

---

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

---

**ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRORNA-1914-5P NO METABOLISMO DE  
LIPÍDEOS DE CÉLULAS HEPÁTICAS TUMORAIS**

**Marina Bonfogo da Silveira**

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).

**Rio Claro - SP  
Fevereiro - 2019**

# **ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRORNA-1914-5P NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS DE CÉLULAS HEPÁTICAS TUMORAIS**

**Marina Bonfogo da Silveira**

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

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).

**Rio Claro - SP  
Fevereiro - 2019**

S587a Silveira, Marina Bonfogo da  
ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRORNA-1914-5P  
NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS DE CÉLULAS  
HEPÁTICAS TUMORAIS / Marina Bonfogo da Silveira.  
-- Rio Claro, 2019  
74 p. : il., tabs.

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

1. miRNA hsa-miR-1914-5p. 2. Metabolismo de  
lipídeos. 3. Hepatocarcinoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do  
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRONA-1914-5P NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS EM CÉLULAS HEPÁTICAS TUMORAIS

**AUTORA: MARINA BONFOGO DA SILVEIRA**

**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 / IB Rio Claro



Prof. Dr. JORG KOBARG  
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual / UNICAMP



Profa. Dra. ROSEMARI OTTON  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Cruzeiro do Sul

Rio Claro, 25 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo de lipídeos em células hepáticas tumorais"

**Dedico essa pesquisa à minha família  
e ao meu suporte mental, Fernando.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Karen Cristiane Martinez de Moraes por mais esses dois anos de compartilhamento de experiências e aprendizado que possibilitaram toda a trajetória até a conclusão desse trabalho, além do meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço também à todo o Grupo de Pesquisa Terapia do RNA do Laboratório de Biologia Molecular UNESP - Rio Claro, em especial os alunos de mestrado, Priscila, Caio, Letícia e Thais, pelo trabalho em equipe, diálogos profundos e por sempre estarem dispostos a ajudar onde preciso. Sentirei muito a falta de vocês e sei que a imensa competência que vocês carregam irá permitir que alcancem todos os seus sonhos.

Agradeço também a minha irmã Mariana e ao Fernando pelo imenso apoio emocional nesses dois anos e por me ajudarem a compreender algumas das infinitas linhas que tecem a felicidade e me oferecerem suporte psicológico para tentar novamente.

Agradeço também a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, principalmente ao Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Por fim, agradeço à CAPES e FAPESP (Processo 2013/21186-5 e Processo 2018/05286-3) pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse estudo. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram nesse trabalho e na minha construção pessoal e profissional, meu muito obrigada.

*“Não havia como saber, na época, o que sei agora.  
Se isso fosse possível, primeiro eu teria realmente aberto o coração.  
A cabeça é poderosa, mas ela só pode nos dar  
o que de fato queremos se, primeiro, abirmos nosso coração.”*

(James R. Doty – A Maior de Todas as Mágicas)

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma é um dos tipos mais comuns de câncer no mundo e o com maior taxa de mortalidade devido ao seu diagnóstico tardio. Novas terapias envolvendo o controle da síntese de ácidos graxos é uma potencial estratégia contra a tumorigênese e a progressão tumoral, visto que alterações no metabolismo de lipídeos podem limitar a proliferação de células cancerígenas, assim como uma dieta rica em gorduras pode favorecer doenças que acometem o fígado e até estimular a metástase de alguns cânceres. Pequenas moléculas, como os microRNAs, podem ser usadas como controladoras desse metabolismo e possibilitam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Assim sendo, esse estudo avaliou os efeitos moleculares e celulares do miR-1914-5p em culturas celulares hepáticas, Hep G2 e SK-HEP-1, no que tange o seu papel no metabolismo de lipídeos e a consequência das alterações nessa via para a migração das células. Para isso, foram realizados ensaios de PCR quantitativa e *Western Blot* para moléculas correlatas ao metabolismo lipídeo, marcação de ácidos graxos por microscopia de luz e fluorescência, além da quantificação desses por cromatografia gasosa acoplada à um espectrometro de massa. Também foram realizados ensaios de análise de proliferação e migração celular, como o ensaio da ferida e da gota de agarose. Os resultados mostraram que altos níveis do miR-1914-5p causaram regulação da expressão gênica e altos níveis proteicos da Malonil-CoA Descarboxilase e da Ácido Graxo Sintase. Por consequência, um número elevado de gotículas lipídicas e aumento de ácidos graxos foram observados. Esses resultados combinados com a alta expressão de Lipina 1 sugerem correlação do miR-1914-5p e o acúmulo de gordura em células de hepatocarcinoma. Por outro lado, a inibição do miR-1914-5p parece ter efeito reverso, causando possível ativação da via de  $\beta$ -oxidação caracterizado pela ausência de gotículas lipídicas e alta expressão de Acetil-CoA Carboxilase  $\beta$ . Também foi observado um possível estresse metabólico perante a inibição miR-1914-5p. Esses dados sugerem o potencial modulatório do miR-1914-5p sobre o metabolismo de lipídeos em câncer de fígado.

**Palavras-chave:** miRNA hsa-miR-1914-5p. Metabolismo de lipídeos. Hepatocarcinoma.



## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma or hepatocarcinoma is one of the most common types of cancer in the world and the one with the highest mortality rate due to its late diagnosis. New therapies involving the control of fatty acid synthesis is a potential strategy against tumorigenesis and tumor progression, since alterations in lipid metabolism may limit the proliferation of cancer cells, as a diet rich in fats may favor diseases that affect the liver and even stimulates the metastasis of some cancers. Small molecules, such as microRNAs, can be used as controllers of this metabolism and enable the development of new therapeutic strategies. Thus, this study evaluated the molecular and cellular effects of miR-1914-5p on hepatic cell cultures, Hep G2 and SK-HEP-1, as regards its role in lipid metabolism and the consequence of alterations in this pathway to cell migration. For this, quantitative PCR and Western Blot assays were performed for molecules correlated to lipid metabolism, labeling of fatty acids by light microscopy and fluorescence, besides the quantification of these by Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer. Cell proliferation and migration assays were also performed, such as the Wound Healing and Agarose Assay. The results showed that high levels of miR-1914-5p caused regulation of gene expression and high protein levels of Malonyl-CoA Decarboxylase and Fatty Acid Synthase. Consequently, a high number of lipid droplets and increased fatty acids were observed. These results combined with the high expression of Lipin 1 suggest correlation of miR-1914-5p and accumulation of fat in hepatocarcinoma cells. On the other hand, inhibition of miR-1914-5p seems to have a reverse effect, causing possible activation of the  $\beta$ -oxidation pathway characterized by the absence of lipid droplets and high expression of Acetyl-CoA Carboxylase  $\beta$ . Potential metabolic stress was also observed against miR-1914-5p inhibition. These data suggest the modulatory potential of miR-1914-5p on lipid metabolism in liver cancer.

**Key words:** miRNA hsa-miR-1914-5p. Lipid metabolism. Hepatocarcinoma.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACC1 – Acetil-CoA carboxilase  $\alpha$
- ACC2 – Acetil-CoA carboxilase  $\beta$
- ACSL4 – Acil-CoA sintetase de cadeia longa 4
- ACSL5 – Acil-CoA sintetase de cadeia longa 5
- AG – Ácidos graxos
- AGO2 – Argonauta 2
- Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
- ASO – Oligonucleotídeos antisense
- ATGL – Lipase de triglicerídeos de tecido adiposo
- ATP – Trifosfato de adenosina
- cDNA – DNA complementar
- CoA – Coenzima A
- CPT1 – Carnitina-aciltransferase 1
- CPT2 – Carnitina-aciltransferase 2
- CS – Citrato sintase
- DGAT1 – Diacil-glicerol acyltransferase 1
- DGAT2 – Diacil-glicerol acyltransferase 2
- DGCR8 – Di George *syndrome critical region* 8
- ELOVL7 – Elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 7
- FASN – Ácido graxo sintetase
- GC/MS – Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa
- HCC – Carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma
- HCV – Vírus da Hepatite C
- miRNA – MicroRNA
- MLYCD – Malonil-CoA descaboxilase
- mRNA – RNA mensageiro
- PBS – Tampão fosfato salino
- PKA – Proteína-cinase dependente de cAMP
- PPAR- $\alpha$  – Receptor ativador proliferador de peroxissomo  $\alpha$
- PPAR- $\gamma$  – Receptor ativador proliferador de peroxissomo  $\gamma$
- pre-miRNA – MicroRNA precursor
- pri-miRNA – MicroRNA primário

PVDF – Difluoreto de polivinilideno

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real da transcrição reversa

RISC – Complexo ribonucleoproteico funcional RNA indutor de silenciamento

RNAi – RNA de interferência

SBF – Soro fetal bovino

SCD1 – Esteroil-CoA dessaturase ou  $\Delta 9$  dessaturase

SIRT1 – Sirtuína 1

SREBP-1c – Fator de transcrição de elementos reguladores de esteróis 1c

UCKL1 – Uridina-citidina quinase-like 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 Hepatocarcinoma: um painel geral.....	12
1.2 Metabolismo de lipídeos como alvo de terapias contra cânceres.....	13
1.3 Terapêutica baseada em miRNA para o Hepatocarcinoma.....	17
1.3.1 miRNAs como Moduladores do Equilíbrio Celular: Biossíntese e Função.....	17
1.3.2 Terapêutica do miRNA no hepatocarcinoma.....	19
1.3.3 miRNA 1914-5p e o metabolismo de lipídeos no fígado: uma investigação pertinente.....	20
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivos gerais.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Cultura celular e transfecção transiente de mímicos e inibidores do miR-1914-5p.....	24
3.2 Extração de RNA total e de miRNA, e transcrição reversa.....	25
3.2.1 Extração de RNA total.....	25
3.2.2 Extração de miRNA.....	26
3.2.3 Transcrição reversa: RNA.....	26
3.2.4 Transcrição reversa: miRNA.....	27
3.3 Análise de expressão gênica por qPCR.....	27
3.3.1 Reações de qRT-PCR: mRNAs.....	27
3.3.2 Reações de qPCR: Análise da expressão diferencial e validação de miRNA.....	29
3.4 Análises de metabolismo de lipídeos.....	29
3.4.1 Marcação de gotículas de lipídeos pelo método Oil Red O.....	29
3.4.2 Esterificação de ácidos graxos, identificação e quantificação via CG/ MS.....	30
3.4.3 Marcação de AG por fluorescência.....	31
3.5 Análises de quantificação de proteínas por Western blot.....	32
3.6 Análises estatísticas.....	33
<b>CAPÍTULO 1: HEPG2 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miR-1914-5p: mensuração dos níveis do miR-1914-5p em células Hep G2 transfectadas.....	34
4.2. Análises de Oil Red O.....	35
4.3 Análise da regulação da expressão gênica mediada pelo miR-1914-5p: as análises transcricionais e de proteínas.....	36

