na reversão do processo fibrosante hepático.

Em relação ao gene *Col1A1*, observa-se uma considerável redução no nível de expressão desse gene nas células LX-2 ativadas, quando comparado a expressão nas culturas celulares quiescidas. Esse resultado sugere que o peptídeo analisado não está interferindo na expressão desse gene, então não é relevante para as análises. Visto que o interesse do trabalho é encontrar alvos que modulem o processo fibrosante hepático, seja por elementos inflamatórios ou moduladores do citoesqueleto.

Para o gene *CTGF*, a análise dos seus níveis de expressão nas células ativadas foi mais alto que nas células quiescidas. Assim como nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7). O *CTGF* apresenta associação com a fibrose hepática (Brigstock, 2003), pois tem efeito mitogênico, sendo secretado por células endoteliais vasculares. Desempenha um papel na proliferação, produção da matriz extracelular, migração, diferenciação e adesão em muitos tipos celulares. Em análise sugerimos que a Ang-(1-7) atua de forma expressiva na regulação da expressão de *CTGF*.

A expressão do *PDGF* diminui no tratamento celular com ativação dos mecanismos pró-fibrosantes (LX-2 ativadas), assim como nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7). Os resultados sugerem a não participação desse fator no modelo celular investigado.

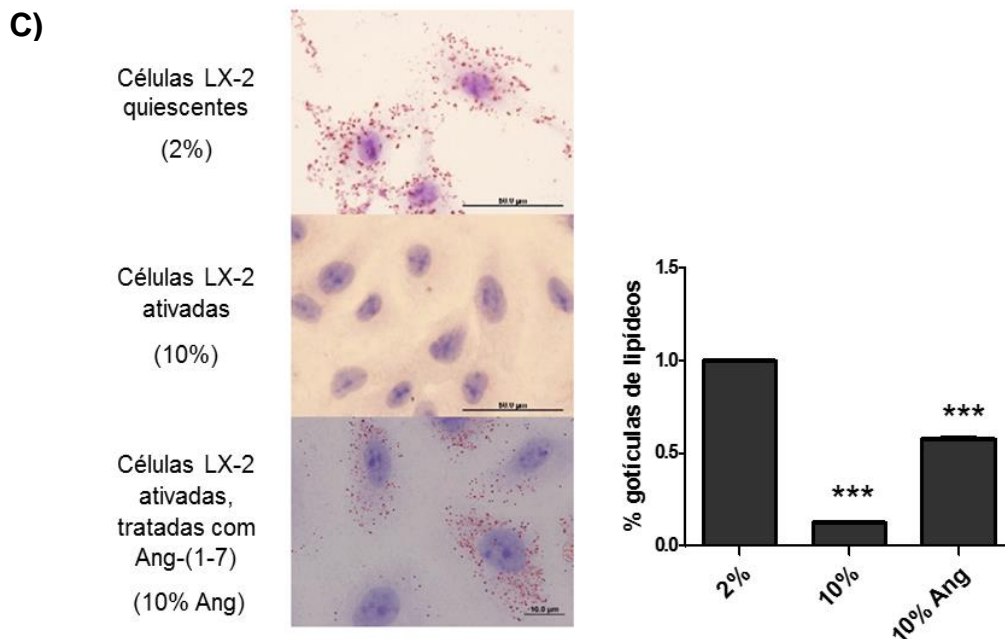
Prosseguindo em nossa análise, a expressão do fator *TGF- $\beta$ 1* demonstrou redução acentuada nas culturas LX-2 ativadas, quando comparado com os níveis dessa molécula nas culturas quiescidas. Opostamente, quando do tratamento

celular com o heptapetídeo, os níveis transcricionais desse fator assemelharam-se ao encontrado nas células quiescidas. O fator *TGF-β1* tem sido descrito como um mediador central na cicatrização de tecidos e na fibrose, onde atua em um estado já tardio (HUEN, MOECKEL, CANTLEY, 2013). E sua ativação é dependente da família *SMADs* (Item 4.7). Foram realizados ensaios de RT-PCR, onde foi identificado que nas células LX-2 ativadas, as *SMAD3* e *4* estão estatisticamente, com níveis de expressão gênica baixos (Figura 18), corroborando com nosso resultado de *TGF-β1*.

A mesma análise realizada para o fator *TGF-β2* apresentou uma oscilação nos níveis transcricionais semelhantes ao observado em *CTGF*. Para as células LX-2 ativadas, observou-se um aumento de 50% nos níveis de *TGF-β2*, quando da comparação com as células quiescidas. A análise para as células ativadas, tratadas com Ang-(1-7), demonstrou níveis transcricionais ainda maiores que os observados nas células ativadas. Nas doenças fibróticas, níveis elevados de *TGF-β2* levam à deposição patológica de proteínas da matriz extracelular (SCHNAPER et al., 2003; YU et al., 2003), uma vez que é sugerido que o *TGF-β2* poderia ser um fator de iniciação no remodelamento da matriz extracelular (ZODE, et al., 2011). Interessantemente, estudos realizados por Fuchshofe et al. (2005) demonstraram forte correlação entre a expressão de *TGF-β2* e *CTGF*, reforçando a viabilidade do nosso modelo celular para os estudos dos mecanismos da transdiferenciação celular na fibrose hepática.

Nas células estreladas hepáticas, é observado que elas não apenas secretam citocinas, como também respondem a elas, enfatizando a importância da sinalização autócrina nessas células (ELPEK, 2014). Pela análise geral dos resultados de microscopia e qRT-PCR, pode-se sugerir que no modelo celular utilizado nesse estudo, *Col1A1* e *PDGF* não estão influenciando na transdiferenciação das células LX-2. O detalhamento dessas vias poderá elucidar o efeito do peptídeo em uma modulação do quadro fibrosante hepático.

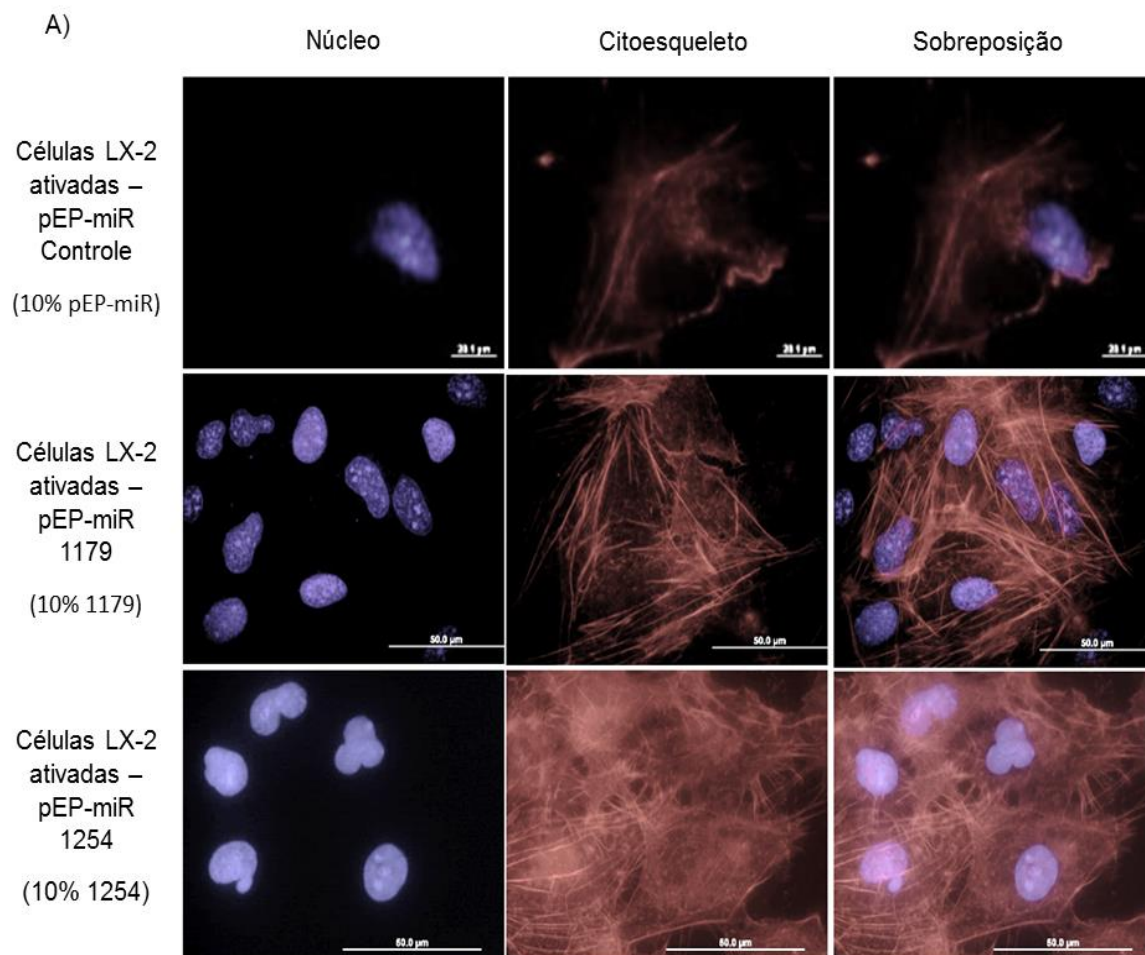
**Figura 10-C.** Análise de microscopia de campo claro das LX-2 cultivadas em diferentes condições. Análise de gotículas de lipídios (*red oil*). O gráfico foi construído utilizando o *software Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A LX-2 quiescida foi utilizada como controle.



Visando reforçar a relevância do modelo de estudo e para avaliar os efeitos do heptapeptídeo na transdiferenciação das HSCs, foram avaliados os aspectos do correlacionados ao metabolismo de lipídeos. Nas células LX-2 quiescidas, foi observada a presença de gotículas de lipídeos, em contra partida, nas células LX-2 ativadas, não foi encontrado e nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7), observa-se novamente a presença das gotículas de gordura, mas ainda a quantidade é estatisticamente menor que a condição observada nas células LX-2 quiescidas (Figura 10-C). No entanto, como há o aparecimento das gotículas de lipídeos, podemos inferir que isso é resultado da influência do heptapeptídeo no metabolismo de lipídios e reforça o envolvimento do mesmo na transdiferenciação das células LX-2. Classicamente, as HSCs apresentam a capacidade de armazenar gotículas de lipídeos, ricas em retinol em seu estado quiescida. Quando ativadas ocorre redução das gotículas de lipídeos no citoplasma. Essas características foram previamente descritas por Anthony et al. (2010), corroborando com os resultados encontrados e mais uma vez validando o modelo de investigação.

Em seguida, foi avaliado o efeito da superexpressão dos miRNA-1179 e 1254 nas células quiescidas e ativadas para avaliar o efeito dos mesmos na transdiferenciação celular e nos elementos do citoesqueleto. Essas análises se respaldam no fato da busca pela melhor condição de estudo para a avaliação do efeito dos miRNAs na modulação dos elementos investigados. A Figura 11–A, B e C, apresentam os resultados das células LX-2 ativadas clones 1179 e 1254.

**Figura 11- A:** Análises de microscopia e bioquímica de LX-2 ativadas clone controle, -1179 e - 1254. Investigação das alterações morfológicas no núcleo e nos filamentos de actina.

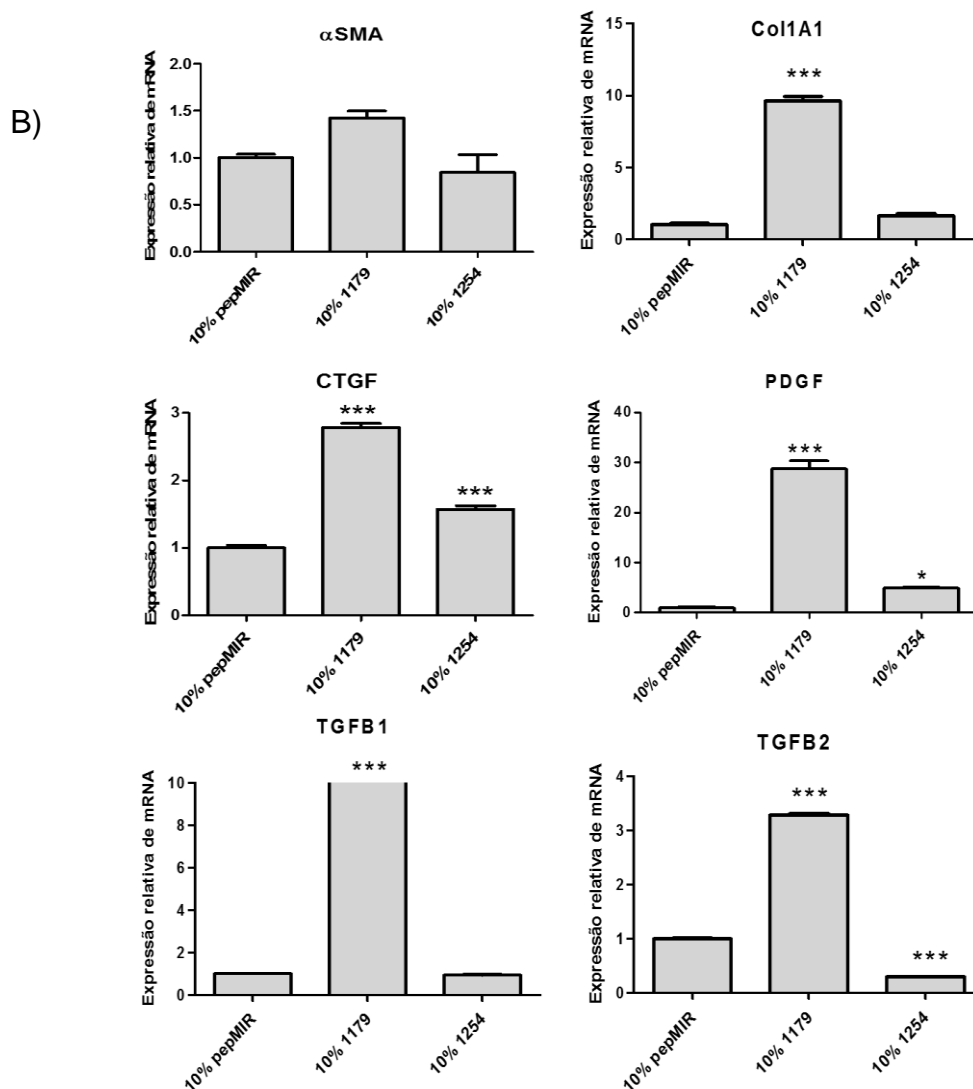


Para analisar alterações morfológicas no citoesqueleto e núcleo, células LX-2 ativadas clone controle, -1179 e -1254 foram coradas com Faloidina-TRICT e DAPI, respectivamente. Após as análises em microscópio de fluorescência foram

observadas alterações nas estruturas investigadas. Como observado na Figura 9A, nota-se que os filamentos de actina nas células clone controle, apresentam-se relativamente despolimerizados, mas não resultam na perda da estrutura celular. A disposição dos filamentos de actina nas células controle reporta a normalidade celular. Por sua vez, nas células LX-2 ativadas clone 1179, os filamentos de actina se encontram mais acentuadamente polimerizados e estão completamente dispostos ao acaso, apresentando, ainda, fibras curtas. Nas células LX-2 ativadas clone 1254, observa-se uma total desorganização dos filamentos de actina e os mesmos se apresentam mais despolimerizados que as LX-2 ativadas clone 1179. Em relação ao núcleo, não foram observadas alterações na sua forma.