4.3.1 Análises moleculares de genes correlatos à síntese de lipídeos.....	37
4.3.2 Análises moleculares de genes correlatos ao armazenamento de lipídeos.....	39
4.3.3 Análises moleculares de genes correlatos à $\beta$ -oxidação.....	41
4.4 Análise dos AG: quantidade, alongamento e dessaturação.....	43
4.4.1 Análise de AG por CG-MS.....	43
4.4.2 Análise molecular da ativação, dessaturação e alongamento dos AG.....	45
4.5 Análises da oxidação de AG.....	48
<b>CAPÍTULO 1: SK-HEP-1 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miR-1914-5p: mensuração dos níveis do miR-1914-5p em células SK-HEP-1 transfectadas.....	50
5.2. Análises de Oil Red O.....	51
5.3 Análise da regulação da expressão gênica mediada pelo miR-1914-5p: as análises transcricionais e de proteínas.....	52
5.3.1 Análises moleculares de genes correlatos à síntese de lipídeos.....	52
5.3.2 Análises moleculares de genes correlatos ao armazenamento de lipídeos.....	54
5.3.3 Análises moleculares de genes correlatos à $\beta$ -oxidação.....	56
5.3.4 Análises moleculares de genes correlatos ao metabolismo energético.....	57
5.4 Análise dos AG: quantidade, alongamento e dessaturação.....	59
5.4.1 Análise de AG por CG-MS.....	59
5.4.2 Análise molecular da dessaturação e alongamento dos AG.....	61
5.5 Análises da oxidação de AG.....	63
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Hepatocarcinoma: um painel geral

O fígado, a maior glândula interna e o segundo maior órgão do corpo humano, desempenha papel endócrino e exócrino, sendo responsável por funções importantes no organismo, como: regulação do metabolismo de lipídeos, armazenamento de vitaminas A, B12, D e E, armazenamento e liberação de glicose, processamento de drogas e hormônios, desintoxicação do organismo, entre muitas outras (LEE et al, 2016; HALL, 2017). Histologicamente, as células hepáticas são divididas em dois grandes grupos: células parenquimatosas (hepatócitos) e células não parenquimatosas (células endoteliais sinusoidais, células fagocitárias de Kupffer, células estreladas hepáticas) (BATALLER, 2005; VODOVOTZ, Y. et al., 2017). Os hepatócitos correspondem à 70% - 80% da composição do fígado de um mamífero adulto e se caracterizam como células parenquimatosas, altamente diferenciadas e que, raramente, se dividem. O estresse causado por diferentes agentes, entre os quais a exposição a vírus e à agentes químicos hepatotóxicos como a aflatoxina  $\beta$ 1, causam alterações metabólicas e/ ou mutações nas células hepáticas, que desencadeiam inflamações crônicas no fígado. A persistência da sinalização deletéria agrava a intensidade das doenças hepáticas, o que pode levar à hepatocarcinogênese (DE JESUS, 2000; DE MARTEL, C. et al., 2015). É interessante notar que a indução à hepatocarcinogênese não ocorre no fígado sadio, portanto, a ingestão abusiva de álcool, a obesidade, a esteatose hepática e a cirrose são agravantes ao quadro (CARRILLO et al., 2015).

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. Essa enfermidade é caracterizada pelo rápido crescimento de células anormais e que ocorre além de seus nichos habituais, podendo também invadir partes adjacentes e se espalhar para outros órgãos do corpo, processo referido como metástase (FUTREAL et al., 2004; SANTARIUS et al., 2010). Globalmente, o câncer é a segunda principal causa de morte, sendo responsável em 2018 por 9,6 milhões de óbitos (Organização Mundial de Saúde, 2018). O câncer de fígado, por sua vez, é uma das causas mais comuns de morte por câncer, representando 8,2% do total das mortes por essa patologia em 2018 (Globocan, 2018).

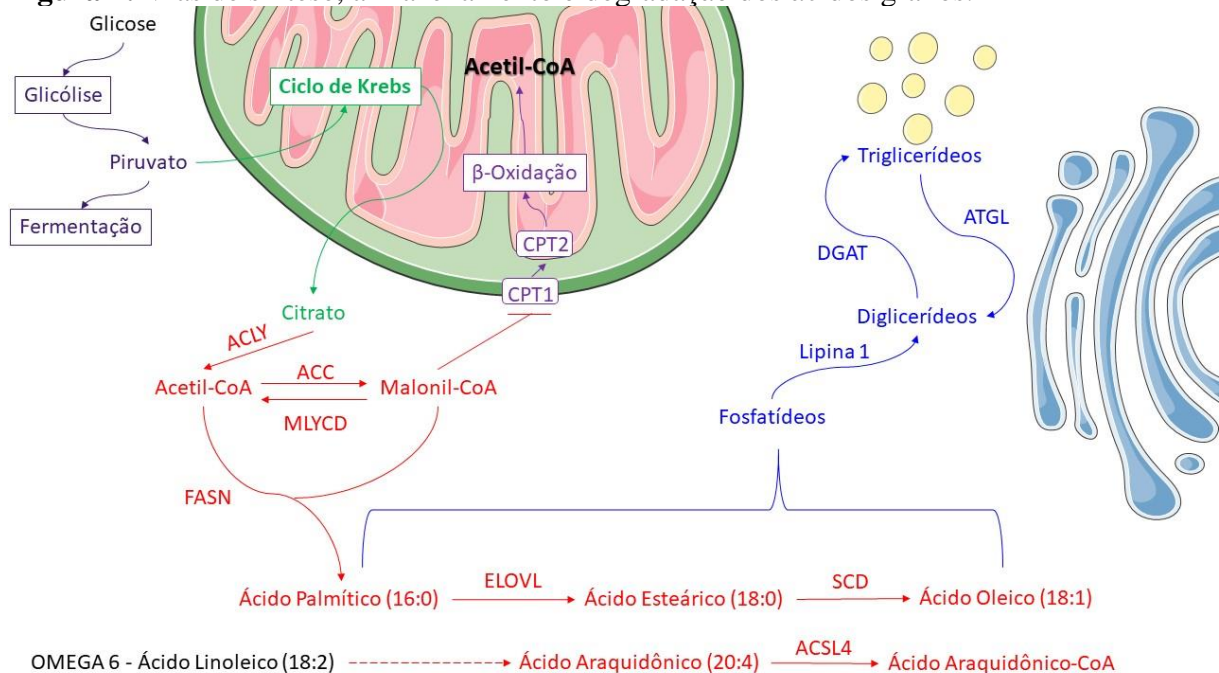
O carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma (HCC) é o tipo de câncer de fígado primário mais frequente, entre 85%-90% dos casos, (EL-SERAG, 2007). É caracterizado por alta e heterogênea distribuição geográfica (EL-SERAG, 2012; FERLAY, J. et al., 2015;

TATENO et al., 2015). Em 2014, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO, World Health Organization), mais de 185 milhões de pessoas pelo mundo foram contaminadas com o vírus da hepatite C e um terço delas têm expectativa de desenvolver cirrose ou HCC. Infelizmente, para esse câncer, as opções para tratamento ainda são limitadas e a porcentagem de sobrevivência é pequena (WALLACE, 2014). Dessa forma, o HCC geralmente é fatal, tendo o seu prognóstico de mortalidade em 95% dos casos (FERLAY, et al, 2015). Por isso, há a importância da elucidação dos principais mecanismos moleculares do HCC, viabilizando assim um diagnóstico mais rápido além do desenvolvimento de possíveis tratamentos para essa patologia.

## **1.2 Metabolismo de lipídeos como alvo de terapias contra cânceres**

Os lipídeos se caracterizam como um grupo heterogêneo de biomoléculas, insolúveis na água e solúveis em solventes orgânicos. Eles são a base dos fosfolipídeos e esfingolipídeos, que são componentes de todas as células biológicas (JORDE et al., 2003; FAHY, E. et al., 2018). O metabolismo de lipídeos ocorre no organismo para a geração de ácidos graxos (AG), que possuem como funções: participação da síntese de membranas, mensageiros secundários na sinalização celular, além de serem estoque de energia para célula, em gotículas de lipídeos que podem, posteriormente, serem degradados em reações energéticas de oxidação (MASHEK, 2013; NELSON, 2014). Os lipídeos no organismos são obtidos através da alimentação e da síntese *de novo* de AG que ocorre principalmente no fígado. A Figura 1 esquematiza as vias de síntese, armazenamento e oxidação de AG.

**Figura 1:** Vias de síntese, armazenamento e degradação dos ácidos graxos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

O substrato inicial do metabolismo desses lipídeos é o acetil-CoA e o produto final, geralmente, o ácido palmítico. Enquanto células normais tem preferência pelas fontes externas, células tumorais sintetizam AG pela síntese *de novo* (CURIE et al., 2013). Essa síntese é estimulada quando há muito trifosfato de adenosina (ATP) e acetil-CoA nas células, sendo a  $\beta$ -oxidação dos AG desnecessária. Nesse caso, o citrato não segue no ciclo de Krebs, porque o ATP inibe a isocitrato desidrogenase; o citrato é, então, desviado para a síntese de lipídeos. O citrato então sai da mitocôndria e sofre, no citosol, uma reação onde forma oxaloacetato e acetil-CoA. O acetil-coA, por sua vez, sofre uma série de reações, no qual é convertido em AG. Além da atuação da carnitina-aciltransferase I (CPT1), que limita o transporte de ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial para a  $\beta$ -oxidação, outras duas enzimas são essenciais na coordenação do metabolismo dos AG: a acetil-CoA carboxilase  $\alpha$  (ACC1), primeira enzima na síntese dos ácidos graxos, que produz malonil-CoA e a malonil-CoA descarboxilase (MLYCD), que controla os níveis de malonil-CoA, molécula que pode estar disponíveis para a síntese de AG e para bloquear a CPT1 (BOUZAKRI, K. et al., 2008; CURRIE et al., 2013; NELSON, 2014; KASTANIOTIS et al., 2017).

O primeiro passo da síntese *de novo* é a formação do malonil-CoA pelo acetil-CoA, que será catalisada pelas enzimas ACC1 e acetil-CoA carboxilase  $\beta$  (ACC2). É interessante apontar que a ativação de ACC1 é estimulada pela insulina e a malonil-CoA resultante de sua reação servirá de substrato para a síntese de AG. Já a ACC2 tem papel no controle da



degradação de AG, já que altas concentrações de malonil-CoA sintetizadas por essa enzima inibem a CPT1, impedindo assim a entrada de AG na matriz mitocondrial. Quando o nível de glicose reduz, a liberação de glucagon ativa a proteína-cinase dependente de cAMP (PKA) que fosforila e inativa a ACC1. A MLYCD é, então, ativada e cataliza uma reação reversa à ACC, produzindo novamente acetil-CoA pela malonil-CoA. Com a baixa concentração de malonil-CoA, a inibição da entrada de AG na mitocôndria é aliviada, tornando então, os AG, o principal combustível da célula (BOUZAKRI, K. et al., 2008; CURRIE et al., 2013; NELSON, 2014).

Na sequência da síntese de lipídeos, o complexo proteico ácido graxo sintetase (FASN) utiliza o acetil-CoA e o malonil-CoA como substratos em reações químicas subsequentes para produzir um AG ainda não finalizado. Esse produto é utilizado pelas enzimas acil-CoA sintetases, que adicionam um grupo acil-CoA às suas moléculas, para que as mesmas sejam utilizadas nos ciclos bioativos dos lipídeos (MASHEK, 2013). Após essa ativação, o lipídeo pode ser esterificado, geralmente ácido palmítico, e realizar suas diferentes funções (NELSON, 2014).

Uma das formas mais simples dos lipídeos, construídos a partir de AG, são os triglicerídeos. Eles podem ser armazenados em grandes quantidades pelas células e são utilizados pelo corpo para, principalmente, fornecer energia para vários processos metabólicos. Alguns lipídeos como colesterol, fosfolipídeos e derivados são utilizados pelo corpo para realizar outras funções intracelulares (NELSON, 2014). Entretanto, o acúmulo excessivo de triglicerídeos e AG no fígado são características de alterações metabólicas, que acarretam em doenças hepáticas, como as esteatoses hepáticas (SZABO, 2013). O acúmulo de gordura no fígado indica uma série de condições patofisiológicas (WU, 2016) podendo iniciar com uma simples esteatose (acúmulo de gordura > 5% nos hepatócitos) e se desenvolver em necroinflamação e fibrose e, em alguns casos, em cirrose e HCC (KATSIKI, 2016).

Nos últimos anos, a síntese *de novo* de lipídeos tem sido o foco no estudo de metabolismo do câncer. Algumas pesquisas demonstraram que a inibição dessa síntese pode bloquear o crescimento de células cancerígenas. Laboratórios independentes descobriram que a glicoproteína transmembrana, CD147 (Basigin), é muito expressa em células de HCC e esta fortemente associada com a progressão do tumor. De acordo com Ju (2016) a CD147 regula o metabolismo de lipídeos nas células cancerígenas e contribui para a reprogramação da oxidação de AG em células de HCC, o que diminui a inflamação existente no fígado. Outro estudo envolvendo uma linhagem celular de carcinoma oral humano, que superexpressa o

receptor de AG CD36 e genes do metabolismo de lipídeos, demonstrou que ácido palmítico e uma dieta rica em gordura aumenta o potencial metastático dessas células. Este estudo também demonstrou que, quando são administrados anticorpos para CD36 em ratos modelos, para análises de câncer oral humano, há a neutralização desse receptor, que inibe por completo o potencial metastático do tumor. Isso revela que o metabolismo de lipídeos, principalmente a obtenção de lipídeos exógenos, está envolvido no mecanismo de indução do potencial metastático das células (PASCUAL et al., 2017). Em células de câncer de pulmão, foi demonstrado que a expressão reduzida (*knockdown*) de FASN moderou a expressão de E-caderina, uma proteína transmembrana importante no processo de adesão célula-célula, aumentando assim a migração das células e promovendo metástase (JIANG et al., 2015). Dessa forma, a lipogênese é necessária para manter nas células cancerígenas o alto fornecimento constante de lipídeos para síntese de membrana, moléculas sinalizadoras, lipoproteínas, entre outros que oferecem suporte ao crescimento das células tumorais.

Além disso, muitas evidências indicam que a anormalidade no metabolismo de lipídeos está relacionada com o HCC. É interessante apontar que alterações no metabolismo de AG podem limitar a proliferação de células cancerígenas pelo bloqueio da síntese de AG, aumento da taxa de degradação de AG, aumento do armazenamento de AG em triglicerídeos neutros ou diminuição da disponibilidade de AG para armazenamento (CURRIE et al., 2013). Vários estudos realizados com paciente obesos, diabéticos e com esteatose hepática sugerem que o aumento da concentração de lipídeos no fígado e a resistência à insulina promovem a ativação de uma resposta inflamatória. A ativação dessa via em hepatócitos contribui para o desenvolvimento do HCC (PARK et al., 2010; CALVISI et al., 2011; LEE et al., 2016). Yizhak et al (2014) demonstraram, pelos seus estudos realizados com culturas celulares, uma forte correlação entre o crescimento tumoral e o metabolismo lipídico. Nesta pesquisa foram utilizados dados de expressão de genes para criar modelos de fenótipos metabólicos de 60 diferentes tipos de células cancerígenas. Os autores utilizaram esse modelo para demonstrar o quanto rápido essas células cancerígenas podem se dividir, além da resposta das células ao tratamento com medicamentos. Os experimentos demonstraram que a enzima MLYCD induz um efeito seletivo de crescimento celular, quando testado tanto em leucemias quanto em linhas celulares de câncer renal. Dessa maneira é justificável a realização de estudos que correlacionem o metabolismo lipídico e processos de migração celular em HCC.

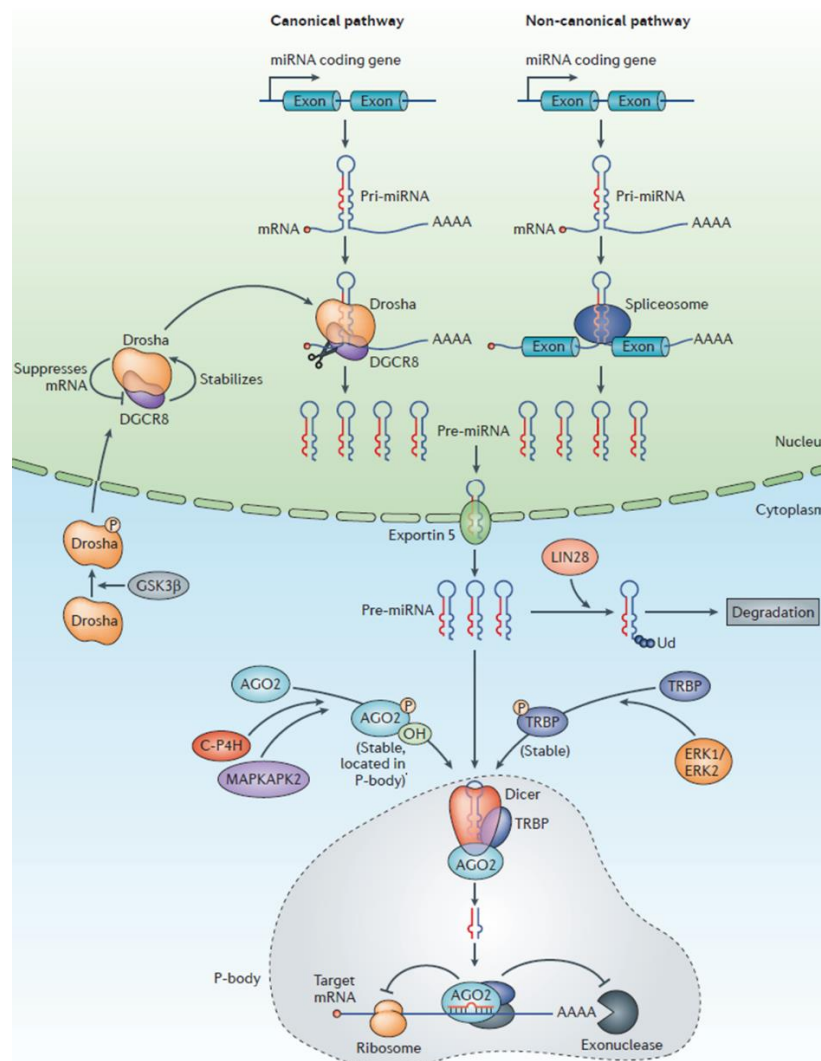
### **1.3 Terapêutica baseada em miRNA para o Hepatocarcinoma**

#### **1.3.1 miRNAs como Moduladores do Equilíbrio Celular: Biossíntese e Função**

MicroRNAs (miRNAs) são provavelmente a classe de pequenos RNAs não codificadores mais extensamente estudada. São caracterizados por possuírem comprimento de 18 a 24 nucleotídeos e por regularem a expressão gênica através da ligação sítio específica com a porção 3'UTR de RNAs mensageiros (mRNA), induzindo a degradação ou o bloqueio da tradução de seu alvo dependendo do nível de complementaridade dessa ligação (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993; KROL, 2010). Um único miRNA pode regular mais que apenas um mRNA e um mRNA pode ser regulado por mais que um miRNA.