**Figura 11-B.** Para as análises de expressão gênica, foram utilizados RNAs oriundo das culturas celulares LX-2 ativada clone controle (10% pEP-miR), LX-2 ativada clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). Foram investigados os níveis de expressão dos mRNAs:  $\alpha$ SMA, *Col1A1*, *CTGF*, *PDGF*, *TGF $\beta$ -1* e *TGF $\beta$ -2*. Os gráficos foram construídos utilizando o *software Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A LX-2 ativada clone pEP-miR (10% pEP-miR) foi utilizada como controle.



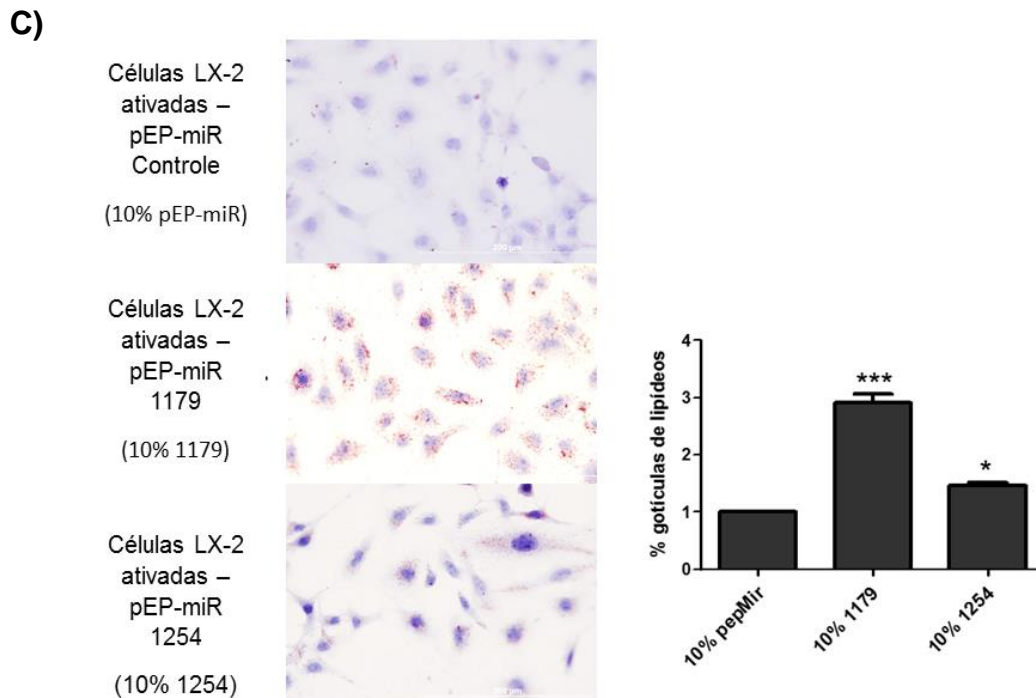
Na avaliação das expressões gênicas foram observadas que os resultados de expressão de RNA e genes marcadores do processo fibrosante hepático para as LX-2 ativadas clone 1179, demonstram um aumento exponencial dos níveis transcricionais de  $\alpha$ SMA, *Col1A1*, *CTGF*, *PDGF*, *TGF- $\beta$ 1* e *TGF- $\beta$ 2* (Figura 11-B). Considerando algumas particularidades nas culturas LX-2 ativada clone 1179, que

necrosaram frequentemente em períodos longos de cultivo (dados não mostrados), podemos concluir que a superexpressão do miR-1179 é negativa para a manutenção do equilíbrio celular da LX-2. Essas observações são reforçadas pelo trabalho de Hosaka et al. (2013), que apontam como negativo os aumentos expressivos de *CTGF* e *PDGF* no controle do crescimento tumoral. Além disso, o aumento dos fatores  $TGF-\beta 1$  e  $TGF-\beta 2$  também se correlacionam com a agressividade de tumores (KUBICZKOVA et al., 2012; MAJUMDAR et al, 2012 e CALON et al., 2015). Assim, observamos que a superexpressão do miR-1179 nas células LX-2 de maneira isolada não é positiva. Opostamente, o tratamento com a Ang-(1-7), nas células ativadas, atua na modulação sistêmica de vários miRNAs que atuando em conjunto trazem um efeito positivo.

Prosseguindo, a análise de qRT-PCR para a expressão de genes correlatos ao processo fibrosante hepático nas células LX-2 clone 1254, os resultados demonstraram alterações em seu padrão de expressão, em relação ao clone controle, com exceção do  $\alpha SMA$  e  $TGF\beta-1$ . Os níveis transcricionais de *CTGF* e *PDGF*, apresentaram um aumento significativo, mas *Col1A1* diminuiu. Assim como o  $TGF-\beta 2$  que reduziu em aproximadamente 70% em relação a cultura controle, o que se torna expressivo. Essa importante citocina, em níveis elevados, leva a ativação de proteínas da MEC e de outros mediadores fibróticos (FRIEDMAN, 2008) e sua via atua em sinais primários na fibrogênese. Desse modo, a superexpressão do miR-1254 nas células LX-2 ativadas pode estar colaborando com o controle da fibrose hepática.

Para análise comparativa dos efeitos fisiológicos da superexpressão dos miRNAs em estudo, foram também avaliadas a modulação das gotículas de lipídeos nas células LX-2 ativadas clone controle, 1179 e 1254 (Figura 11-C).

**Figura 11 - C.** Análise de microscopia de campo claro da LX-2 cultivada em diferentes condições, análise de gotículas de lipídios (*red oil*). O gráfico foi construído utilizando o *software Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A LX-2 ativada clone pEP-miR foi utilizada como controle.



Em todas as culturas celulares transfectadas, são observadas as gotículas lipídicas e em maior número nas células LX-2 ativadas clone 1179. Esses resultados concordam com o trabalho de Plötz et al., (2016) que demonstra uma correlação entre a toxicidade do meio e o acúmulo de gotículas lipídicas, em algumas situações. Esse padrão de formação de gotículas diferenciais nos estados fisiológicos e patológicos vêm sendo investigados pelo nosso grupo (dados não publicados) e fazem parte de outra rede de interações metabólicas e bioquímicas. Em conclusão, observam-se os efeitos deletérios da superexpressão do miR-1179 e promissores do -1254 no estudo dos mecanismos moleculares que subsidiam o processo fibrosante hepático.

Para completar a análise, foi avaliado o efeito da superexpressão dos miRNA-1179 e 1254 nas células quiescidas. A avaliação se deu através de ensaios de microscopia de fluorescência, análise de genes marcadores de fibrose e avaliação das

gotículas de lipídeos no respectivo grupo celular. No entanto os resultados não foram significativos, ou seja, não houve o processo de transdiferenciação para fibrose. Dessa maneira, nossas seguintes análises foram realizadas somente com o grupo LX-2 quiescidas, LX-2 ativadas, LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) e LX-2 ativadas clone 1179 e 1254.

Os resultados até aqui apresentados referentes às culturas celulares LX-2 investigadas neste trabalho evidenciam que:

- Há funcionalidade do modelo celular estabelecido para a investigação dos mecanismos moleculares relacionados com a transdiferenciação celular e a fibrose hepática (Figura 10 A-B-C), com exceção das células LX-2 quiescidas clones pEP-miR.
- Os efeitos moleculares e morfológicos da Ang-(1-7) nas células LX-2 ativadas se diferenciam das células LX-2 ativadas que superexpressão os miRNAs 1179 ou 1254. Esse resultado sustenta a complexa transativação de elementos pelo heptapeptídeo e não somente dos miRNAs investigados;
- Nas células ativadas clones 1179 e 1254, destaca-se que o miRNA-1179, quando superexpresso de maneira pontual nas culturas hepáticas, é deletério (considerando essas observações, a análise conjunta dos resultados não é apresentada). Entretanto, deve ser futuramente explorado para se caracterizar possíveis elementos que regulam o desenvolvimento de tumores nas células em níveis avançados de fibrose hepática.
- Nas células LX-2 quiescidas, que superexpressaram os miRNAs 1179 ou 1254, não apresentaram resultados significativos, ou seja, nesse grupo, as células mantiveram seu estado quiescida. Dessa maneira não foi sustentado o seu uso na investigação do processo de diferenciação da fibrose hepática. Nas próximas análises este grupo celular não foi mais avaliado.

#### **4.6.Redes de interações moleculares: avaliação do perfil de expressão de genes moduladores do citoesqueleto**

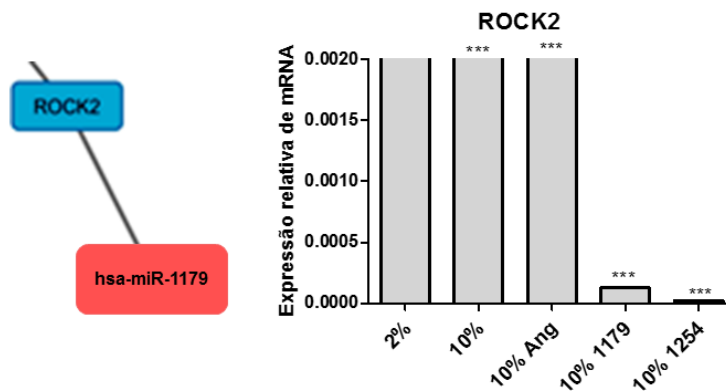
Para avaliar sistemicamente a atuação dos miRNAs 1179 e 1254 na transdiferenciação das células LX-2 e comparar esses efeitos com a atuação do

peptídeo Ang-(1-7), foram realizadas análises preliminares de bioinformática, como demonstrado anteriormente (Figura 5). Com essa análise foram identificados alvos putativos de interação entre os miRNAs investigados e RNAs de elementos do citoesqueleto. Em seguida, oligonucleotídeos foram desenhados para ensaios de mensuração da expressão gênica e as Figuras 12 e 13 apresentam os resultados.

#### 4.6.1. mRNA alvo do miRNA 1179

A análise prévia de bioinformática apontou o mRNA *ROCK2* como putativo alvo de interação do miRNA 1179 (Figura 12). A análise de expressão gênica para todas as condições de cultivo celular, apresentou redução nos níveis desse mRNA, quando comparados com as células LX-2 quiescidas (2%).

**Figura 12:** Nas análises de expressão gênica utilizando qRT-PCR, para avaliação da ativação transcricional do gene *ROCK2*, foram utilizados RNAs oriundos das culturas celulares LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). A análise de bioinformática foi realizada utilizando-se o Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>). O gráfico foi construído utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5* e a análise estatística foi calculada utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A quantificação da expressão relativa dos genes de interesse foi feita em relação à expressão do gene de referência  $\beta$ -actina e as LX-2 quiescidas (2%) foram utilizadas como controle.



Muitos estudos apontam que a sinalização RhoA / ROCK desempenha um papel na regulação do tônus vascular e na patogênese de doenças vasculares. (LAU et al., 2006; COUZENS, SARIDAKIS, SHSCID, 2009).

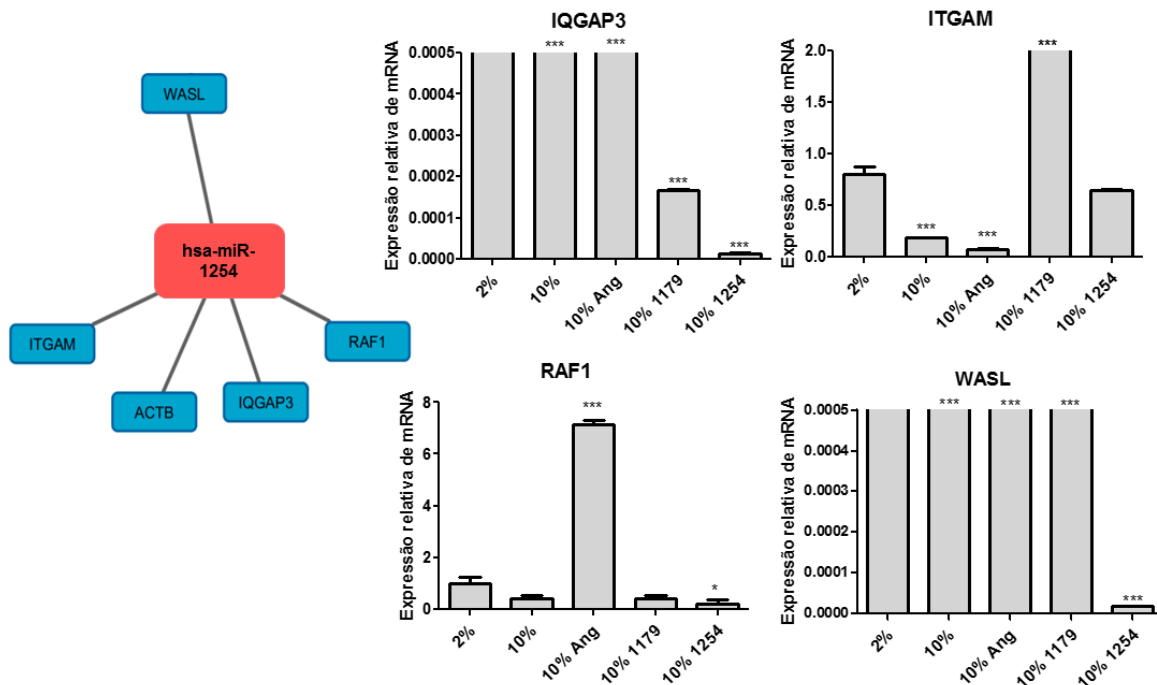
O tônus é regulado pela contração das células musculares (VSMC) sobre a parede dos vasos sanguíneos. Por sua vez, a contração da musculatura lisa é

fortemente acoplada à fosforilação da cadeia leve de miosina, e Rock2 se correlaciona com a fosfo-regulação da cadeia leve de miosina (JOHNSON, 1987). Wang et al., (2009), realizaram um experimento de silenciamento da proteína *ROCK2* em células A7r5, que são células musculares lisas derivadas da aorta de ratos, e demonstraram que houve uma diminuição na fosforilação na cadeia leve de miosina. As células *ROCK2*-silenciadas foram coradas com faloidina, para observação dos filamentos de actina. Notou-se que as células exibiram fibras de estresse abundante, e as fibras de estresse eram curtas e o arranjo ao acaso. Nota-se, então, que nas condições investigadas existe um aumento significativo nos níveis transcricionais de *ROCK2* nas células ativadas e nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) em relação as células LX-2 quiescidas e há diminuição da expressão de *ROCK2* nas células LX-2 ativadas clone 1179 e 1254. Esse resultado colabora com a desorganização dos elementos que compõem o citoesqueleto. Particularmente para as células ativadas clones 1179 e 1254, a redução expressiva desse transcrito deva estar interferindo na ativação de *ROCK2* e resultando no padrão de organização dos feixes de actina (Figura 11-A).

#### **4.6.2. mRNAs alvo do miRNA 1254**

A análise prévia de bioinformática para as células ativadas clone 1254 apontou os genes *IQGAP3*, *ITGAM*, *RAF1* e *WASL* como alvos putativos de interação com o microRNA (Figura 13). O gene *ACTb* (B-actina) é utilizado como normalizador nos ensaios de qRT-PCR, por não apresentar alterações na sua expressão. Em seguida, foram realizados ensaios de expressão gênica para as moléculas de interesse.

**Figura 13:** Nas análises de expressão gênica utilizando qRT-PCR, para avaliação da ativação transcricional dos genes *IQGAP3*, *ITGAM*, *RAF1* e *WASL*, foram utilizados RNAs oriundos das culturas celulares LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). Os gráficos foram construídos utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando-se ANOVA, onde  $*p < 0,05$  e  $*** p \leq 0.001$ . E a quantificação da expressão relativa dos genes de interesse foi feita em relação à expressão do gene de referência  $\beta$ -actina e a LX-2 quiescida foi utilizada como controle.