Esses miRNA podem ser transcritos pela RNA polimerase II ou III por duas vias, a canônica e a não-canônica (Li, 2014) (Figura 2). Os miRNA canônicos são transcritos em um RNA longo, com um cap-5' e poliadenilado de estrutura hairpin denominado miRNA primário (pri-miRNA) que é digerido pelo complexo RNase III Drosha e Di George syndrome critical region 8 (DGCR8) em uma sequência hairpin de miRNA precursora (pre-miRNA). Os miRNAs da via não-canônica (mirtrons) representam 50% dos miRNAs de mamíferos e diferem da biogênese anterior por não serem digeridos pela Drosha-DGCR8. Eles estão localizados em íntrons curtos e o pre-miRNA é gerado pela maquinaria de splicing. O pre-miRNA de ambas as vias é exportado para fora do núcleo pelo complexo Exportin-5-Ran-GTP. No citoplasma é clivado em uma sequência de miRNA dupla fita pela enzima DICER, que é parceira de TRBP e da proteína Argonauta 2 (AGO2). A dupla-fita é cortada por helicases e o miRNA maduro acompanhado de AGO é acoplado no complexo ribonucleoproteico funcional RNA indutor de silenciamento (RISC) que media a ativação do miRNA (KIM, 2009). A biogênese dos miRNAs é extremamente controlada, e perturbações nessas vias podem alterar os níveis de miRNA, que são mecanismos encontrados em diversas doenças humanas, inclusive o câncer.

**Figura 2:** Vias canônicas e não-canônicas da biogênese de miRNAs.



Fonte: Li, 2014.

O miRNA uma vez maduro, juntamente com a RISC, é uma molécula ativa capaz de se ligar a moléculas alvo de mRNAs pela sua região central (*seed*) que possui de 2 a 9 nucleotídeos, podendo atuar diretamente no controle da expressão gênica pela ativação dos mecanismos de RNA de interferência (RNAi). Por outro lado, outros estudos vêm demonstrando que essas moléculas também possuem outros mecanismos de ação, como explicados a seguir. Os miRNAs também podem se ligar em outras regiões de seus alvos, como a região codificadora 5'UTR de mRNAs, como é o caso do miR-122 que auxilia a replicação do vírus da hepatite C (HCV) no fígado (JOPLING et al., 2005; THAKRAL, 2015). Além disso, podem regular positivamente a expressão gênica através da AGO2 e pela interação com o mRNA da proteína codificadora de ribossomos aumentando assim a biogênese ribossomal (Ling, 2013; Li, 2014). Mais recentemente, estudos vem apontando que os miRNAs também podem ser empacotados em exossomos e entrar na corrente sanguínea se

tornando um miRNA circulante que pode atuar como um hormônio, indicando um mecanismo de comunicação celular (VAN ROOIJ et al., 2007; OLIVIERI et al., 2017; SEBASTIANI et al., 2017).

### 1.3.2 Terapêutica do miRNA no hepatocarcinoma

Os mecanismos de ação dos miRNAs, principalmente o de RNAi permitiu uma nova abordagem para a terapêutica de RNAs, o silenciamento gênico. Esse fenômeno de silenciamento gênico, a partir de RNA de fita dupla, teve seu mecanismo revelado em 1998 (FIRE et al., 1998) e, atualmente, vem sendo investigado por diferentes laboratórios, uma vez que a indústria farmacêutica vislumbra tal processo no embasamento do desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, estudos que procuram pelo padrão geral de expressão de miRNAs em diversos tecidos, saudáveis ou doentes, ofereceu e oferecem valiosas informações para a identificação de novos alvos de drogas. No fígado por exemplo, o miR-122 caracteriza-se como um biomarcador de doenças hepáticas e se caracteriza como um supressor de tumor. Baixos níveis do miR-122 circulante no plasma e no fígado é característico de pacientes com HCC (LING, 2013).

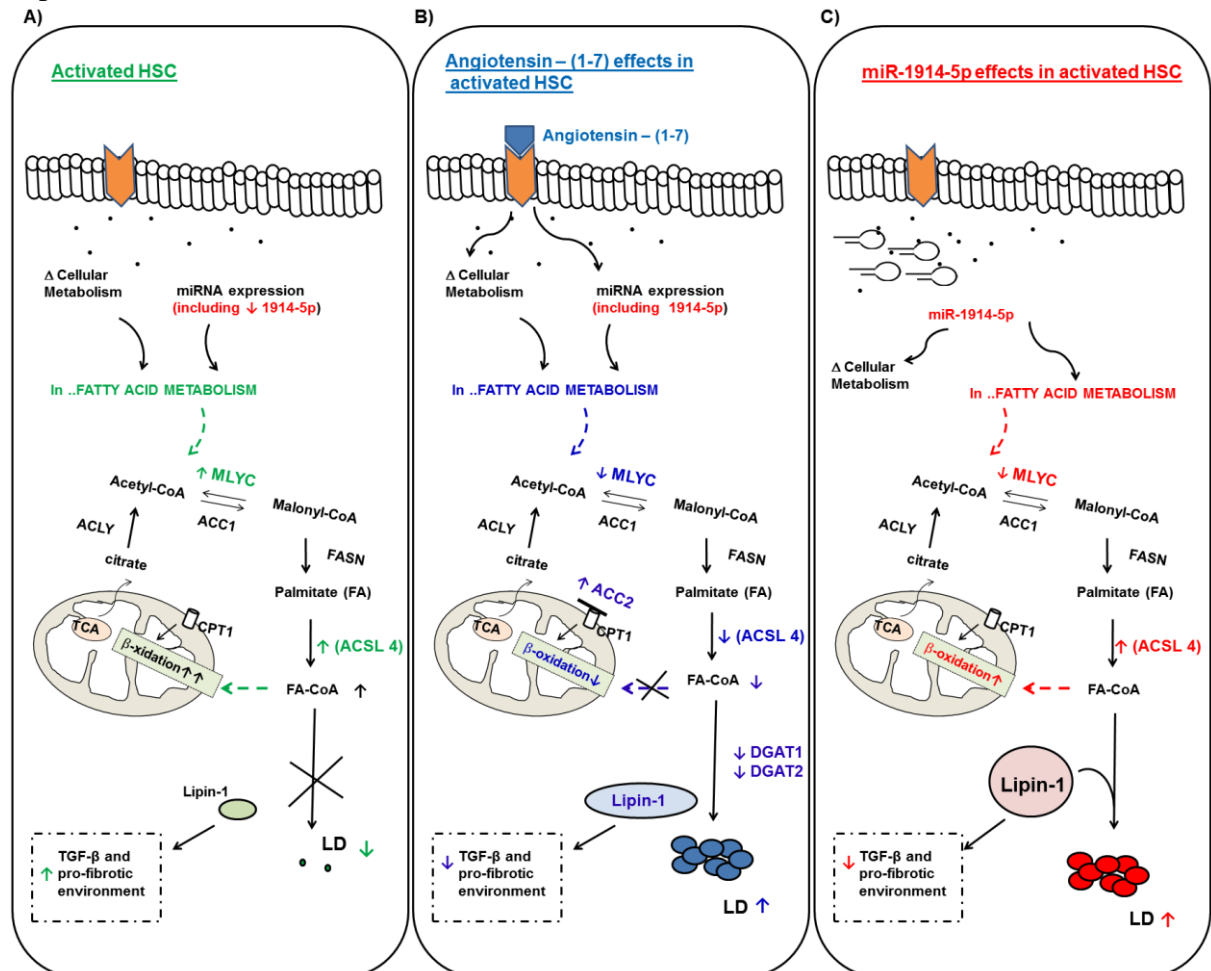
Dentre os avanços em terapias com miRNA em HCC temos tecnologias como os oligonucleotídeos antisense (ASOs), que são ácidos nucleicos modificados e estáveis que agem de maneira a formar um complexo RNA-ASO que permite a ação de RNAses no RNA alvo (Dias, 2002; CROOKE et al., 2018). Existem ASOs modificados que possuem como alvo a região *seed* 5' de miRNAs, denominados anti-miRS, como o Miravisen. Este foi a primeira droga a atuar na inibição de um miRNA a entrar em testes clínicos patrocinada pela Santaris Pharma (Roche Innovation Centre). Miravirsen atua inibindo o miR-122 e potencialmente impede a infecção por HCV (GEBERT et al., 2013; JANSSEN et al., 2013; THAKRAL, 2015). Em 2017, essa droga entrou na fase II de ensaios pré-clínicos para ter sua segurança, tolerabilidade e efeitos antivirais analisados. Até o momento não foi demonstrado nenhum efeito negativo clinicamente significativo para cessar os testes (TITZE-DE-ALMEIDA, 2017).