Os genes apontados como alvos do miRNA 1254 e que estão correlacionados com a modulação do citoesqueleto classificam-se como GTPase (*IQGAP3*), elementos de adesão célula-célula ou adesão célula-matriz (*ITGAM*), quinase (*RAF-1*) e elemento estrutural (*WASL*). A análise conjunta dos resultados referente ao gene *IQGAP3*, demonstra uma redução global da expressão desse gene em todas as condições, quando comparadas com as células LX-2 quiescidas. Ou seja, não está interferindo no processo de transdiferenciação celular, não sendo, portanto, relevante em nossas análises. A expressão de *IQGAP3* está especificamente confinada a células em proliferação (NOJIMA et al., 2008). Como parte da família Rho GTPases o *IQGAP3* desempenha papéis críticos em várias situações, tais como crescimento celular, metástase, morfogênese, organogênese e patogênese (FUKATA, KAIBUCHI, 2001). Em seguida, na análise da expressão

de *ITGAM* verificou-se uma superexpressão somente nas LX-2 ativadas clone 1179. Essa proteína, pertence à família das integrinas, que se classificam como proteínas transmembranas heterodiméricas e que pertencem ao grupo de moléculas de adesão celular, célula-matriz ou célula-célula (AVRAAMIDES, GARMY-SUSNI, VARNER, 2008). Por suas características, essa proteína impacta em processos como embriogênese, cicatrização, inflamação e câncer (HYNES, 2002; MORGAN et al., 2007). Desse modo, corrobora com nossa hipótese de que o miR-1179, quando superexpresso em LX-2 ativadas induz fatores tumorais.

Continuando as análises do perfil de expressão gênica, *RAF-1* foi avaliado. Observou-se que seu nível de expressão teve um aumento considerável nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7). Essa é uma proteína pertencente à família de quinases (receptor de tirosina/quinase) que é ativado por mitógenos, estando envolvido na cascata de transdução de sinais de fosfatases (Leite et al., 2012). Particularmente, o aumento da expressão de *RAF-1* corrobora com os resultados da literatura (MURABAK, 1998), considerando-se que esse peptídeo transduz uma cascata de sinalização em células de maneira integrada. Estudos apontam ainda o papel da sinalização de Ras/Raf/MAPK na sobrevivência celular (LEITE et al., 2012). Assim, o peptídeo atua na reversão do processo fibrosante hepático, mas de maneira a garantir a sobrevivência celular e evadindo de mecanismos de morte. Estudos paralelos do nosso grupo e não publicados demonstram a não existência de apoptose nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7).

Prosseguindo, a análise de *WASL* foi realizada. Esse gene é classicamente descrito como um regulador do citoesqueleto, sendo um dos elementos envolvidos com a polimerização dos filamentos de actina. A análise dos resultados apresentados na Figura 14, demonstraram uma redução acentuada nos níveis transcricionais em todas as células ativadas. O que reforça as análises preliminares de microscopia de fluorescência, pois os filamentos de actina se apresentam mais desorganizados quando comparados com as células LX-2 quiescidas. O gene *WASL* pode estar atuando na transdiferenciação das células LX-2 em todos os tratamentos realizados.

Baseado no conjunto de resultados, mais uma vez a superexpressão do miR-



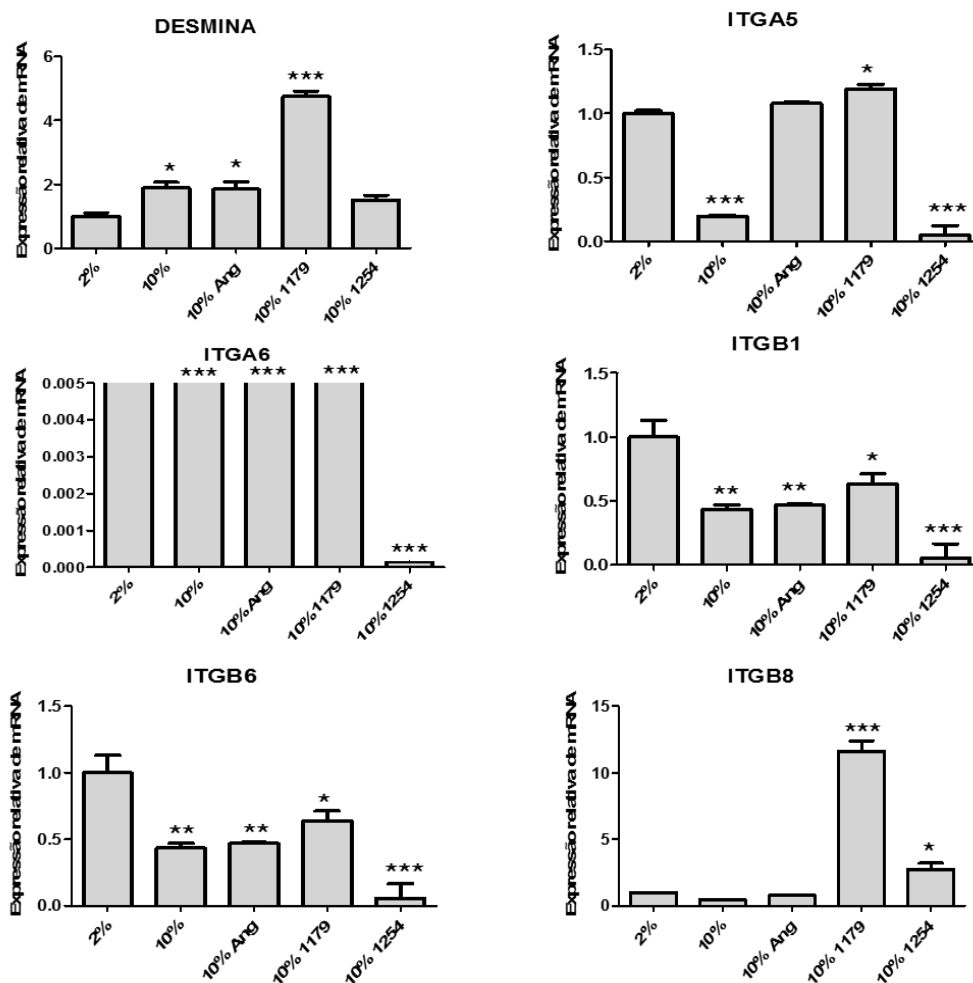
1179 nas células ativadas demonstra efeitos deletérios, sugerindo que esteja ocorrendo o processo de transdiferenciação do estado pró-fibrótico para o pró-tumoral. Opostamente o miR-1254, quando superexpresso nas LX-2 ativadas, demonstra ser promissor no controle e/ou reversão da fibrose hepática.

#### **4.6.3. Outros elementos moduladores do citoesqueleto: elementos de adesão**

Para elucidar o entendimento da modulação do citoesqueleto nas diferentes condições de cultivo das células LX-2, foram investigados outros genes relevantes na organização estrutural e funcional celular.

Primeiramente, foram feitas análises para avaliação da ativação transcricional dos genes *Desmina*, *ITGA5*, *ITGA6*, *ITGB1*, *ITGB6* e *ITGB8*. Os resultados são apresentados na Figura 14.

**Figura 14:** Na análise de expressão gênica utilizando qRT-PCR, para avaliação da ativação transcricional dos genes *Desmina*, *ITGA5*, *ITGA6*, *ITGAM*, *ITGB1*, *ITGB6* e *ITGB8*, foram utilizados RNAs oriundos das culturas celulares LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). O gráfico foi construído utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5* e a análise estatística foi calculada utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A quantificação da expressão relativa dos genes de interesse foi feita em relação à expressão do gene de referência  $\beta$ -actina e a LX-2 quiescida foi utilizada como controle.



As análises dos resultados demonstram particularidades para cada tratamento celular. A molécula *Desmina*, em relação à cultura quiescida, tem expressão transcricional aumentada, aproximadamente 100%, nas células LX-2 ativadas e nas LX-2 ativadas, tratadas com a Ang,-(1-7). Em relação às células LX-2 ativadas clone, o nível de expressão é de 5 vezes mais que o das células LX-2 quiescidas. Já nas LX-2 clone 1254, a expressão de *Desmina* é semelhante aos níveis das células LX-2 ativadas. O gene *Desmina* desempenha uma função crítica na

manutenção da integridade estrutural e mecânica das células e, especificamente nas células HSCs, ele promove maturação/ ativação celular, via o contato célula-células que elas medeiam (PAULIN, LI, 2004; FRIEDMAN, 2008). Desse modo, a expressão exacerbada encontrada no clone 1179, sugere um desequilíbrio funcional da proteína. Além disso, esse aumento exponencial nos níveis de *Desmina* é descrita como marca da fibrogênese (GONÇALVES et al., 2014), o que, então, não está ocorrendo nas LX-2 ativadas clone 1254.

Em relação às integrinas (IT), são observados padrões específicos em cada tratamento, comparados às células quiescidas. Em relação ao gene *ITGA5*, observa-se que as células LX-2 ativadas apresentam um nível transcricional muito baixo. Já nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), os níveis de expressão de *ITGA5* aumentam e se igualam ao nível de expressão ocorrido nas células quiescidas e nas LX-2 ativadas clone 1179, os níveis transcricionais aumentam significativamente, em relação às células quiescidas. Já nas LX-2 ativadas clone 1254, o nível de expressão apresenta-se mais baixo. Por sua vez, as integrinas são moduladoras chaves da proliferação, migração, longevidade e manutenção das funções específicas de diferenciação celular (FERRAZ, BONET, HERNANDEZ, 2014). A *ITGA5* tem a subunidade “ $\alpha 5$ ” presente, o que permite que a associação com *ITGB1* forme um receptor de fibronectina. Esta integrina pode promover a invasão tumoral (NAGAE, 2012). Em um estudo realizado com a depleção de *ITGA5* em células estaminais derivadas de tecido adiposo, foi observado que não houve diminuição significativa do número de células. Contudo, em estágio mais avançado, a perda de *ITGA5* resultou em uma perda numérica de células. Através da marcação com Anexina, pode ser notar que houve um aumento moderado de apoptose. Podemos supor, que em níveis muito alto de *ITGA5*, como ocorre nas LX-2 ativadas clone 1179, a proliferação celular é prejudicial, pois pode induzir tumorização. Em células com baixos níveis de *ITGA5*, como nas células ativadas e nas LX-2 ativadas clone 1254, pode sugerir a ocorrência de apoptose (MORANDI, 2016), mas esta pode ser controlada por vias de sinalização que ocorrem paralelamente. Observa-se então que as células ativadas, tratadas com Ang-(1-7) apresentam um sistema de equilíbrio nessa via.

Na integrina *ITGA6*, os níveis transcricionais na célula LX-2 ativadas diminuí significativamente em relação à célula quiescida. Já nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), os níveis de expressão de *ITGA6* aumentam, mas não se igualam ao das células quiescidas. Em relação ao nível transcricional nas LX-2 ativadas clone 1179, houve uma diminuição dos níveis de *ITGA6*. Nas células LX-2 ativadas clone 1254, o nível de expressão do gene quase se iguala a zero, em relação à célula quiescida. Interessantemente não houve superexpressão de *ITGA6*, uma vez que esta subunidade “ $\alpha$  6” medeia a adesão celular na matriz extracelular ou a célula-célula de heterodimerização e ligação ao citoesqueleto (PAWAR, 2007). Observa-se então, que nas células LX-2 ativadas e nas ativadas tratadas com Ang-(1-7), o nível transcricional de *ITGA6* é maior, uma vez que os filamentos de actina se mostraram mais organizados em relação às células transfectadas com pEP-miR 1179 e 1254 (Figura 10-A).

Prosseguindo com as análises, em relação ao *ITGB1* e ao *ITGB6*, os resultados apontaram baixos níveis de expressão em todas as células ativadas, quando comparado com os resultados encontrados nas culturas quiescentes, apresentando, entretanto, pequenas variações entre os grupos. Particularmente, o nível transcricional de ambos os genes cai acentuadamente nas LX-2 ativadas clone 1254, quando comparado com os níveis de expressão das células quiescidas. A redução nos níveis de *ITGB1* pode sugerir a perda da capacidade de alvo para locais de adesões focais (AKIYAMA et al., 1994), que resultam em alterações nos filamentos de actina. Em nossas análises, a redução nos níveis transcricionais desse gene, pode estar correlacionada com os resultados obtidos nas análises de microscopia. Observa-se então, que ocorreu alterações nos níveis de *ITGB1* em todas as células investigadas, em relação a célula quiescida, corroborando com nossos resultados de microscopia (Figura 10-A e 11-A), que demonstram uma alteração no padrão de organização estrutural do citoesqueleto. O mesmo tipo de análise pode ser realizado para o gene *ITGB6*. Este gene é responsável pela formação de uma proteína de adesão da superfície celular à matriz extracelular ou de adesão celular célula-célula, através de heterodimerização. A *ITGB6* está também envolvida com a transdução de sinais moduladores do citoesqueleto. Uma

baixa expressão dessa proteína de adesão nas células ativadas, superexpressa o miRNA 1254, favorece a sua desorganização estrutural como visto nos ensaios (Figura 11-A).

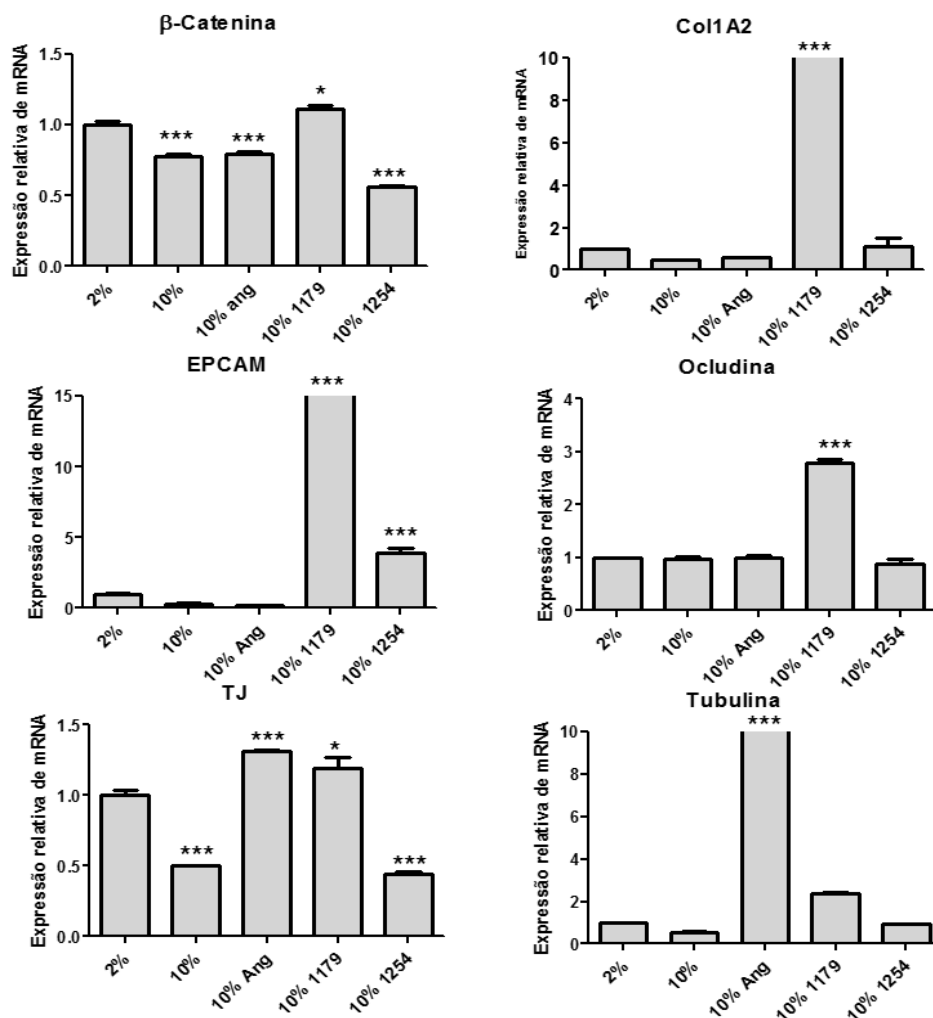
Em relação a *ITGB8*, os níveis transcricionais nas células LX-2 ativadas e nas ativadas, tratadas com o hepatapeptídeo não apresentaram diferença significativa. Já nas células LX-2 ativadas clone 1179, o nível de expressão aumentou em aproximadamente 15 vezes. Nas células LX-2 ativadas clone 1254 houve um acentuado aumento de expressão do nível do gene *ITGB8*. O gene *ITGB8* é um receptor de superfície celular para o domínio latente (LAP) da citocina multifuncional *TGF-β*, que através da sua associação com LAP, o *TGF-β* é mantido numa forma latente que deve ser ativada para funcionar. A ligação à integrina  $\alpha\beta 8$  com subsequente clivagem metaloproteolítica de LAP representa um mecanismo principal de ativação de *TGF-β* *in vivo*. Na doença pulmonar obstrutiva crônica humana, nas malformações vasculares cerebrais e nos cânceres é observada a alteração da subunidade  $\beta 8$  da integrina (*ITGB8*) (MARKOVICS, 2011). Observa-se então, que na fibrose esse mecanismo não está atuando, entretanto nas células LX-2 ativadas clone 1179 o nível de expressão é alto, corroborando com nossa hipótese de que está havendo uma transdiferenciação celular e que favorece o aparecimento de características tumorais celulares.

De acordo com as análises de qRT-PCR, pode-se concluir que nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), ocorre de fato um remodelamento nos filamentos de actina. Novamente supõe-se que o miRNA 1179, quando cultivado em 10% de SBF, induz processos moduladores tumorais. Em relação às células LX-2 ativadas clone 1254, os níveis transcricionais dos genes que codificam para integrinas são modulados negativamente, o que favorece a desorganização estrutural do citoesqueleto como apresentado na Figura 11-A.

#### **4.6.4. Elementos estruturais e de interação células a células**

Posteriormente a avaliação da modulação transcricional de genes correlatos a elementos estruturais celulares, foram realizadas análises de qRT-PCR para os genes *β-Catenina*, *Col1A2*, *EPCAM*, *Ocludina*, *TJ* e *Tubulina* (Figura 15).

**Figura 15:** Nas análises de expressão gênica utilizando PCR, para avaliação da ativação transcricional dos genes  $\beta$ Catenina, Col1A2, EPCAM, Ocludina, TJ e Tubulina, foram utilizados RNAs oriundos das culturas celulares LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). O gráfico foi construído utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A quantificação da expressão relativa dos genes de interesse foi feita em relação à expressão do gene de referência  $\beta$ -actina e a LX-2 quiescida foi utilizada como controle.



Entre os elementos investigados, tem-se  $\beta$ -catenina, cujos níveis de expressão decaíram nas células LX-2 ativadas, com exceção das LX-2 ativadas clone 1179. A  $\beta$ -catenina é uma molécula que tem atuação na adesão célula-célula, além de atuar diretamente na sinalização de Wnt / wg. A sinalização Wnt / wg resulta na acumulação de  $\beta$ -catenina e na ativação transcricional de genes alvo específicos durante o desenvolvimento, evidenciando que a desregulação da sinalização de  $\beta$ -

*catenina* é um evento predominante na gênese de uma série de doenças malignas, tais como cânceres de cólon, ovário, de próstata e do endotélio, melanoma, carcinoma hepatocelular e pilomatricomas de meduloblastoma (MORIN, 1999). Observa-se que os resultados significativos observados para as células LX-2 ativadas clone 1179, mais uma vez evidencia a relação da superexpressão do miR 1179 com processos tumorais. Ao contrário, nas demais condições de cultura, houve um decréscimo na expressão de tal gene, o que pode estar cooperando com um controle da expressão gênica alterada de alguns genes necessários ao equilíbrio celular.

Em relação ao gene *Col1A2*, a expressão transcricional se manteve constante nas células LX-2 ativadas, nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) e nas células ativadas clone 1254 em relação às células quiescidas. Já nas LX-2 ativadas clone 1179, houve um aumento na expressão desse gene. *Col1A2* codifica a cadeia pró-alfa do colágeno tipo I (DALGLEISH, 2008), ele se caracteriza como um elemento ativado por *TGF-β*, através de uma via de sinalização não-canônica (*Smad-independent*) (PONTICOS, 2009). Os resultados sugerem um não envolvimento direto desse elemento na transativação celular das culturas LX-2, com exceção das células LX-2 ativadas clone 1179.

Os níveis transcricionais de *EPCAM* apresentaram variações somente nas células LX-2 ativadas, transfectadas com os clones 1179 e 1254. O gene *EPCAM* codifica para uma molécula de adesão da célula epitelial (*EPCAM*), que atua em processos de sinalização, migração, proliferação e diferenciação celular (MAETZEL et al., 2009). Estudos apontam que dependendo do tecido de origem, o *EPCAM* pode agir promovendo a proliferação celular, motilidade, carcinogênese e metástase (VAN DER GUN et al., 2010). O aumento significativo desse transcrito nas células LX-2 ativadas, superexpressa o miRNA 1179, foi de aproximadamente 25 vezes mais que a célula quiescida, dessa maneira inferimos que o miRNA 1179 pode estar atuando de forma negativa, devido aos elementos codificados pelo gene *EPCAM* já citados. Já nas células LX-2 ativadas clone 1254, o aumento de *EPCAM* foi de aproximadamente 4 vezes mais que nas células quiescidas. Este resultado pode reforçar a hipótese de que o miR-1254 está modulando os processos de

migração das células hepáticas. Dessa maneira, sugere-se a atuação do miR-1254 positiva no controle da fibrose. Visto que as HSCs são as maiores responsáveis pela produção dos elementos da matriz que controlam o processo de cicatrização frente às injúrias e uma migração lenta dessas células aos locais lesionados, poderia contribuir com a cicatrização e a fibrose celular (Lee e Friedman, 2011; Failli et al., 2000).

Outro elemento estrutural de destaque são as *Ocludinas*. Os resultados apresentam uma não alteração significativa entre as culturas testadas, com exceção das LX-2 ativadas clone 1179. A Ocludina, é uma proteína de membrana, que atua no complexo de junções oclusivas (TJ, *tight junctions*), está presente no tecido epitelial que reveste a camada interna de órgãos (RUNKLE; MU, 2013), porém o efeito da superexpressão e/ou da diminuição desta proteína não está muito esclarecido na literatura. Já foi descrito que a Ocludina atua como um mediadora crítica para a transformação celular, outro estudo demonstrou que essa proteína é epigeneticamente silenciada por hipermetilação da região promotora em células de melanoma de murino e, uma vez recuperado os níveis de expressão de Ocludina, observou-se redução na taxa de migração das células (OSANAI et al., 2006). Provavelmente, o miRNA 1179 possua mecanismos para controlar prováveis mecanismos de transdiferenciação tumoral, mas baseado somente na expressão de genes, fica limitada a possibilidade de fazer inferências maiores sobre a função da Ocludina na transdiferenciação celular dos grupos investigados.

Em relação ao gene *TJ*, os níveis transcricionais das células LX-2 ativadas, comparados com a célula quiescidas, diminuem acentuadamente. Já nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7), o nível de expressão aumenta significativamente, em relação a célula quiescida. Nas células LX-2 ativadas clone 1179, o nível transcricional é bastante elevado, comparado com as células quiescidas. Já nas células ativadas clone 1254, o nível de expressão diminui significativamente, em relação às células quiescidas. As TJ são responsáveis por ligar as proteínas de membrana ao citoesqueleto de actina. Coletivamente, as TJ apresentam função de barreira celular, regulando a permeabilidade de soluto entre células adjacentes e controlando a difusão lateral de proteínas inseridas na bicamada lipídica. (TORRES-



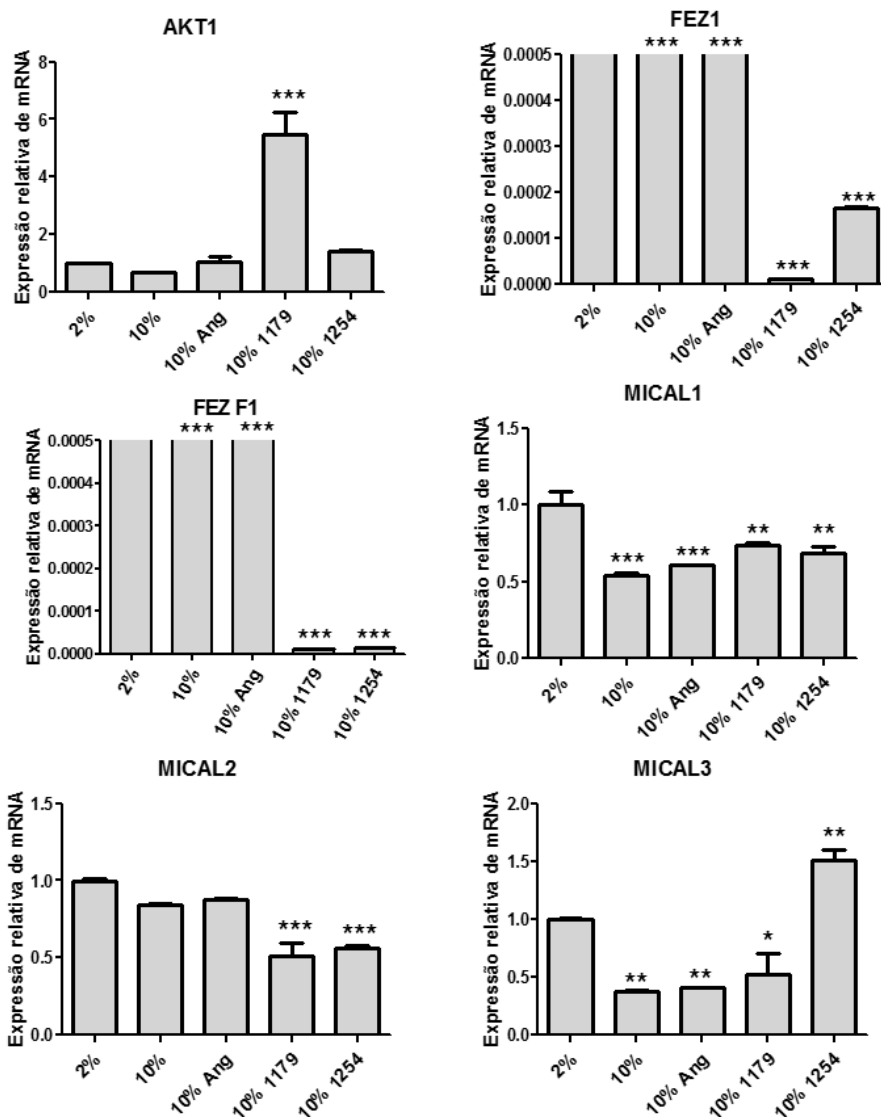
FLORES, ARIAS, 2015). Nas células LX-2 ativadas clone 1179 apresentou o mesmo perfil de expressão das TJ observado nas células ativadas, tratadas com Ang-(1-7), reforçando a sugestão de que mecanismos celulares internos do miR-1179, estão envolvidos com a homeostase celular.

Por fim, a análise da expressão do gene *Tubulina* apresentou acentuada expressão somente nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7). A proteína Tubulina é o principal elemento formador dos microtúbulos, os quais são responsáveis pela formação do citoesqueleto de células eucarióticas (STOTZ, LONG, 1999). Os microtúbulos estão envolvidos em processos essenciais, incluindo a divisão celular, estrutura ciliar e flagelar e são responsáveis pela motilidade e transporte intracelular (HYAMS, LLOYD, 1993). Em células em que foram observados altos níveis de Tubulina, como na célula LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (Figura 16), foram também constatadas alterações na organização dos microtúbulos, alterando a organização do citoesqueleto (BHATTACHARYA et al., 2004), como pode ser observado em nossos resultados de microscopia de fluorescência (Figura 10-A), pois os filamentos de actina das células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), reorganizam-se, adquirindo uma organização nos filamentos de actina, parecidos com as células quiescidas.

#### **4.6.5. Elementos de sinalização celular**

Para prosseguir na análise de elementos relevantes na modulação do citoesqueleto foram avaliados genes que são correlatos com a sinalização celular. Os níveis de expressão foram mensurados para os genes *AKT1*, *FEZ1*, *FEZF1*, *Mical1*, *Mical2*, *Mical3* (Figura 16).

**Figura 16:** Nas análises de expressão gênica utilizando qRT-PCR, para avaliação da ativação transcricional dos genes *AKT1*, *FEZ1*, *FEZF1*, *Mical1*, *Mical2* e *Mical3*, foram utilizados RNAs oriundos das culturas celulares LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). O gráfico foi construído utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5* e a análise estatística foi calculada utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A quantificação da expressão relativa dos genes de interesse foi feita em relação à expressão do gene de referência  $\beta$ -actina e a LX-2 quiescida (2%) foi utilizada como controle.



Baseado nos resultados obtidos observa-se que os níveis de expressão transcricionais do gene *AKT1* nas células LX-2 ativadas, nas ativadas, tratadas com Ang-(1-7) e nas células LX-2 ativadas clone 1254, não se alteram significativamente, em relação às células quiescidas. Já nas células LX-2 ativadas clone 1179, o nível

de expressão aumenta em 6 vezes mais que as células quiescidas. O gene *AKT1* produz um elemento importante na participação da via de proliferação, migração, sobrevivência celular e metabolismo de glicose em várias células, controlando vias de transdução de sinais que medeiam o equilíbrio celular. Particularmente, o aumento exacerbado da expressão de *AKT* nas LX-2 ativadas clone 1179, em relação aos demais níveis de expressão observados nos diferentes grupos, sugere que há um desbalanço no equilíbrio celular, que pode até mesmo embasar os mecanismos de necrose observados e já mencionados (dados não mostrados). A análise transcricional do gene *FEZ1* apresenta redução no nível de expressão em todas as culturas ativadas, quando da comparação com das células LX-2 quiescidas, mas uma acentuada redução é observada nas células LX-2 ativadas clones 1179 e -1254. O gene *FEZ1* atua a jusante, como uma tirosina-proteína quinase no citoesqueleto, desempenhando um papel na regulação do citoesqueleto de actina, montagem de microtúbulos, ligação de células e migração celular (KANDA, SMITHGALL, 2009) e até mesmo locomoção celular (BLOOM, HORVITZ, 1997). Assim, a redução nos níveis dessa proteína nos clones reforça ainda mais o papel da superexpressão dos miRNAs em análise nos processos de migração e locomoção celular.