Atualmente a maioria das terapias em desenvolvimento ainda trazem a abordagem clássica da função dos miRNAs, como reguladores da expressão gênica, porém as novas funções designadas aos miRNAs, como descrito anteriormente, irão permitir novas abordagens para essas moléculas.

### **1.3.3 O miRNA 1914-5p e o metabolismo de lipídeos no fígado: uma investigação pertinente**

O miR-1914-5p é uma pequena molécula não codificante, cuja sequência codificante se localiza no cromossomo 20 na região codificadora do gene uridina-citidina quinase-like 1 (UCKL1 20q13.33), que catalisa a fosforilação da uridina para monofostato de uridina. Entretanto, esse miRNA começou a ter sua atuação funcional investigada apenas recentemente. Em 2015, ele foi identificado pela primeira vez em câncer de estômago (LI et al., 2015). Em outro estudo do mesmo ano, foram investigados miRNAs na quimioterapia de câncer colorretal, onde os o miR-1914 e miR-1915-3p se mostraram os responsáveis por conferir quimioresistência à pacientes (HU et al., 2015). Em 2017, ele foi identificado em um perfil de miRNAs em linfoma de células T periféricas (LIN et al., 2017). E, finalmente em 2018 esse miRNA foi identificado em nossos estudos. Em DA SILVA et al., 2018 foi analisado o perfil de expressão de miRNAs em culturas de células estreladas hepáticas e o miR1914-5p se despontou nas análises. As células estreladas hepáticas são caracterizadas como o principal elemento do fígado responsável pela produção de elementos de matriz e colágeno, que conduzem o fígado à fibrose sob condições de estresse. Nos ensaios de DA SILVA et al., 2018 as células forma cultivadas sob condições que favoreceram a manutenção da quiescência, ou, sua ativação, sendo ou não tratada com angiotensina-(1-7) [ang-(1-7)], um heptapeptídeo conhecido por reduzir a fibrose hepática e a esteatose. Nessas análises foi identificado o miR-1914-5p como uma molécula de importante papel no controle do metabolismo de lipídeos e do ambiente pró-fibrotico (Figura 3). As análises demonstraram que nas células estreladas hepáticas ativadas, ou seja, em estado fibrosante, esse miRNA teve sua expressão reduzida, enquanto o tratamento com ang-(1-7) fez com que os níveis desse miRNA retornassem ao padrão de expressão das células quiescentes. Para analisar mais a fundo como o aumento da expressão do miR-1914-5p em células estreladas hepáticas ativadas tratadas controla a fibrose foi realizado ensaios de transfecção celular com o mímico do miR-1914-5p. Nessas análises foi observado que o aumento desse miRNA ocasionou efeitos semelhantes ao do hepatapeptídeo, além de revelarem um controle do ambiente pró-fibrótico através da modulação do metabolismo de AG. O estudo então, possibilitou a elucidação da mecanística do miR-1914-5p que atua na regulação da expressão de MLYCD e correlaciona-se com o controle da atividade funcional de Lipina-1. Os resultados foram, portanto, promissores o que justifica o estudo desse miRNA em modelo celular de HCC, considerando-se a relevância do papel do metabolismo lipídico para a sobrevivência tumoral.

**Figura 3:** Esquema representativo dos efeitos de ang-(1-7) e do miR-1914-5p em células estreladas hepáticas ativadas no metabolismo de lipídeos e sua correlação com o controle do ambiente pró-fibrótico. A) Células estreladas hepáticas ativadas. B) Efeito da ang-(1-7) em células estreladas hepáticas ativadas. C) Efeito do miR-1914-5p em células estreladas hepáticas ativadas.



Fonte: Da Silva, 2018.

Dentro desse contexto, surge o presente estudo. Utilizando-se de culturas de células de HCC, análises celulares e moleculares sobre o metabolismo de lipídeos foram realizadas, após a transfecção com mímicos ou inibidores de miR-1914-5p. Essas estratégias metodológicas vêm sendo utilizadas de maneira recorrente em diversos estudos (MCMANUS et al., 2002; MATSUI, 2016), que viabilizam o estudo pontual e funcional de tais moléculas e a caracterização dos mesmos como biomarcadores moleculares e até mesmo como alvos terapêuticos dentro do controle da regulação da expressão gênica.

Atualmente, são necessárias inovações biotecnológicas para a elucidação de particularidades mecânicas do equilíbrio celular e a cura ou controle de inúmeras patologias que necessitam de maiores detalhamentos moleculares. Assim sendo, esse trabalho

avaliou os efeitos moleculares e celulares do miR-1914-5p em culturas celulares hepáticas tumorais, no que tange o seu papel no metabolismo de lipídeos, visando uma caracterização de elementos centrais do controle da progressão tumoral pela caracterização de um alvo molecular a ser utilizado como biomarcador ou como molécula terapêutica, ou co-adjuvante em futuros tratamentos para o câncer de fígado.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Analisar os efeitos moduladores de altas concentrações e da inibição do miR-1914-5p no processo hepático tumoral através de análises de elementos do metabolismo de lipídeos utilizando células Hep G2 e SK-HEP-1 como modelo.

### 2.2 Objetivos específicos

(I) Padronizar as condições de cultivo das células hepáticas tumorais Hep G2 e SK-HEP-1 e da transfecção do miR-1914-5p mímico e inibidor na cultura de células;

(II) Avaliar alterações no metabolismo de lipídeos pela coloração de *Oil Red O* em ensaios de microscopia de luz e em ensaios de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC/MS);

(III) Analisar a modulação da expressão de genes principais, correlatos a via do metabolismo de lipídeos; da síntese, armazenamento e  $\beta$ -oxidação de AG;

(IV) Analisar os efeitos em proteínas correlatas ao metabolismo de lipídeos moduladas pelo miRNA-1914-5p mímico e inibidor em ensaios de mensuração de proteínas de *Western blot*;

(V) Analisar o efeito da modulação do metabolismo de lipídeos pelo miRNA 1914-5p mímico e inibidor na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Técnicas usuais em biologia molecular foram utilizadas de acordo com as metodologias descritas ou adaptadas de Sambrook e Green (2012). Normas básicas em biossegurança também foram atendidas.

#### 3.1 Cultura celular e transfecção transiente de mímicos e inibidores do miR-1914-5p

Para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares em hepatocarcinoma, culturas das linhagens das células Hep G2 (ATCC<sup>®</sup> HB8065<sup>™</sup>) oriundas de HCC humano e SK-HEP-1 (ATCC<sup>®</sup> HTB-52<sup>™</sup>) oriundas de adenocarcinoma de fígado humano foram utilizadas. Essas células foram cultivadas em meio *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SBF) (Cultilab) e 0,1% de antibiótico Gibco<sup>™</sup> *Antibiotic-Antimycotic* (Thermo Fisher Scientific). As culturas foram incubadas em estufa, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e mantidas à temperatura de 37 °C.

Para se avaliar o efeito modulador do miR-1914-5p nas células Hep G2 e SK-HEP-1, as células cultivadas foram transfectadas com mímico ou inibidor do miRNA 1914-5p (mirVana<sup>™</sup> miRNA *Mimics* e miRNA *Inhibitors*, respectivamente, Thermo Fisher Scientific), na concentração final de 40 nM para Hep G2 e 30 nM para SK-HEP-1, tanto para mimetizar, quanto para inibir o miRNA em estudo.

Para realizar as transfecções do tipo *foward*, que consiste na transfecção das células já aderidas, cada célula foi cultivada por 24 horas na presença de 10% de SBF em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> ou 25 cm<sup>2</sup>, placas de 6 poços ou de 24 poços, de acordo com o ensaio a ser realizado após a transfecção. Inicialmente o miRNA mímico foi diluído em Opti-MEM<sup>®</sup> *Medium* (Thermo Fisher Scientific), um meio de cultura com baixa concentração de soro, nas concentrações finais específicas para cada célula, seguido de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, em outro tubo o agente de transfecção, Lipofectamine<sup>™</sup> RNAiMAX *Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific), também foi diluído em Opti-MEM<sup>®</sup> *Medium*, na concentração final de 1:500 e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a mistura do mímico com agente de transfecção, e essa mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a formação do complexo de transfecção. Com o complexo formado este foi adicionado as células já contendo meio MEM com 10% de SBF respeitando a concentração final do miRNA mímico e do agente transfectante. As células foram colocadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24

horas, o meio de cultura foi substituído por meio fresco (MEM contendo 10% de SBF) e as células foram novamente incubadas à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após novo intervalo de 24 horas, as células foram coletadas e os ensaios foram realizados. O mesmo procedimento metodológico foi realizado para os ensaios que utilizaram o inibidor do miRNA- 1914-5p. Para todos os ensaios as células não transfectadas foram utilizadas como controle e os dados obtidos com as células transfectadas apenas com o agente transfecção foram utilizados para a normalização dos resultados.

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

#### **3.2.1 Extração de RNA total**

Células das linhagens Hep G2 e SK-HEP-1 não transfectadas e transfectadas somente com o agente de transfecção, com o agente de transfecção mais o mímico do miRNA e com o agente de transfecção mais o inibidor do miRNA foram cultivadas conforme as especificações do item 3.1. Para as análises de expressão gênica, as células foram coletadas por procedimento envolvendo tripsinização celular, processo que consiste na dissociação das células de maneira enzimática. O RNA total das amostras foi extraído com TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fornecedor. Para isso, as células foram ressuspensas em TRIZOL<sup>®</sup> e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Para cada 1 mL de TRIZOL<sup>®</sup>, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Merck), seguido de agitação vigorosa do microtubo até a junção das fases e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g 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. No sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico (100%) para cada 1 mL de TRIZOL<sup>®</sup>, seguido de incubação em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g 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<sup>®</sup> utilizado no início do procedimento. Os microtubos foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o RNA precipitado foram colocados em um fluxo laminar até estarem secos. Posteriormente o RNA foi ressuspensado 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 (260 nm - absorbância de DNA / 280 nm – absorbância de proteína) e

A260/A230 (230 nm – absorvância de contaminantes, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) para se avaliar a qualidade do RNA extraído.