Em relação ao gene *FEZ F1*, há uma redução significativa, dos níveis transcricionais, comparados com a LX-2 quiescida, em todos os nossos modelos celulares, nas células LX-2 ativadas, nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) e nas células LX-2 ativadas clones 1179 e -1254. O gene *FEZ F1* atua como um fator de transcrição, sendo altamente conservado. Possui mecanismos independentes em diversos tipos de tecidos e células (ECKLER, CHEN, 2014). Em um outro estudo, HSCN et al., (2016), sugeriram que o mRNA de *FEZ F1* está envolvido na proliferação celular, invasão e migração, a partir de sua pesquisa com células de câncer colorretal. Onde foi induzido o silenciamento gênico de *FEZ F1* e o ensaio da ferida (*wound healing*) e, interessante, houve redução na migração e invasão celular *in vitro*. Dessa maneira, esse gene pode ser um fator de transcrição de elementos tumorais. Assim, nota-se que nas células investigadas está havendo um controle do estado fibrótico para a transdiferenciação de um estado tumoral. No

entanto, nas células LX-2 ativadas clone 1179, o qual sugerimos que está havendo ativação de elementos moduladores tumorais, também está ocorrendo um suposto mecanismo celular que leva à homeostase celular.

Também foram analisados os transcritos das proteínas da família MICAL. Molecularmente, as proteínas MICAL se caracterizam como enzimas multidomínio conservadas, essenciais para a reorganização do citoesqueleto e que atuam no desenvolvimento das células nervosas, endocitose e apoptose. Nestas enzimas, o domínio de homologia de calponina de tipo 2 (CH) segue sempre um domínio de monooxigenase N-terminal (MO). O domínio CH é necessário para a localização celular (ALQASSIM, 2016).

A família MICAL de seres humanos consiste de três proteínas MICAL (MICAL1, MICAL2 e MICAL3) e dois homólogos MICAL-L (MICAL-L1 e MICAL-L2) (GIRIDHARAN, et al. 2013). São caracterizadas como monooxigenases e promovem a despolimerização dos filamentos de actina, pela mediação da oxidação de resíduos de metionina específicos sobre a actina. Elas atuam modificando subunidades de actina através da adição de oxigênio, para formar metionina-sulfóxido, levando a promover a quebra de filamentos de actina, atuando na alteração do citoesqueleto (HUNG et al. 2010 e ZUCCHINI et al. 2011). Em estudos com *Drosophila* foi observado que a superexpressão de MICAL aumentou a desorganização dos filamentos de actina-F, aumentando o número de filamentos curtos desta proteína (BEUCHLE et al. 2007; HUNG et al. 2010).

Além das funções em comum com MICAL, MICAL1 é uma proteína de ligação a actina que medeia sinais de semaforina em podócitos e está presente no citoplasma. Já MICAL2, promove a despolimerização dos filamentos de actina no núcleo celular. Interessantemente, MICAL3 está envolvida no remodelamento concomitante de complexos de proteína de acoplamento de vesículas, presente também no citoplasma e no núcleo celular. (GRIGORIEV, et al. 2011). Nesse trabalho, as análises foram realizadas com as três isoformas de MICAL (MICAL 1, 2 e 3).

Assim, baseado na análise conjunta dos resultados, o gene *MICAL 1* apresenta níveis reduzidos em todas as culturas celulares ativadas, quando comparado com

os níveis observados nas células quiescidas. Essa resposta também foi observada para o gene *MICAL2*. Em relação aos níveis de expressão gênica de *MICAL3*, também foi observado uma baixa expressão em quase todos os grupos celulares em estudo, somente nas células LX-2 ativadas clone 1254 que a expressão é alta em relação a condição de quiescência. Dessa maneira podemos inferir que atuação dos genes da família de monooxigenases não está atuando na despolimerização dos filamentos de actina dos nossos modelos celulares, com exceção de *MICAL3* nas células LX-2 ativadas clone 1254. No entanto, durante os ensaios não foi verificado a venda do anticorpo *MICAL3*, o que inviabilizou um estudo funcional mais aprofundado do mesmo na modulação do citoesqueleto. A construção de anticorpos monoclonais e/ou policlonais é morosa, o que se tornou inviável de ser realizado nesse projeto. Mas no final deste trabalho encontramos a venda do anticorpo *MICAL3*, entretanto, tornou-se irrealizável a compra devido à prazos de finalização deste trabalho. Nesse trabalho, devido as análises prévias de bioinformática, focamos nossa atenção em *MICAL2*.

De um modo geral, nas análises de expressões dos genes moduladores do citoesqueleto, vários elementos apresentaram alterações significativas, tanto nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), quanto nas células LX-2 ativadas clones 1179 e 1254, de maneira diferenciada. Os resultados mais significativos apresentados estão descritos na tabela 3.

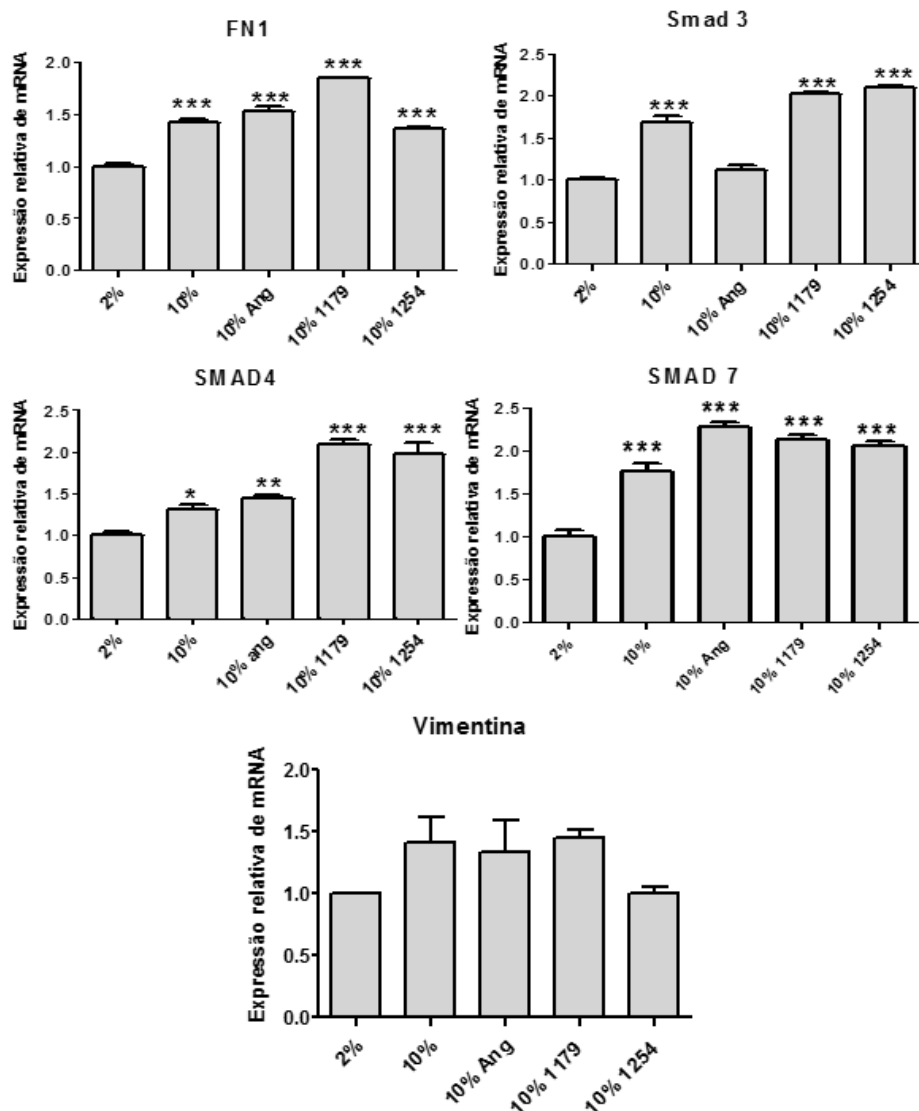
**Tabela 3:** Representação dos genes investigados descritos como moduladores do citoesqueleto, destacados em cinza; genes que apresentaram resultados estatisticamente significativos nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), realçado em amarelo; em relação às LX-2 ativadas clone 1179, os elementos significativos estão marcados em azul; referente às LX-2 ativadas clone 1254, os genes que apresentaram níveis estatisticamente alterados estão sublinhados em verde.

	Ang-(1-7)		miRNA-1179		miRNA-1254
AKT1		AKT1		AKT1	AKT1
B catenina		B catenina		B catenina	B catenina
Col1A2		Col1A2		Col1A2	Col1A2
Desmina		Desmina		Desmina	Desmina
EPCAM		EPCAM		EPCAM	EPCAM
FEZ1		FEZ1		FEZ1	FEZ1
FEZF1		FEZF1		FEZF1	FEZF1
IQGAP3		IQGAP3		IQGAP3	IQGAP3
ITGA5		ITGA5		ITGA5	ITGA5
ITGA6		ITGA6		ITGA6	ITGA6
ITGAM		ITGAM		ITGAM	ITGAM
ITGB1		ITGB1		ITGB1	ITGB1
ITGB6		ITGB6		ITGB6	ITGB6
ITGB8		ITGB8		ITGB8	ITGB8
Mical1		Mical1		Mical1	Mical1
Mical2		Mical2		Mical2	Mical2
Mical3		Mical3		Mical3	Mical3
Ocludina		Ocludina		Ocludina	Ocludina
RAF-1		RAF-1		RAF-1	RAF-1
ROCK2		ROCK2		ROCK2	ROCK2
TJ		TJ		TJ	TJ
Tubulina		Tubulina		Tubulina	Tubulina
WASL		WASL		WASL	WASL

#### 4.7. Análise de expressão gênica em reações de polimerização em cadeia semi-quantitativa (RT-PCR)

De acordo com as análises globais dos dados de qRT-PCR, alguns resultados foram bastante significativos, como a baixa expressão de *TGFβ-1* nas células LX-2 ativadas, a função regulatório do peptídeo Ang-(1-7), além da ativação de elementos tumorais nas células LX-2 ativadas clone 1179 e o controle da fibrose nas células LX-2 ativadas clone 1254.

**Figura 17:** Níveis de expressão relativa dos mRNA *fibronectina (FN1)*, *SMAD3*, *SMAD4* e *SMAD 7* e *Vimentina*, foram mensurados. RNAs oriundos das culturas celulares LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real e os níveis de expressão de mRNAs foram obtidos através de análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0005$ . A LX-2 quiescida (2%) foi utilizada como controle.



O nível de expressão do gene *FN1*, em relação às células LX-2 quiescidas, apresentou alterações significativas em quase todos os modelos celulares, A *FN1* é uma proteína multifuncional da matriz extracelular, pois tem uma variedade de sítios de ligação para outras moléculas extracelulares. Foi descrito que ela pode

estar envolvida em processos de morfogênese, assim como poderia regular a diferenciação celular, migração e a fixação das células em locais determinados (MIYAMOTO et al., 1995, SCHWARZBAUER et al., 1999; KAWELKE et al., 2011). No entanto, segundo uma pesquisa de Uemura e colaboradores (2005) demonstraram que o aumento da expressão de *SMAD3* foi suficiente para aumentar deposição do gene *FN1*. Embasando-se nos resultados apresentados na Figura 19, *SMAD3* não apresentou aumento no seu nível de expressão transcricional somente nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7). É possível que outros mecanismos estejam atuando devido ao peptídeo. Os demais resultados, corroboram com nosso resultado de expressão do gene *FN1*.

Seguindo com as análises, a via de sinalização das proteínas *SMADs* inicia com a ligação de *TGF-β* ao seu receptor de membrana tipo II ( $T\beta RII$ ), que por sua vez recruta e ativa o receptor tipo I ( $T\beta RI$ ). A sinalização intracelular é propagada através da *SMAD3*, que é fosforilada e ativada pelo receptor tipo I. A *SMAD4* se une à *SMAD3* fosforilada e este complexo modula a transcrição de genes alvos no núcleo. A *SMAD7* atua na inibição da sinalização por *TGF-β*, atuando com um controle negativo (GRESSNER e WEISKIRCHEN 2006). Ou seja, a proteína *SMAD3* é considerada como um receptor (R-Smad), *SMAD4* como co-estimulador (Co-Smad), enquanto *SMAD7* funciona como um regulador negativo de *TGF-β* (anti-Smad).

Nas análises de RT-PCR do gene *SMAD3*, em relação às células LX-2 quiescidas, houve aumento significativa da expressão gênica nas LX-2 ativadas e nas células LX-2 ativadas clones 1179 e 1254. Em partes, esse resultado não corrobora com o resultado de *TGFβ-1* nas LX-2 ativadas que se apresentou significativamente mais baixo que nas células quiescidas. Entretanto, mesmo repetindo esse ensaio, foi este o resultado encontrado. Mas, em relação às células LX-2 ativadas clones 1179 e 1254, os resultados de *SMAD3* corroboram com os níveis de expressão dos *TGF-βs* investigados (Figura 11-B). Nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) o nível de expressão de *SMAD3* não alterou significativamente em relação às células quiescidas. Outros genes da família *SMAD* foram investigados e podem corroborar com os resultados dos genes *TGFβ-1* e *TGFβ-2* nessas células.



No resultado da expressão gênica do gene *SMAD4*, foi mostrado que, em relação as LX-2 quiescidas, em todos os nossos modelos celulares houve um aumento significativo. O gene *SMAD4*, atua a partir da fosforilação de *SMAD3*, a qual não apresentou aumento de expressão gênica somente nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7). Podemos sugerir que nessas células *TGFβ*-1 e 2, com níveis de *SMAD3* menos expressivos, pode estar sendo ativado através de vias independentes de SMADs que atuam na ativação *TGF-β*. De acordo com Derynck, Zhang (2003) e Moustakas, Heldin (2005) há evidências bioquímicas que há associação de *TGF-β* a outras vias de sinalização, incluindo as vias MAPKs, ERK, JNK, p38, PI3K, fosfatases PP2A e ainda membros da família Rho. Adicionalmente, os receptores de *TGF-β* ativam caminhos independentes de *SMAD* que não apenas regulam a sinalização de *SMAD*, mas também permitem respostas de *TGF-β* independentes de *SMAD* (DERYNCK, ZHANG, 2003).

Referente ao gene *SMAD7*, houve também um aumento da expressão transcricional, em relação às células LX-2 quiescidas, em todas as culturas celulares, LX-2 ativadas, LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), LX-2 ativadas clones 1179 e 1254. A transcrição de *SMAD7* é induzida por *TGF-β1* e mediada pela ligação de *SMAD3* e *SMAD4* na região promotora do *SMAD7*, representando um mecanismo auto-regulatório da via de sinalização *TGF-β1* (GRESSNER, WEISKIRCHEN. 2006). No entanto, de acordo com os níveis transcricionais dos genes *SMAD3* e *SMAD4* (Figura 17), podemos inferir que o resultado de *SMAD7* corrobora com a descrição na literatura da via da família *SMADs*. Interessantemente, em uma observação global dos resultados das *SMADs*, é notório que a superexpressão do miRNA 1254, com os altos níveis transcricionais das 3 *SMADs* analisadas nas células LX-2 ativadas clone 1254, está atuando de maneira pós-traducional nos genes *TGF-βs*, para equilibrar/reverter o quadro das células LX-2 ativadas.

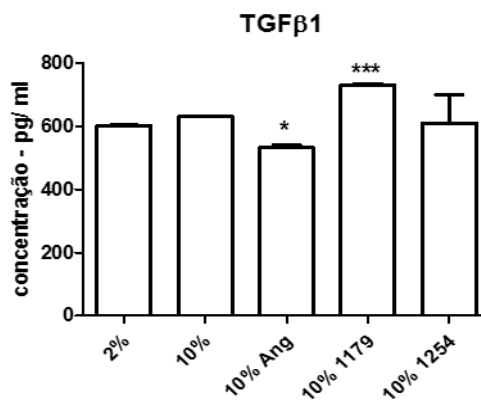
O nível transcricional do gene *Vimentina*, em relação as LX-2 quiescidas, não teve alteração significativa, em todos os nossos modelos celulares. A *Vimentina* é um filamento intermediário do citoesqueleto, faz parte de um programa reversível de ocorrência natural chamado de Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM). A TEM

converte as células epiteliais em derivados mesenquimais (CASTRO-MUÑOZLEDO, et al., 2017). Foi descrito pelo Tiezzi (2007), que em experimentos *in vivo- in vitro* de transformação maligna de células ductais induzidas por estrogênio, demonstraram que durante o processo de carcinogênese, existe um aumento progressivo da capacidade celular em ativar o processo de TEM, com o aumento de *Vimentina* e *FN1*. Na análise *FN1* (Figura 17), somente nas células LX-2 clone 1179 que teve aumento dos níveis transcricionais, em relação as LX-2 quiescidas. Dessa maneira, o miR-1179, mais uma vez está atuando em vias de elementos tumorais, que não é positivo para o nosso modelo celular.

### 5. Níveis da expressão proteica de TGF $\beta$ -1 nas células LX-2 ativadas tratadas e não tratadas com Ang-(1-7) e LX-2 ativadas clones 1179 e 1254 pelo método de ELISA

Análise da produção de TGF $\beta$ -1, a partir do sobrenadante das células LX-2 ativadas, ativadas, tratadas com Ang-(1-7) e das LX-2 ativadas clones 1179 e 1254, foi mensurado no teste de ELISA (Figura 18).

**Figura 18:** Níveis da expressão de TGF $\beta$ -1 em células LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254), foram mensurados em ensaios de ELISA. O gráfico foi construído utilizando-se o *software Graph Pad Prism 5* e a análise estatística foi calculada utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ . A LX-2 quiescida (2%) foi utilizada como controle.



Os resultados do ensaio de ELISA, para a mensuração de TGF $\beta$ -1, demonstram que nas células ativadas não houve alteração nos níveis dessa citocina, Já, quando há a presença do heptapeptídeo, os resultados do ELISA

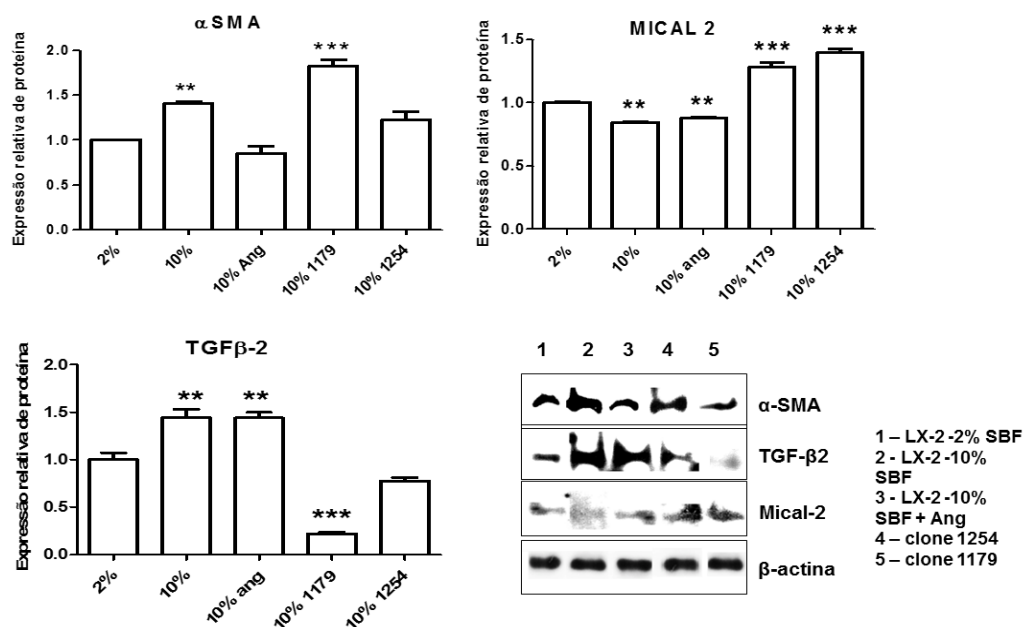
apresentam valores significativamente menores para TGF $\beta$ -1, sugere-se que a Ang-(1-7) esteja contendo mecanismos pró-inflamatórios. Essa redução na proteína funcional acontece dentro de um equilíbrio dinâmico celular, na tentativa de assegurar a homeostase e controlar o processo pró-inflamatório, que precede os quadros de fibrose (HUEN, MOECKEL e CANTLEY, 2013).

Quando da análise dos resultados para as LX-2 ativadas clone 1179 observamos um aumento na produção dessa citocina, assim como nos níveis de mRNA (Figura 10-B). Nota-se que há atuação da via *SMAD*-dependente na ativação de TGF $\beta$ -1, dessa maneira podemos inferir que o miR-1179 pode ser deletério para nosso modelo celular. Referente às células LX-2 ativadas clone 1254, há uma produção similar de TGF $\beta$ -1 ao padrão observado nas células quiescidas, de maneira sincronizada. Mais uma vez corroborando com nossa hipótese de que o miR-1254 superexpresso atua de maneira a controlar os níveis de expressão de elementos que modulam a fibrose hepática.

#### **6. Níveis da expressão das proteínas $\alpha$ -SMA, Mical 2 e TGF $\beta$ -2 nos grupos celulares LX-2 investigados**

Baseado nos ensaios de *Western blot*, níveis da expressão das proteínas,  $\alpha$ SMA, Mical 2 e TGF $\beta$ -2 nos grupos celulares LX-2 foram mensurados (Figura 19).

**Figura 19:** Níveis da expressão das proteínas Mical 2 e TGF $\beta$ -2 em células LX-2 quiescidas (2%), LX-2 ativadas (10%), LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) (10% Ang), LX-2 ativadas clone 1179 (10% 1179) e a LX-2 ativadas clone 1254 (10% 1254). O gráfico foi construído utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5* e a análise estatística foi calculada utilizando-se One-Way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ . A quantificação da expressão das proteínas de interesse foi feita em relação ao nível de expressão proteica de  $\beta$ -actina e as células LX-2 quiescidas (2%) foram utilizadas como controle. 19-B: Resultado do western blot, banda 1:  $\alpha$ SMA (42KDa); 2: TGF $\beta$ -2(50KDa); 3: Mical 2 (90KDa); 4:  $\beta$ actina (40KDa).



Para a análise dos dados de  $\alpha$ -SMA, observamos que os níveis de expressão proteica nas LX-2 ativadas corrobora com o que está descrito na literatura, que as HSCs ativadas expressam  $\alpha$ -SMA (VARMA, 2017), validando assim nosso modelo celular em estudo. Entretanto, quando ao tratamento com Ang-(1-7) nas LX-2 ativadas, há diminuição da expressão gênica e do nível proteico de  $\alpha$ -SMA, assemelhando-se ao padrão observado nas células quiescidas, concordando com nossa observação já avaliada, que o peptídeo Ang-(1-7) está atuando de maneira positiva na reversão do processo de fibrose no nosso modelo celular. Seguindo com as análises, nas células LX-2 ativadas clone 1179, os níveis transcricionais do gene e da proteína  $\alpha$ -SMA estão estatisticamente mais altos que nas células LX-2 quiescidas, corroborando com nossas observações anteriores de que a superexpressão isolada do miR-1179 atua de maneira negativa na reversão do

processo fibrosante hepático. Entretanto, nas células LX-2 ativadas clone 1254, tanto a nível transcricional do gene  $\alpha$ -SMA quanto seu nível proteico, não alteram estatisticamente em relação às células LX-2 quiescidas. Este resultado corrobora com nossa observação em relação a superexpressão do miR-1254, de maneira isolada, nas células LX-2 ativadas, o qual, mais uma vez, atua equilibrando os elementos que modulam o processo de fibrose.

Seguindo com as análises, a expressão gênica e proteica de Mical 2 nas células LX-2 ativadas e nas LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), é significativamente mais baixa que nas LX-2 quiescidas. Comparando-se com os resultados de microscopia de fluorescência (Figura 10-A), a proteína apresenta a capacidade de despolimerizar filamentos de actina (LUNDQUIST et al., 2014), e como nas condições LX-2 ativadas e LX-2 ativadas, tratadas com o peptídeo apresentaram menor despolimerização desses filamentos, existe uma redução nos níveis transcricionais e protéicos da proteína MICAL2. No entanto, referente às células LX-2 ativadas clones 1179 e -1254 o nível transcricional do gene é mais baixo nesses dois clones celulares e interessantemente a expressão proteica é mais alta em relação às células LX-2 quiescidas, o que pode estar correlacionado com a meia vida da proteína (13 horas). Nas células LX-2 clones, existe muitas alterações nas estruturas dos filamentos de actina (Figura 11-A), e a célula, numa tentativa de reestabelecer seu equilíbrio, poderia requisitar mais a atuação de MICAL2, despolimerizando os filamentos celulares, modulando a meia vida da proteína. Referente ao nível de expressão transcricional do gene  $TGF-\beta 2$  e da proteína TGF- $\beta 2$ , estão semelhantes, com exceção das LX-2 ativadas clones 1179 e 1254. A proteína é expressa nas células LX-2 ativadas de maneira estatisticamente mais elevada que nas células LX-2 quiescidas. Assim como ocorre nas células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7). No entanto em relação às LX-2 ativadas clone 1179, os níveis de expressão do gene  $TGF-\beta 2$  estão mais altos que nas LX-2 quiescidas, ao contrário do nível de expressão proteica. Já nas células LX-2 ativadas clone 1254, a expressão do gene é estatisticamente mais baixa que nas LX-2 quiescidas e o nível de expressão proteica não tem alteração estatística significativa em relação as LX-2 quiescentes. Dessa maneira nas LX-2 ativadas e nas

LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), não há modulação pós traducional de TGF- $\beta$ 2 e com os níveis de mRNA e proteína mais expressos que nas LX-2 quiescidas, podemos inferir que este gene está atuando nessas duas culturas celulares de maneira a contribuir com o estado pró-fibrótico na fibrose hepática (Lee et al., 2004). Em relação às LX-2 ativadas clone 1179, observamos que está havendo uma modificação pós-traducional de TGF- $\beta$ 2, impedindo que esta proteína propague a sua função, como atenuar doenças fibróticas com a ativação de genes responsáveis pela deposição da MEC, além de evidências de crescimento celular e metástase em células tumorais (BIENACKA, DOBACZEWSKI e FRANGOGIANNIS, 2011). Referente às LX-2 ativadas clone 1254, a não alteração proteica de TGF- $\beta$ 2, em relação às células LX-2 quiescidas, atua favoravelmente na reversão do processo prófibrosante hepático, visto que TGF- $\beta$ 2 desempenha uma função essencial no desenvolvimento fibrótico (XIÃO et al., 2013).

## 7.CONCLUSÃO

As linhagens celulares LX-2 ativadas clones 1179 e 1254 estáveis, foram estabelecidas e selecionadas com a utilização do vetor *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector (CellBiolabsInc)*, o qual garante alta taxa de expressão em células de mamíferos transfectadas e do marcador de resistência à Puromicina.

Nas análises conjuntas dos resultados, verificamos que as células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) apresenta uma organização estrutural nos filamentos de actina semelhantes às células LX-2 quiescidas. Além disso, há alterações no padrão de formação de gotículas de lipídios no citoplasma e nas análises de qRT-PCR, nota-se que há uma atuação positiva do peptídeo, em relação a remodelação dos filamentos de actina. Em relação às células ativadas clone 1179, tanto na organização dos filamentos de actina, nas análises dos lipídeos, quanto nos resultados de qRT-PCR, notou-se os efeitos deletérios da sua superexpressão. Enquanto que nas células LX-2 ativadas clone 1254, observa-se uma organização dos filamentos de actina diferentes das células quiescidas, mas

uma atuação positiva na via de lipídeos e nas análises de qRT-PCR, onde foi observado elementos que colaboram com o controle da fibrose hepática.

Na investigação à níveis proteicos de elementos presentes nos processos de fibrose hepática, nota-se que nas células ativadas, foram obtidos resultados que corroboram com a literatura, validando assim, nosso modelo celular. Em relação às células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), observa-se que há atuações a níveis proteicos para o controle fibrótico. Já nas células LX-2 ativadas clone 1179, a superexpressão deste miRNA não é positiva para o equilíbrio celular investigado. Referente às LX-2 ativadas clone 1254, os níveis das proteínas avaliadas corroboram com nossa hipótese de que a superexpressão deste miRNA é positiva para o controle da fibrose.

Em resumo, as redes de interação entre miRNAs e mRNAs nortearam a análise da expressão de genes importantes no processo de modulação do citoesqueleto e do estado fibrótico. Dessa maneira, nossas hipóteses foram validadas com os resultados dos níveis das proteínas avaliadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, S. K.; YAMADA, S.S.; YAMADA, K. M. e LAFLAMME, S. E. Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. **The Journal of Biological HSCmistry**. Ed. 269 (23), pág. 15961–15964, 1994.

AKHURST, R. J. e HATA, A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. **Nat Rev Drug Discov**. V. 11, nº 10, pág. 790-811, 2012.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ALGASSIM, S. S.; et al., Modulation of MICAL Monooxygenase Activity by its Calponin Homology Domain: Structural and Mechanistic Insights. **Scientific Reports** 6. Artigo número 22176, 2016.

AMANO, M., et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **J Biol HSCm**, V.271, 20246-20249, 1996.

AMANO, M.; FUKATA, Y.; KAIBUCHI K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. **Exp Cell Res**. V. 261, pág. 44-51, 2000.

ANDREOLI, S. C. S. et al., Utilização dos microRNAs no direcionamento da terapia e na avaliação da resposta ao tratamento do câncer colorretal. **Einstein**. V. 12(2), pág. 256-258, 2014.

ANTHONY, B.; ALLEN, J. T.; LI, Y. S. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites and Vectors**. V. 3, nº 1, pág. 60, 2010.

APPOLLONI, I. et al. PDGF-B induces a homogeneous class of oligodendrogliomas from embryonic neural progenitors. **Int J Cancer**. V. 11, pág. 2251–2259, 2009.

ASSANAHI, M. et al. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. **J Neurosci**. V. 11, pág. 6781–6790, 2006.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSNI, B. e VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Cancer**. V. 8, pág. 604-617, 2008.

BALESTRIERI, A. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. **Gastroenterology**. V.126, pág. 1740–1749, 2004.

BANDARU, S. et al. Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. **Oncogenesis**. V. 3, pág. 119, 2014.

BARKER, N.; MORIN, P. J. E CLEVERS, H. The Yin-Yang of TCF/ $\beta$ -catenin signaling. **Advances in cancer research**. V. 77, pág. 1-24, 1999.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, pág. 215-233, January, 2009.

BATALLER, R. e BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, 115: 209-218, 2005.

BATALLER, R. et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**. V. 118, pág. 1149-1156, 2000.

BENTER, I. F., FERRARIO, C. M.; MORRIS, M. e DIZ, D. I. Antihypertensive actions of angiotensin-(1–7) in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol**. 269, H313–H319, 1995.

BEUCHLE, D.; SCHWARZ, H.; LANGEGER, M.; et al. Drosophila MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure. **Mech Dev**. V. 124, nº 5, pág. 390-406, 2007.

BHATTACHARYA, R. e CABRAL, F. A Ubiquitous  $\beta$ -tubulin Disrupts Microtubule Assembly and Inhibits Cell Proliferation. **Mol Biol Cell**. V.15, nº 7, pág. 3123–3131, 2004.

BIERNACKA, A.; DOBACZEWSKI, M. e FRANGOIANNIS, N. G. TGF-beta signaling in fibrosis. **Growth Factors**. V. 29, pág. 196-202, 2011.