### 3.2.2 Extração de miRNA

Para a análise da expressão de miRNAs dos diferentes grupos de Hep G2 e SK-HEP-1, os mesmos foram extraídos por meio do miRNeasy Mini Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, o coletado de células foram ressuspensos em 700 µL de QIAzol *Lysis Reagent* e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 140 µL de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 3 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 g, 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 100%. As amostras foram então transferidas para as minis colunas (RNeasy® *Mini Column* - Qiagen®) e, logo, foram centrifugadas a 8.000 g, por 15 segundos a 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 g, 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 g 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 g 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 g 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 minuto a 8.000 g para a obtenção do filtrado final contendo o miRNA total de cada amostra. O miRNA total extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare) a 260 nm, utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 para avaliar-se a qualidade do miRNA extraído.

### 3.2.3 Transcrição reversa: RNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído de todos os grupos de células, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific). As reações de transcrição reversa foram realizadas com 200 ng do RNA

extraído, 10  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos (10 X RT Random Primers), 8 mM de dNTPs [25 X dNTP Mix (100 mM)] e 1,25 U de transcriptase reversa (MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*). 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.

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

O cDNA foi transcrito a partir das extrações dos miRNAs, utilizando-se o miScript II RT Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Nestas reações, foram utilizadas 500 ng de 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) e água livre de RNAses em quantidade suficiente para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Com o auxílio do termociclador Mastercycler pro S® (Eppendorf), a reação 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.

## **3.3 Análise de expressão gênica por qPCR**

### **3.3.1 Reações de qRT-PCR: mRNAs**

Reações de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real) foram realizadas utilizando o reagente SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems® - ThermoFisher Scientific), em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com o adesivo óptico (Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific™) ao final do procedimento. Cada reação foi processada em um volume final de 5  $\mu\text{L}$ , em cada qual contendo 0,75  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (1:10) e 2,5  $\mu\text{L}$  de SYBR® *Green PCR Master Mix*. Os ensaios foram realizados em triplicata técnicas para todos os genes avaliados, com o controle endógeno ( $\beta$ -actina) presente em todas as placas. As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ( $\Delta\text{Ct}$ ), 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. Os resultados foram lançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo normalizado ( $\Delta\Delta C_T$ ). As reações de qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real da transcrição reversa) foram conduzidas conforme programação contida no aparelho AB *Applied Biosystems Step one Plus Real time PCR System*. Genes específicos e correlatos ao metabolismo de lipídeos foram desenhados com auxílio do programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e verificados em BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sequências do oligonucleotídeos utilizados se encontram na Tabela 1.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR.

Gene	Primer Sense (5' - 3')	Primer Antisense (5' - 3')	Tamanho amplicon (pb)
$\beta$ -actina	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	87
ACACA	TGTAAGAGCTCATTGAGGA	GAATCGAGAGTGCTGGTTCAG	82
ACACB	GCAGCTGATGACCAACTTCA	TCCGGGTAGACTCACGAGAT	92
ACSL4	ATGGATGATTGCAGCACAGA	CTGCTTCTTTGCCAAGTGTG	80
ACSL5	GAGCCCACTCCTGATGATGT	GGCTCCACAGCTGTACACAA	93
ATGL	GGTGGCATTTCAGACAACCT	GATGTTGGTGGAGCTGTCCT	92
CPT1	GCTCATGGTGAACAGCAACT	TAAAGCAGGATGGCATGGAT	105
CPT2	CCAGCCAGCTACCACTGACT	TTAGCAGCTGTGATGCCAGT	90
CS	CCATCCACAGTGACCATGAG	GCTGCAAAGGACAGGTAAGG	94
DGAT1	GCCTTCTTCCACGAGTACCT	AGTGGGATCTGAGCCATCA	86
DGAT2	TGAGTCTCTGAGCTCCATGC	AACCAGGTGAGCTCCATGAC	97
FASN	TCCTGCTGACCAAGAAGTCC	CTTGCTCCTTGAAGCCATCT	87
LIPINA 1	CCATCAGCCAGTCTTTCACA	CAGGGTTGAGACTCAAG	81
MLYCD	GACATCTCCAGCAACATCCA	CTGGGTCAAGCTGATGGAAT	108
PPAR- $\alpha$	GGCCTCAGGCTATCATTACG	ACCAGCTTGAGTCGAATCGT	81
PPAR- $\gamma$	GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC	AACTCAAACCTGGGCTCCATAAAG	74
SCD	GGACGATATCTCTAGCTCCT	TCGTCTCCAACCTTATCTCCT	92
SIRT1	GTTTTTGCCACCAATCGTT	TCTGGCATGTCCCACTATCA	116
SREBP1C	CCCTGTAACGACCACTGTGA	TTCATGGCTGTCAGAAGCAG	99

Uma observação relevante é que alguns desses genes escolhidos para a análise, também possuem na porção 3'-UTR de seus mRNAs putativas regiões de interação com o miR-1914-5p. Para a caracterização e identificação de sequências alvo foram utilizados algoritmos disponíveis gratuitamente tais como MiRDB (<http://mirdb.org/miRDB>) e

TargetScanHuman (<http://www.targetscan.org/>). A Tabela 2 apresenta o miRNA em estudo e seus alvos potenciais.

**Tabela 2:** Genes que possuem um potencial sítio de ligação entre seus mRNAs e o miR-1914-5p.

<b>miR-1914-5p</b>	
ACACA	LIPINA 1
CPT1	MLYCD
CS	PPAR- $\alpha$
DGAT1	PPAR- $\gamma$
FASN	SCD

### 3.3.2 Reações de qPCR: Análise da expressão diferencial e validação de miRNA

As amostras de cDNA provenientes da extração de miRNAs foram submetidas a reações de qPCR utilizando o miScript SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen<sup>®</sup>) para se identificar a expressão diferencial do miRNA-1914-5p nas amostras estudadas. Dessa forma, em placas de 96 poços (MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) seladas com o adesivo óptico (Applied Biosystems<sup>®</sup> Micro Amp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>), cada reação foi processada em um volume final de 5  $\mu$ L. Os ensaios foram realizados em triplicata técnicas, com o controle U6 presente em todas as placas. As reações ocorreram em equipamento AB *Applied Biosystems Step one Plus Real time PCR System* onde as condições de ciclo possuíam uma etapa de ativação inicial de 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (desnaturação: 94 °C – 15 segundos; anelamento: 55 °C – 30 segundos; e extensão: 70 °C – 30 segundos). As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ( $\Delta\Delta C_T$ ), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras.

### 3.4 Análises de metabolismo de lipídeos:

#### 3.4.1 Marcação de gotículas de lipídeos pelo método *Oil Red O*

Para se avaliar o metabolismo lipídico e a formação das gotículas de lipídeos,  $2 \times 10^4$  células Hep G2 ou SK-HEP-1 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínula de vidro nas condições descritas no item 3.1. Respeitando o tempo determinado para todos os

ensaios as células foram fixadas com formol 4% (formaldeído a 37% (Merck) + água destilada) durante 30 minutos. Após lavagem em PBS (tampão fosfato-salino = 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), as células contidas nas lamínulas foram incubadas por 10 minutos em propilenoglicol 100% (Merck). Posteriormente a solução de *Oil Red O* a 0,7% (0,17 mM de *Oil Red O* (Merck) + 15 mL de propilenoglicol) foi acrescentada e mantida por 7 minutos em agitação, seguida, de nova incubação em propilenoglicol 85% V/V por 3 minutos. Após o intervalo, o material contido nas lamínulas foi lavado com água destilada e incubado com hematoxilina de Harris (3 mM de hematoxilina + 20 mM de alúmen de potássio + 2 mM de óxido de mercúrio) por 1 minuto. Após as lavagens finais com água corrente as lâminas foram montadas com auxílio de gelatina glicerinada e analisadas em microscópio de luz BX51 OLYMPUS. As imagens obtidas foram utilizadas para a quantificação das gotículas de lipídeos com o auxílio do software ImageJ (programa de domínio público desenvolvido pelo National Institute of Health, USA). Regiões aleatórias contendo cerca de 100 células foram selecionadas para as análises de cada grupo de células.

### **3.4.2 Esterificação de ácidos graxos, identificação e quantificação via Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massas (GC/MS)**

Para os ensaios de quantificação de AG  $2 \times 10^5$  células Hep G2 ou SK-HEP-1 foram cultivadas em placas de 6 poços conforme descrito no item 3.1. O extrato das células obtido foi lavado com PBS e as células foram submetidas ao processo de esterificação de Fischer (Fischer & Speier, 1895). Esse processo permitiu que os AG fossem obtidos na forma de éster através da hidrólise dos lipídeos por esterificação, dessa forma facilitando o movimento dessas moléculas pelo injetor e pela coluna cromatográfica na cromatografia gasosa (CG). Para isso, no coletado de células foi adicionado metanol como solvente para início das reações de transesterificação. Para a completa remoção dos AG, o catalisador hidróxido de potássio foi adicionado e aquecido a 60 °C para completa saponificação das amostras. Após o resfriamento das amostras, à estas foram acrescentados H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 7 N para esterificação dos AG. As amostras foram então evaporadas e no final do processo eluídas com hexano para análise em CG/MS utilizando um cromatógrafo GC-210 (Shimadzu Scientific Instruments, Japão). No cromatógrafo a amostra foi vaporizada e injetada utilizando CO<sub>2</sub> em altas pressões e posteriormente separada pela coluna cromatográfica do equipamento. Os tempos de retenção das amostras nas colunas serão utilizadas para a detecção dos ácidos graxos específicos,



utilizando-se padrões comparativos. Os padrões utilizados incluíam: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido oléico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido esteárico (C18:0), ácido erúico (C22:1) e ácido araquidônico (C20:4). O sistema acoplado ao espectrômetro de massa (MS) fragmenta de forma mais fina as cadeias de ácidos graxos ocorrendo a caracterização dos componentes lipídicos presentes na mistura orgânica. Nessa caracterização é visado obter informações de AG de cadeia longa como o ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico.

### 3.4.3 Marcação de AG por fluorescência

Para essas análises, células Hep G2 e SK-HEP-1 foram semeadas em lamínulas contidas em microplacas de 24 poços e cultivadas e transfectadas como previamente descrito no item 3.1. Após 24 horas da transfecção foi adicionado ao meio de cultivo das células BODIPY™ 558/568 C12 (4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid) (Thermo Fisher Scientific), um análogo de ácido graxo saturado de cadeia de 12 carbonos, na concentração de 1 µM. Após 16h as células foram lavadas com meio de cultivo e cultivadas com meio de cultivo fresco por 1 hora e por 8 horas afim de realizar a metodologia pulse-chase dos AG C12 nas células. Para determinar a oxidação de AG foi utilizado um conhecido inibidor de CPT1, o Etomoxir (Merck). Esse reagente foi adicionado por 8 horas somente nas células Hep G2 e SK-HEP-1 controles já previamente incubadas por 16 horas com o BODIPY™ 558/568 C12. As células foram então, fixadas por 5 minutos a 37°C em paraformaldeído a 3,8% contendo 0,2% de Triton X-100. As lamínulas com as células fixadas foram utilizadas em ensaios de marcação de gotículas lipídicas e núcleo. Para a marcação das gotículas de lipídeos e núcleo as lamínulas foram lavadas sucessivamente com PBS 0,5 X, a distribuição das gotículas lipídicas foram investigadas pela coloração com BODIPY™ 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (Thermo Fisher Scientific), um fluoróforo covalente com cabeça hidrofóbica e cadeia de 18 carbonos que é incorporado aos lipídeos armazenados em gotículas no citoplasma, e a morfologia do núcleo foi realizada pela contra coloração do com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato). Para isso, o tampão fosfato foi retirado e as lamínulas contendo as células foram incubadas por um intervalo de 20 minutos em agitação em 200 µl de BODIPY™ 493/503 na concentração de 0,5 µg/mL. Após sucessivas lavagens com PBS 0,5 X, o núcleo foi corado com DAPI na concentração de 3,33 ng/ mL diluídas em água estéril por 3 minutos a temperatura ambiente. Novamente, sucessivas lavagens com tampão PBS

0,5X foram realizadas e as lamínulas foram finalmente montadas em lâminas apropriadas com N-propilgalato. Em seguida, as lamínulas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência modelo BX51 OLYMPUS acoplado a um sistema fotográfico. As fotografias foram analisadas utilizando o programa Image J (NIH), e a localização e sobreposição da marcação do BODIPY™ 558/568 C12 e do BODIPY™ 493/503 foram analisadas pelo Image J “JACoP” plugin, determinando o coeficiente de sobreposição e a intensidade da marcação.

### **3.5 Análises de quantificação de proteínas por Western blot**

Os extratos celulares totais de Hep G2 e SK-HEP-1 de todos os grupos celulares investigados nesse trabalho nas condições previamente descritas foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> seguindo as condições de cultivo descritas no item 3.1. Lisados celulares foram preparados pela ressuspensão dos precipitados celulares recolhidos das culturas com solução de lise [detergente 0,5% (Triton X-100 para Hep G2 e IGEPAL NP-40 para SK-HEP-1), Tris HCl pH 7,2 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, DTT 0,5%, PMSF 1 mM, acrescentado 1 mM de inibidor de protease (Thermo Fisher Scientific)], e incubação a 4°C por 30 minutos. Os lisados foram sonicados em 40% de amplitude por 40 segundos para Hep G2 e por 120 segundos intervalados para SK-HEP-1. A sonicação permite as moléculas se quebrem, as células se rompem e as proteínas sejam liberadas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 25 minutos para Hep G2 e por 10 minutos para SK-HEP-1 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, foi utilizada a concentração padrão de albumina sérica bovina (BSA) a 1 ng/μL em diversas diluições criando uma curva padrão de 5 pontos sem passar pelo zero. Para as análises foram utilizadas 100 μg de proteína de cada amostra juntamente com 4% (w/v) SDS e 5% de β-mercaptoetanol. As proteínas foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos, e em seguida submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% para análises de β-actina, MLYCD e ACSL4 e em géis de poliacrilamida a 6% para análises de FASN. A eletroforese ocorreu a 45 mA durante aproximadamente 60 minutos para separação das proteínas contidas nos extratos celulares.

Após a corrida eletroforética os géis foram preparados para a transferência das proteínas para membranas de PVDF (difluoreto de polivinilideno). Os géis e as membranas foram submersos em solução de transferência (48 mM Tris, 39 mM de glicina, 1,3 mM SDS e

20% metanol) por 10 minutos e as transferências foram realizadas por 30 minutos a uma corrente elétrica fixa de 15 V pelo aparelho transferidor do tipo Semi-Dry. Após o término da transferência as membranas foram bloqueadas em Blotto [5% de Leite em pó desnatado contendo TBST (5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7.6 e 1% de Tween-20)]. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST durante 5 minutos e incubadas com os respectivos anticorpos primários, descritos na Tabela 3. As incubações foram realizadas em um período onde as membranas foram mantidas em agitação a 4 °C por um período de aproximadamente 36 horas. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com TBST para retirar os anticorpos que não se ligaram à membrana e, então, incubadas com o anticorpo secundário descritos na Tabela 3 por um intervalo de 4 horas sob agitação a temperatura ambiente. Realizadas as incubações, as membranas foram lavadas para retirada dos anticorpos secundários não ligados e em seguida reveladas. A detecção de sinais foi realizada com o Western Blotting Luminol Reagent (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 ImageJ) onde a densidade ótica de cada banda foi aferida.

**Tabela 3:** Anticorpo primário e secundário utilizados para análise de proteína.

<b>Proteína</b>	<b>KDa</b>	<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>
$\beta$ -actina	41,737	Cell Signaling Biotechnology #4967 1:750	Policlonal anti IgG
ACSL4	79,188	ABCAM #155182	de coelho conjugado
FASN	273,427	ABCAM #96863	a peroxidase
MLYCD	55,003	Abcam ab95945 1:300	(Cayman) 1:6000

### 3.6 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas se utilizando o programa Graph Pad Prism® 5.0, onde as médias  $\pm$  SD foram obtidas. A análise da significância foi realizada como a utilização do teste estatístico One Way ANOVA seguindo de teste de Tuckey, sendo que valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas considerando as alterações comparadas às células controles, Hep G2 e SK-HEP-1 não transfectadas.

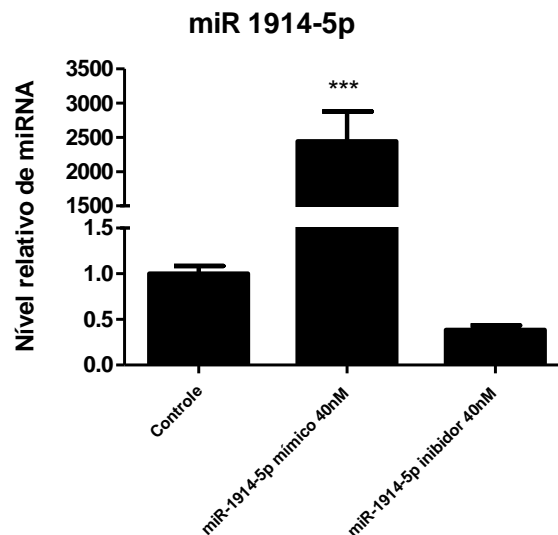
## CAPÍTULO 1: HEPG2

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miR-1914-5p: mensuração dos níveis do miR-1914-5p em células Hep G2 transfectadas

Para se garantir que os nível do miR-1914-5p fosse alterada frente a transfecção celular com as moléculas mimetizadora e/ ou inibidora do referido miRNA, o RNA total contendo os miRNAs maduros das células Hep G2 foram extraídos e o miR-1914-5p foi mensurado por qRT-PCR. Como esperado, quando comparado com o controle, a concentração do miRNA nas células transfectadas com o mímico estava muito maior e a concentração do miRNA nas células transfectadas com o inibidor estava menor (Figura 4). Particularmente em relação ao inibidores de miRNA, estes são ácidos nucléicos fita simples quimicamente modificados para se ligarem especificamente e inibirem miRNA endógenos (PEREIRA et al., 2013). Assim, o uso dessas pequenas moléculas mimetizadoraes e inibidoras favorece uma análise global da funcionalidade dos miRNAs no contexto da biologia do sistemas celular.