BISSEL, D. M. et al. Transforming growth factor B and the liver. **Hepatology**. V. 34, nº5, pág. 859-867, 2001.

BLINKIRON, C., et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. **Genome Biol**. V.8, pág. R214, 2007.

BLOOM, L. e HORVITZ, H. R. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. **Proc. Natl. Acad. Sci**. V. 94, pág. 3414-3419, 1997.

BLOOM, W. e FAWCETT, D.W.A. **Text book of histology**, 12<sup>th</sup>, ed. New York: Chapman e Hall, 1994.

BRAY, D. e GILBERT, D. Cytoskeletal elements in neurons. **Annu Rev Neurosci**; pág. 505-23, 1981.

BRADY, S.; COLMAN, D. R. e BROPHY, P. Subcellular organization of the nervous system: organelles and their functions. **Fundamental neuroscience**. San Diego, 9-114, 2003.

BRIGSTOCK, D. R. The CCN family: a new stimulus package. **J Endocrinol**. V.178, pág. 169–175, 2003.

BURT, A. D. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J Pathol**. V. 170,pág. 105-114, 1993.

BIRCHLER, J. A. e VEITIA, R. A. The gene balance hypothesis: From classical genetics to modern genomics. **Plant Cell**. V. 19, pág. 395–402, 2007.

CALDERWOOD, D. A. et al., Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J Biol HSCm**. V. 275(30), pág. 22607-10, 2000.

CALON, A.; LONARDO, E.; BERENQUER-LIERGO, A.; et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. **Nat Genet**. V. 47, pág. 320-329, 2015.

CANBAY A., FRIEDMAN S., GORES G. J. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. **Hepatology**. Vol. 39, 2004.

CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Ed. 5, editora Elsevier. 2014.

CARVALHO-OLIVEIRA, V. et al. MicroRNAs: um novo paradigma no tratamento e diagnóstico da insuficiência cardíaca? **Arq. Bras. Cardiol**. V.98 nº4, 2012.

CASTRO-UMÑOZLEDO, et al. Vimentin as a marker of early differentiating, highly motile corneal epithelial cells. **J CELL PHYSIOL**. V. 232, pág. 818-830, 2017.

CHAU, B. N.; XIN, C.; HARTNER, J. et al., MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. **Sci Transl Med**. V. 4, nº 121, pág. 121, 2012.

COUZENS A. L.; SARIDAKIS, V. e SHSCID, M. P. The hydrophobic motif of ROCK2 requires association with the N -terminal extension for kinase activity. *BioHSCm J*, V. 419, nº 1, pág. 141–148, 2009.

DAI C. et al. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. **Genes dev**. V. 11, pág. 1913–1925, 2001.

DATTA, S. R. et al. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes dev**. V. 13, nº 22, pág. 2905-2927, 1999.

DERYNCK, R. e ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**. V. 425, pág. 577–584, 2003.

ECKLER, J. M. e CHEN, B. Fez family transcription factors: controlling neurogenesis and cell fate in the developing mammalian nervous system. **BioEssays**. 2014.  
**DOI:** 10.1002/bies.201400039.

EITZEN, G. Actin remodeling to facilitate membrane fusion. **Biochim Biophys Acta**. V. 1641, pág. 175-181, 2003.

ELPEK, K. G.; CREMASCO, V.; SHEN, H.; et al., The tumor microenvironment shapes lineage, transcriptional, and functional diversity of infiltrating myeloid cells. **Cancer Immunol Res**. V. 2, nº 7, pág. 655-667, 2014.

ELSHARKAWY, A. M., OAKLEY F., MANN D. A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. **Apoptosis**. V. 10, pág. 927–939, 2005.

FAILLI, P. et al., Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**. V. 119, nº 2, pág. 479-492, 2000.

FARCI, P.; ROSKAMS T.; HSCSSA L.; et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. **Gastroenterology**. V. 126, nº 7, pág. 1740-1749, 2004.

FLANAGAN, L. A., CHOU, J., FALET, H., NEUJAHN, R., HARTWIG, J. H., and STOSSEL, T. P. **J. Cell Biol**. V. 155, pág. 511–517, 2001.

FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J. e JESSUP, J. A. Advances in bioHSCmical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. V. 289, pág. H2281–H2290, 2005.

- FERRAZ, F. B. e FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**. V. 9, pág. 25-34, 2014.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. e ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1–7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**. V. 38, 665–668, 2001.
- FERREIRA, A. J. e SANTOS, R. A. S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz J. Med Biol Res**. V. 38, pág. 499-507, 2005.
- FRANKE, T. F. et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell**. V. 81, nº 5, pág. 727-736, 1995.
- FRIEDMAN, S. L.; ROLL, F. J.; BOYLES, J. e BISSELL, D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proc Natl Acad Sci**. V. 82, pág. 8681–8685. 1985.
- FRIEDMAN, S. L. Cytokines and Fibrogenesis. **Semin. Liver Dis**. 19:129-37. 1999.
- FRIEDMAN, S. L. Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. **Hepatitis annual update**. Pág. 13-39, 2003.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. Division of Liver Diseases, Mount Sinai School of Medicine. **Physiol Rev**. January, 88(1): 125–172., New York, 2008.
- FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.; BURGE, C. B. e BARTEL D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**. V. 19, pág. 92 - 105, 2009.
- FRIEDMAN, J.; HASTIE, T. e TIBSHIRANI, R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. **J Stat Softw**. V. 33(1), pág. 1–22, 2010.
- FUJITA, S. et al. Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. **J appl physiol**. V. 103, nº 3, pág. 903-910, 2007.
- FUKATA, M. e KAIBUCHI, K. *Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. V. 2, pág. 887-897, 2001.
- FUCHSHOFER, R. et al. Transforming growth factor-beta 2 modulated extracellular matrix component expression in cultured human optic nerve head astrocytes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. V. 46, 568–578, 2005.
- GAMAZON, E. R.; INNOCENTI, F.; WEI, R.; WANG, L.; ZHANG, M.; MIRKOV, S.; RAMIREZ, J.; HUANG, R. S.; COX, N. J. e RATAIN, M.J.; et al. A genome-wide integrative study of microRNAs in human liver. **BMC Genom**. V.14, pág. 395, 2013.
- GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**. V. 9, pág. 775-789, 2010.

- GIRGRAH, N.; LIU, P.; COLLIER, J.; et al., Haemodynamic, renal sodium handling, and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. **Gut**. V. 46, pág. 114-120, 2000.
- GIRIDHARAN, S. S. P.; ROHN, J. L.; NASLAVSKY, N. e CAPLAN, S. Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. **J Cell Sci**. V. 125, nº 3, pág. 614-624, 2012.
- GIRIDHARAN, S. S. P. e CAPLAN, S. MICAL-Family Proteins: Complex Regulators of the Actin Cytoskeleton. **Antioxidants e Redox Signaling**. V. 20, nº 13, 2059-2073, 2014.
- GONÇALVES, J. O. et al. Dynamic expression of *desmin*,  $\alpha$ -SMA and *TGF- $\beta$ 1* during hepatic fibrogenesis induced by selective bile duct ligation in young rats. **Braz J Med Biol Res**. V. 47 nº10, pág. 850–857, 2014.
- GRANT, B. RoHSC set to buy RNA firm. Ontario. LabX Media Group, 2014.
- GREEN, M. R. e SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4º ed. Nova York. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press, pág. 64-65, 2012.
- GREEN, M. R. e SAMBROOK, J. R. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4º ed. Nova York. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press, pág. 2028, 2012.
- GRESSNER, O. A.; WEISKIRHSCN, R. e GRESSNER, A. M. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. **J Cell Mol Med**. V. 11, nº 5, pág. 1031-51, 2007.
- GRIFFITH-JONES, S.; GROCOCK, R. J. DONGEN, S.V.; et al., Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. **Nucleic Acids Res**. Ed. 33, pág. D121-D124, 2005.
- GRIGORIEV, I.; et al., Report Rab6, Rab8, and MICAL3 Cooperate in Controlling Docking and Fusion of Exocytotic Carriers. **Current Biology**, ed. Elsevier, v.21, pág. 967-974, 2011.
- GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; LINGIS, M.; SHENOY, V.; BOLTON, T. A.; MACHADO, J. M.; SPETH, R. C.; RAIZADA, M. K. e KATOVICH, M. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1–7). **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. V. 292, pág. H736–H742, 2007.
- GUMA, F. C. R. et al. Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. **BioHSCm Cell Biol**. V. 74, nº 4, pág. 409-417.
- GUN, B. T. V.; MELHSCRS, L. J.; RUITERS, M. H.; et al., EPCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. **Carcinogenesis**. V. 31, nº 11, pág. 1913-1921, 2010.
- GUO, C. J.; PAN, Q.; LI, D. G.; SUN, H.; LIU, B. W. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: an essential role for apoptosis, **J. Hepatol**. V. 50, nº4, pág. 766–778, 2009.

GUPTA, R. A.; SHAH, N.; WANG, K. C.; et al., Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**. V. 464, pág. 1071–1076, 2010.

HALYKO, A., STELMACK, G. The associated of caveolae, actin and the dystrophinglycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function? **Can. J. Pharmacol.** V. 83, pág. 877-91, 2005.

HAMILTON, L. K; DUFRESNE, M.; JOPPÉ, S. E.; et al.\_Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain NiHSC Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. **Cell Stem Cell**. V. 17, nº 4, pág. 397-411, 2015.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P. e LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 460-469, 2014.

HELDIN, C. H. e MOUSTAKAS, A. Signaling Receptors for TGF-b Family Members. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**. V. 8, nº 8, 2016

HENDERSON, N. C. e FORBES, S. J. **Hepatic fibrogenesis: from within and outwith**. *Toxicology*. 254(3):130-5. 2008.

HERMEKING, H. The miR-34 family in câncer and apoptosis. **Cell Death Differ**. V. 17(2), pág. 193-199, February, 2010.

HERNANDEZ-GEA, V. e FRIEDMAN, S. L. **Pathogenesis of liver fibrosis**. *Annu Rev Pathol*. 6:425-56. 2011.

HIROYOSHI H. et al. High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-b1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. **British Journal of Haematology**. V. 115, pág. 472-475, 2001.

HOU, J.; LIN, L.; ZHOU,W.; WANG, Z.; DING, G.; DONG, Q.; QIN, L.; WU, X.; ZHENG, Y. e YANG, Y. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell**. 19, 232–243, 2011.

HSCN, N.; GUO, D. XU, Q.; et al.,Long non-coding RNA FEZF1-AS1 facilitates cell proliferation and migration in colorectal carcinoma. **Oncotarget**. V. 7,nº 10, pág. 11271–11283, 2016.

HUI, C.K.; LEUNG, N.; SHEK, T.W.; YAO, H.; LEE, W. K.; LAI, J.Y.; LAI, S. T.; WONG, W. M.; LAI, L. S.; POON, R. T.; LO, C. M.; FAN, S. T. e LAU, G. K. Sustained disease remission after spontaneous HBeAg seroconversion is associated with reduction in fibrosis progression in chronic hepatitis B Chinese patients. **Hepatology** 46: 690–698, 2007.

HUANG, G. e Brigstock, D. R. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. **Front.Biosci**. V.17, pág. 2495–2507, 2012.

HUEN, S. C. et al. Macrophage-specific deletion of transforming growth factor- $\beta$ 1 does not prevent renal fibrosis after severe isHSCmia-reperfusion or obstructive injury. **Am J Physio Renal Physiol**. V. 305, nº 477-484, 2013.

HUNG, C. M. A.; MIHSCEL, L. D.; BOZANO, L. W.; et al., Spatially-Directed Assembly of Gold Nanoparticles on Lithographically Patterned DNA Origam. **Nature Nanotechnology**. V. 5, pág. 121-126, 2010.

HYAMS, J. S. e LLOYD, C. W. **Microtubules**. Nova York. Editora John Wiley. 1993.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**. V. 110, nº 6, pág. 673-687, 2002.

HOSAKA, T.; SUZUKI, F. e KOBAYASHI, M. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. **Hepatology**. V. 58, nº 1, pág. 98-107, 2013.

IWAISAKO, K.; BRENNER, D. A. e KISSELEVA, T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. **J Gastroenterol Hepatol**. V. 27, nº 2 pág. 65 - 68. 2012.

JANSSEN H. L. et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. **N Engl J Med**. V.368(18), pág. 1685-1694, May, 2013.

JEON, G. W.; LEE, M. N.; JUNG, J. M.; HONG, S. Y.; KIM, Y. N.; SIN, J. B. e KI, C. S. Identification of a de novo heterozygous missense FLNB mutation in lethal atelosteogenesis type I by exome sequencing. **Ann Lab Med**. V. 34, pág. 134–138. 2014.

JI, J., ZHANG, J., HUANG, G. et al. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation, **FEBS Lett**. V.583, nº 4, pág.759–766, 2009.

JONSSON, J. R. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. **Gastroenterology**. V. 121, pág. 148-155, 2001.

JUNQUEIRA L. C; CARNEIRO J. (2004). *Histologia Básica*. Guanabara Koogan. 10 edição.

KANDA, S. e SMITHGALL, T. E. Downregulation of the c-Fes protein-tyrosine kinase inhibits the proliferation of human renal carcinoma cells. **Int. J. Oncol**. V. 34, nº1, pág. 86-89, 2009.

KIEMA, T. et al. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. **Molecular Cell**. V: 21, pág. 337-347, 2006.

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA J. C.; SCHWABE R. F.; BRENNER D. A. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **J Hepatol**. 45(3):429-38.2006.

KISSELEVA, T. e BRENNER, D. A. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc.* Apr 15;5 (3):338-42, 2008.

KUBICZKOVA, L. et al. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* V. 10, pág. 183, 2012.

JOHNSON D. R. **Physiology of the Gastrointestinal Tract.** 2ª edição. New York, NY: Raven, pág. 423– 482, 1987.

JUNQUEIRA L. C. e CARNEIRO J. *Histologia Básica.* Guanabara Koogan. 10 edição, 2004.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKELI W. e TUSCHLT. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, v. 294, pág. 853-858, October, 2001.

LAGOS-QUINTANA, M. RAUHUT, R.;YALCIN, A.; et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* V. 12, pág. 735-739, 2002.

LAU, J.; CASTELLI, L. A.; LIN, E. C. e MACAULAY, S. L. Identification of elongation factor 1alpha as a potential associated binding partner for Akt2. *Mol Cell BioHSCm*, V. 286, nº 1–2, pág.17–22, 2006.

LAW, P. T.; QIN, H.; CHING, A. K.; LAI, K. P.; CO, N. N.; HE, M.; LUNG, R. W.; CHAN, A. W.; CHAN, T. F. e WONG, N. Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* V. 58, pág.1165–1173, 2013.

Lee, S. Y. et al. Identification of transforming growth factors actively transcribed during the progress of liver fibrosis in biliary atresia. *J Pediatr Surg.* V. 39, pág. 702-708, 2004.

LEE, J. K. et al. Effects of single dose of 50 mg captopril in patients with liver cirrhosis and ascitis. *Hepato-Gastroenterology.* V. 47, pág. 767-770, 2000.

LEE, U. E. e FRIEDMAN, S. L. **Mechanisms of hepatic fibrogenesis.** *Best Pract Res ClinGastroenterol.* 25(2):195-206. 2011.

LEGRIER, M. E.; YANG, C. P.; YAN, H. G.; et al. Targeting protein translation in human non small cell lung cancer via combined MEK and mammalian target of rapamycin suppression. *Cancer Res.* V. 67, nº 23, pág. 11300-11308, 2007.

LEITE, C. A. V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. *Revista brasileira de Oncologia Clínica.* V. 8, n. 29, 2012.

LI, Z. J; OU-YANG, P. H; HÁ e N X. P. Profibrotic effect of miR-33a with Akt activation in hepatic stellate cells TGF. *Cellular Signalling.* 26 141–148, 2014.

LINDOW, M. e KAUPPINEN, S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biology.* V. 199(3), pág. 407-4012, October, 2012.

- LIU, Y.; LIU, H.; MEYER, C.; et al., Transforming Growth Factor $\beta$  (TGF $\beta$ ) mediated Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Expression in Hepatic Stellate Cells Requires Stat3 Signaling Activation. **J Biol HSCm**. V. 288, nº 42, pág. 30708–30719, 2013.
- LIU, P. et al. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. **Nature**. V. 508, nº 7497, pág. 541-545, 2014.
- LI, D. e MRSNY, R. J. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. **J Cell Biol**. V. 148, nº 4, pág. 791-800, 2000.
- LI, Y.; HSCN, W.; HE, F.; et al. Neat expression is associated with tumor recurrence and unfavorable prognosis in colorectal cancer. **Oncotarget**. V. 6, pág. 27641–27650, 2015.
- LUBEL, J. S.; HERATH, C. B.; TCHONGUE, J.; et al. Angiotensin-(1–7), an alternative metabolite of the renin–angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated. **Clinical Science**. V. 117, pág. 375–386, 2009.
- LORENZI, J. C. C. e ZANETTE D. L. **Introdução ao mundo dos micro RNAs**. Ed. Cubo, Ribeirão Preto, SP. Cap. 11, pág. 191-209, 2015.
- LUNDQUIST, M. R. Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling. **Cell**. V. 156(3), pág. 563-576, Jan. 2014.
- MACHADO, R. D. P.; SANTOS, R. A. S.; ANDRADE, S. P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. **Life Sci**. V. 66, pág. 67-76, 1999.
- MAETZEL, D.; DENZEL, S.; MACK, B.; et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat Cell Biol**. V. 11, pág. 162-171, 2009.
- MAJUMDAR A. et al. Hepatic stem cells and transforming growth factor  $\beta$  in hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. V. 9, pág. 530-538, 2012.
- MARANGONI, R. A.; CARMONA, A. K.; PASSAGLIA, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B. e CARVALHO, M. H. Role of the kallikrein-kinin system in Ang-(1–7)-induced vasodilation in mesenteric arterioles of Wistar rats studied in vivo in situ. **peptides**. V. 27, pág. 1770–1775, 2006.
- MARKOVICS, J. A. et al. Interleukin-1 $\beta$  Induces Increased Transcriptional Activation of the Transforming Growth Factor- $\beta$ -activating Integrin Subunit  $\beta$ 8 through Altering Chromatin Architecture. **J Biol HSCm**. Ed. 286(42), pág. 36864-36874, 2011.
- MARTIN, S. e PARTON, R. G. Lipid droplets: A unified view of a dynamic organelle. **Nat Rev Mol Cell Biol**. V. 7, pág. 373–378, 2006.
- MENDEL, J. T. e OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**. V. 148, nº 6, pág. 1172-1187, 2012.
- MIYAMOTO, S. et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal ad signalling



molecules. **J. Cell Biol.** V. 131, pág. 791-805, 1995.

MOKDAD, A. H.; JABER, S.; AZIZ, M. I. A.; ALBUHAIRAN, F.; ALGHAITHI, A. e ALHAMAD, N. M. The state of health in the Arab world, 1990–2010: an analysis of the burden of diseases, injuries, and risk factors. **Lancet.** V. 383, nº 9914, pág. 309–20, 2014.

MÓLNAR, A.; SCHWACH, F. S.; TULDHOLME, D. J.; THUENEMANN, E. C. e BAULCOMBE, D. C. MiRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature.** v. 447, pág. 1126-1129, June, 2007.

MORANDI, E. M. et al. ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells. **Sci Rep.** Ed.6, pág. 288-289, 2016.

MORIN, L. P.  $\beta$ -catenin signaling and cancer. **Bioessays.** V. 21, nº 12, pág. 1021-1030, 1999.

MUBARACK M. et al. Signal Transduction Mechanisms Involved in Angiotensin-(1–7)-Stimulated Arachidonic Acid Release and Prostanoid Synthesis in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** Ed. 284(1), pág. 388-398, 1998.

NAGAE, M. et al. Crystal structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. **J Cell Biol.** Ed. 197(1), pág. 131-140, 2012.

NOBES, C.; HALL, A. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. **Curr Opin Genet Dev.** V. 4, pág. 77-81, 1994.

NOJIMA, H. et al. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. **Nature Cell Biology.** Ed 10, pág. 971-978, 2008.

OLIVEIRA, F. S. A contribuição do fator transformador de crescimento beta- 1 – TGF- $\beta$ 1 na fibrose hepática: estudos in vivo e in vitro. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Saúde da criança e do adolescente. Porto Alegre, 2009.

OSANAI, M.; MURATA, M.; NISHIKIORI, N.; et al. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. **Cancer Res.** V. 66, pág. 9125–33, 2006.

PAIZIS, G. Effect of Angiotensin II type I receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. **Journal Hepatol.** V. 35, pág. 376-385, 2001.

PAIZIS, G.; COOPER, M. E.; SHSCMBRI, J. M.; TIKELLIS, C.; BURRELI, L.M. e ANGUS, P. W. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. **Gastroenterology.** V. 123, pág. 1667-1676, 2002.

PAIZIS, G.; TIKELLIS, C.; COOPER, M.E.; et al. Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. **Gut,** V. 54, nº12, pág. 1790-1796, 2005.

PAULIN, D. e LI Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Experimental Cell Research**. V. 301,nº 1, pág. 1-7, 2004.

PAWAR, S. C. e CRESS, A. E. Integrin alpha6 cleavage: a novel modification to modulate cell. **Exp. Cell Res**. 2007

PEREIRA, R. M. et al. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin. **J. Hepatol**. Pág. 1–7, 2006.

PEREIRA, R. M. e SANTOS, R. A. S. Dias, F.L.C.; Teixeira, M.M.; Silva, A.C..S. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver Fibrosis World. **J Gastroenterol**. V. 15,nº 21, pág. 2579-2586, 2009.

PIETRAS, K. et al. PDGF receptors as cancer drug targets. **Cancer Cell**. V. 11, pág. 439–443, 2003.

PLOTZ, T. et al., The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. **Nutr Metab**. 2016.

PONTICOS, M. JunB mediates enhancer/promoter activity of COL1A2 following TGF- $\beta$  induction. *Ed. 37(16)*, pág. 5378-5389, 2009.

POPOWICZ, G. M.; SCHLEICHER, M.; NOEGEL, A. A. e HOLAK, T. A. Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. **Trends Biochem Sci**. V. 31, pág. 411–419, 2006.

RAZINIA Z.; MÄKELÄ, T.; YLÄNNE, J. e CALDERWOOD, D. A. Filamins in mechanosensing and signaling. **Annu Rev Biophys**. V.41, pág. 227–246. 2012.

REYNAERT, H.; THOMPSON, M. G.; THOMAS, T. e GEERTS, A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. **Gut**. V. 50, pág. 571–581, 2002.

RESZKA, A. A.; HAYASHI, Y. e HORWITZ, A. F. Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. **The Journal of Cell Biology**. V. 117, nº 6, pág. 1321–1330, 1992.

ROCKEY, D. C. Cellular pathophysiology of portal hypertension and prospects for management with gene therapy. **Clin Liver Dis**. V. 5, pág. 851–865, 2001.

ROMBOUTS, K.; MELLO, T.; LIOTTA, F.; et al. A capacidade de ligação de actina de MARCKS medeia a montagem de filamentos de actina durante a mitose em células estreladas hepáticas humanas. **Am J Physiol Cell Physiol**. V. 303, pág. C357-C367, 2012.

- RUIFENG Y. et al. Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells. **Nat Commun.** Ed. 5, pág. 3071, 2014.
- RUNKLE, M. U. Tight junction proteins: From barrier to tumorigenesis. **Cancer Letters.** V. 337, nº 1, pág. 41-48, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2º ed. Nova York. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled Receptor MAS. **Proc Natl Acad Sci.** V. 100, nº 14, pág. 8258-8263, 2003.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin (1-7) and receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* V. 14, nº 8, pág: 1019-1031, 2005.
- SANTOS, R. A. e FERREIRA, A. J. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. **Cardiovasc. Drug Rev.** V. 24, pág. 239-246, 2006.
- SASTRY, S. K. e HRWITZ, A. F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. **Current Opinion in Cell Biology.** V. 5, pág. 819-831, 1993.
- SCHNAPER, H. W. et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* V. 284, pág. 243-252, 2003.
- SCHWARZ, D. S. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell,** 115, pág. 199-208, October, 2003.
- SCHWARZBAUER, J. Basement membrane: putting up the barriers. **Curr. Biol.** V. 9, pág. 242-244, 1999.
- SENOO, H.; YOSHIKAWA, K.; MORII, M.; MIURA, M.; IMAI, K. e MEZAKI, Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future, *Cell Biol. Int.* 34, 1247-1272, 2010.
- SENOO H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.* 37:3-15, 2004.
- SILVA, D. M. R.; VIANNA, H. R.; CORTES, S. F; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S. e LEMOS, V.S. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. **peptides.** V. 2, nº 8, pág. 702-707, 2007.
- SIMÕES e SILVA, A. C.; PINHEIRO, S. V. B.; PEREIRA, R. M.; FERREIRA A. J. e SANTOS R. A. S. The therapeutic potential of angiotensin-(1-7) as a novel renin angiotensin system mediator. **Mini-Ver Med HSCm.** V. 6, pág. 603-609, 2006.
- STARKEY, L. P. J; et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. **Hepatology.** V. 54, pág. 1767-1776, 2011.
- STEILING, H. et al. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. **Am J Pathol,** V. 165, pág. 1233-1240, 2004.

- STOFFEL A. Targeted therapies for solid tumors: current status and future perspectives. **Bio Drugs**. V. 24, nº 5, pág. 303-316, 2010.
- STOSSEL, T. P. e HARTWIG, J. H. Filling gaps in signaling to actin cytoskeletal remodeling. **Dev Cell**. V. 4, pág. 444–445, 2003.
- STOTZ, H. U. e LONG, S. R. Expression of the pea (*Psium sativum* L.)  $\alpha$ -tubulin gene TubA1 is correlated with cell division activity. **Plant Mol Biol**. V. 41, pág. 601, 1999.
- TAKAHASHI, K. e YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. **Development**. V. 140, nº12, pág. 2457-2461, 2013
- TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M. e GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. V. 289, pág. H1560–H1566, 2005.
- TANABE, K. Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**. V. 8, pág. 6353-6363. 2017.
- TANAKA, T.; NISHIMURA, D.; WU, R. C.; AMANO, M.; ISSO, T.; KEDES, L. et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. **J. Biol. HSCm**. V. 281, pág. 15320–15329, 2006.
- TENG, K.Y. e GHOSHAL, K. Role of noncoding RNAs as biomarker and therapeutic targets for liver fibrosis. **Gene Expr**. V. 16, pág. 155–162, 2015.
- TESTERINK N.; AJAT M.; HOUWELING M.; BROUWERS J. F.; PULLY V. V.; MANEN H. J. V.; OTTO C.; HELMS J. e VAANDRAGER, A. B. Replacement of Retinyl Esters by Polyunsaturated Triacylglycerol Species in Lipid Droplets of Hepatic Stellate Cells during Activation. **PLoS ONE**, V. 7, nº 4, 2012.
- THUM, T.; GALUPPO, P.; WOLF, C.; FIEDLER, J.; KNEITZ, S.; VAN LAAKE, L. W.; et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. **Circulation**. V. 116, pág. 258–267, 2007.
- TORRES-FLORES, J. M. e ARIAS, C. F. Tight Junctions Go Viral. **VIRUSES**. V. 7, nº 9, pág. 5145-5154, 2015.
- TRANG, P. et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumor in mice. **Mol Ther**. V. 19, nº 6, pág. 1116-1122, June, 2011.
- TYURIN-KUZMIN, P. A. Nox4 and Duox1/2 Mediate Redox Activation of Mesenchymal Cell Migration by PDGF. **PLoS One**. V. 11, nº 4, 2016.
- TURNER, S. D. et al. The E2 ubiquitin conjugase Rad6 is required for the ArgR/Mcm1 repression of ARG1 transcription. **Mol Cell Biol**. V. 22, nº12, pág. 4011-4019, 2002.

UHRBOM, L. et al. Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. **Cancer Res.** V. 11, pág. 5275-5279, 1998.

UHRBOM, L. et al. Dependence of autocrine growth factor stimulation in platelet-derived growth factor-B-induced mouse brain tumor cells. **Int J Cancer.** V. 11, pág. 398–406, 2000.

VALADI, H.; EKSTROM, K.; BOSSIOS, A.; et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology.** Ed. 9, pág. 654-659, 2007.

VAN ROOJI, E. e OLSON, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **J Clin Invest.** V. 117, nº 9, pág. 2369-2376, 2007.

VARMA, et al. The histological quantification of alpha-smooth muscle actin predicts future graft fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant.* V.21, doi: 10.1111/PETR.12834, 2017.

VENUGOPAL, S. K. et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA150 and miRNA194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cellactivation, **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** V. 298, nº1, pág.G101–G106, 2010.

VON BUBNOFF, A. e CHO, K. W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? **Dev Biol.** V. 239, pág. 1–14, 2001. 42.

XIAO X. et al. TGFbeta receptor signaling is essential for inflammation-induced but not beta-cell workload-induced beta-cell proliferation. **Diabetes.** V. 62, pág. 1217–1226, 2013.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Liver.** V. 54, pág. 142-151, 2005.

WANG, S. e HIRSCHBERG, R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol HSCm.* V. 279, pág. 23200–23206, 2004.

WANGUE, Y. et al., ROCK Isoform Regulation of Myosin Phosphatase and Contractility in vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation Research.** V: 104, pág. 531-540, 2009.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ.** V. 27, 201-206, 2003.

WEYMOUTH, S. 2012 vai ficar XU, J.; Liu, X.; KOYAMA, Y. et al., The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of diferent etiologies. **Front Pharmacol.**V. 5, nº 167, 2014.

WINAU, F.; QUACK, C.; DARMOISE, A. e KAUFMANN, S. H. Starring stellate cells in liver immunology. **Curr Opin Immunol.** V. 20, nº 1,pág. 68-74, 2008.

Yang, D., Buchholz, F., Goga, A., HSCn, C.Y., Brodsky, F.M., Bishop, J.M. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V.99, nº15, pág. 9942—9947, 2002.

YANG, C. et al. Liver Fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cell in response to extracellular matrix and growth factors. **Gastroenterology.** V. 124, pág. 147-159, 2003.

YU, L. et al. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int.* V.64, pág. 844–856, 2003.

ZIEBA, et al. TGF $\beta$  and BMP dependent cell fate changes due to loss of FLNB produces disc degeneration and progressive vertebral fusions. **PLOS GENETICS.** 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005936>.

ZODE, G. S. et al. Transforming growth factor- $\beta$ 2 increases extracellular matrix proteins in optic nerve head cells via activation of the Smad signaling pathway. **Mol Vis.** V. 17, pág. 1745-1758, 2011.

ZUCCHINI, D. et al., Kinetic and spectroscopic characterization of the putative monooxygenase domain of human MICAL-1. **Arch. BioHSCm. Biophys.** Ed. 515, pág 1-13, 2011.