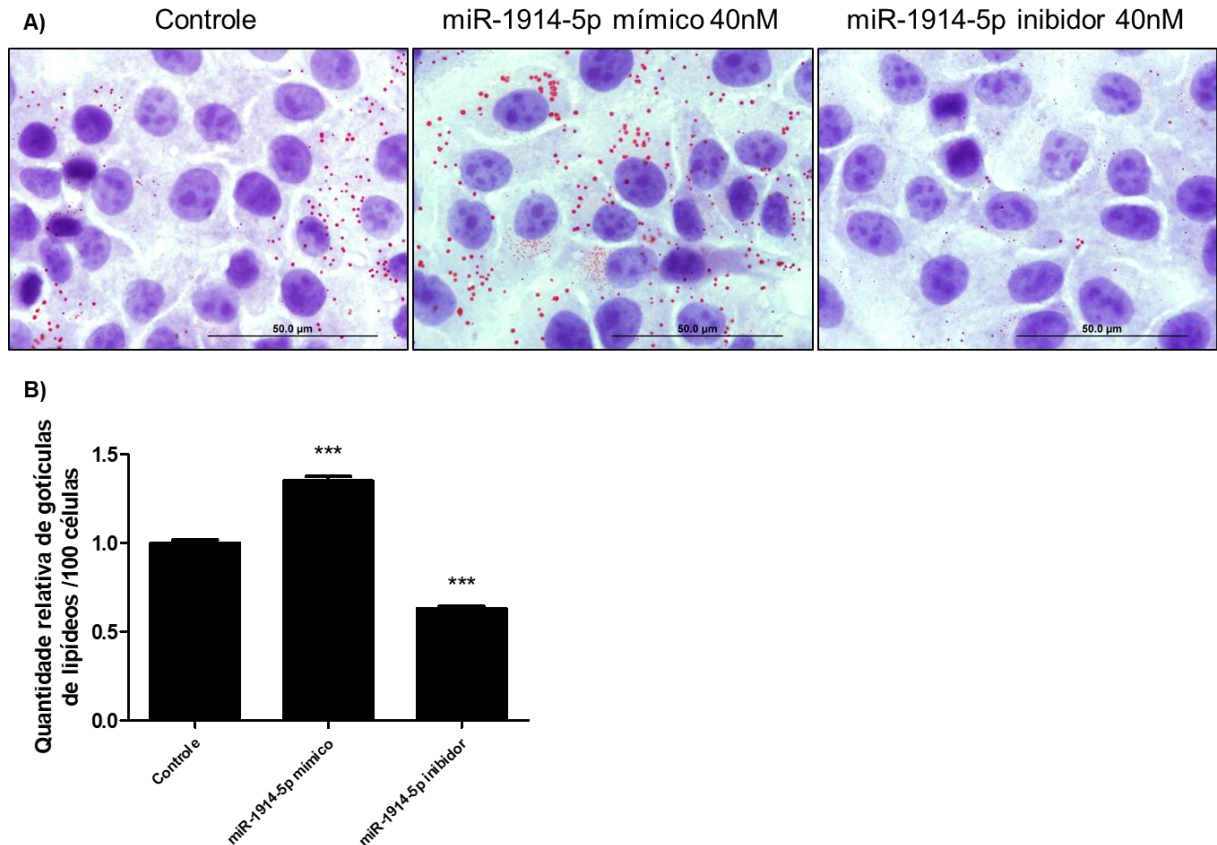
**Figura 4:** Níveis de expressão relativa do miRNA-1914-5p em células Hep G2 transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor. As análises foram realizadas em triplicatas técnicas e a expressão do miRNA foi obtida pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo o gráfico plotado utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



## 4.2. Análises de *Oil Red O*

Para a análise da alteração da quantidade de gotículas lipídicas frente aos altos níveis e/ ou a inibição do miR-1914-5p em células Hep G2 foram realizados análises de microscopia de campo claro com marcação de *Oil Red O*. Os resultados demonstraram um aumento expressivo no acúmulo desses componentes celulares nas células transfectadas com o miR-1914-5p mimico e um efeito reverso nas células onde o miR-1914-5p foi inibido (Figura 5). Sabe-se que em alguns tipos de câncer, como o câncer de colorretal, a hiperativação de FASN promove o acúmulo dessas gotículas e a  $\beta$ -oxidação de AG concomitantemente durante estresse metabólico, demonstrando um total desequilíbrio no metabolismo de lipídeos (ZAYTSEVA et al., 2015). De fato, lipídeos em câncer são altamente requisitados para sustentar a rápida proliferação celular e o alto consumo energético, além de funcionarem como mensageiros secundários em diversas vias de sinalização (WAKIL, 2009; CURRIE, 2013; JU, 2016). As gotículas lipídicas armazenam lipídeos neutros, como triglicerídeos, ésteres de esterilo e de retinil que podem ser degradados na mitocôndria, gerando assim energia, ou exercerem o papel de moléculas sinalizadoras atuando em diversas rotas metabólicas (WELTE, 2015). Atualmente, sabe-se que células tumorais tem a capacidade de acumularem maior quantidade de gotículas lipídicas do que células saudáveis, isso parece estar relacionado a uma maior agressividade tumoral e resistência à quimioterápicos, também possuem papel na resposta inflamatória, o que pode resultar no iniciação e progressão da tumorigênese (TIRINATO et al., 2017). Portanto, o acúmulo citoplasmático e o aumento do tamanho das gotículas de lipídeos em Hep G2 transfectadas com o miR-1914-5p mimico, pode estar associada a uma maior agressividade e resistência tumoral, porém são necessárias mais análises para identificar as vias de armazenamento e oxidação desses lipídeos.

**Figura 5:** Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro. A) Células Hep G2 transfectadas com miR1914-5p mímico ou inibidor. B) Quantificação relativa de gotículas lipídicas. Gráfico plotado utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



### 4.3 Análise da regulação da expressão gênica mediada pelo miR-1914-5p: as análises transcricionais e de proteínas

Baseado nos resultados das análises de gotículas lipídicas, foi possível inferir a presença de alterações metabólicas nas células transfectadas, quando da comparação com o controle. Para melhor explorar os aspectos moleculares desses resultados, análise de mensuração de expressão gênica foram realizadas para genes correlatos à diferentes etapas do metabolismo de lipídeos. Para alguns genes chaves desse metabolismo foram realizados além das análises transcricionais, ensaios de *Western Blot*. O conjunto dessas análises permitiu uma melhor compreensão de particularidades funcionais do miR-1914-5p no contexto da regulação do metabolismo lipídico.

#### 4.3.1 Análises moleculares de genes correlatos à síntese de lipídeos

Seguindo as análises, os genes chaves do metabolismo de lipídeos, ACC1, ACC2, MLYCD e FASN, e seu fator de transcrição elementos reguladores de esteróis 1c (SREBP-1c) foram analisados em reações de qRT-PCR. Ao observar os resultados na Figura 6 os níveis de SREBP-1c demonstraram uma diminuição na expressão nas células transfectadas com o miR-1914-5p mímico. Em níveis normais, essa molécula ativa a via da síntese de AG através dos genes ACC1, ACC2 e FASN (HORTON et al., 2002; SETHI, 2017). Ainda na Figura 6 é possível identificar que não houve diferença significativa na expressão de ACC1. Apesar do miR-1914-5p ter como alvo putativo o mRNA dessa molécula, a ACC1 é a enzima mais intensamente regulada na síntese de lipídeos (WAKIL, 2009). Os altos níveis do miR-1914-5p, no entanto, causaram modulações nos outros genes investigados da síntese lipídica. Para ACC2 houve um aumento significativo na célula transfectada com o miR-1914-5p mímico em comparação com a célula controle. A expressão do mRNA de MLYCD teve um aumento muito significativo e o mesmo foi observado para os níveis da sua proteína. Para FASN foi observado uma diminuição significativa nos níveis de mRNA em comparação com o controle e um aumento nos níveis de proteína.

Para essas análises é importante considerar os putativos sítios de interação do miR-1914-5p e o tempo de vida das proteínas analisadas. O miR-1914-5p possui sítios putativos de ligação no mRNA de ACC1, MLYCD e FASN, que podem ser verificados em bancos de dados online como TargetScanHuman ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) e miRDB (<http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>). Em nossos ensaios, ACC1 pareceu não ter seus níveis alterados pelas moléculas mimetizadoras e/ ou inibidoras. Por outro lado, a interação entre o miR-1914-5p e o mRNA de MLYCD já foi demonstrada em células estreladas hepáticas (DA SILVA et al., 2018). Entretanto, o aumento considerável nos níveis transcricionais e na proteína do gene MLYCD são observados nos ensaios. Esses resultados podem se correlacionar as particularidades metabólicas da célula tumoral em análise. A presença do miR-1914-5p pode estar desencadeando mecanismos de RNAi em MLYCD, o que faz com que a célula aumente inerentemente os níveis de RNA e proteína do gene investigado, considerando-se a sua relevância pra o metabolismo lipídico da célula tumoral.

Devido ao aumento dos níveis dessa enzima podemos considerar que a disponibilidade de acetil-CoA no citosol, resultante da reação da MLYCD, aumentou, favorecendo assim a síntese de lipídeos. Dessa forma, espera-se um aumento de FASN (JONES, 2015; RÖHRIG, 2016). Observando os resultados, é possível constatar o aumento da proteína FASN, porém há

uma diminuição em sua expressão gênica. Os resultados, portanto, sugerem que há uma regulação nos níveis de mRNA de FASN, que podem ter sido causado pelo miR-1914-5p, por mecanismos de RNAi, considerando-se a presença de putativos sítio de interação mRNA FASN: miR-1914-5p (o que requer uma validação de interação física entre as moléculas) e pelos baixos níveis de expressão do fator de transcrição SREBP-1c, porém como a proteína FASN possui um tempo de vida de 35 horas seus níveis são capazes de se manter. Logo, a maior disponibilidade de acetil-CoA causado pela desregulação de MLYCD, ocasionou a elevação dos níveis protéicos de FASN. Isso pode levar há um aumento da produção de AG, tanto disponíveis para oxidação quanto para o armazenamento (SAAB et al., 2018). Esse resultados em conjunto sugerem que o miR-1914-5p atua no sentido de favorecer o aumento da quantidade de gotículas de lipídeos, tanto por elevar os níveis de expressão de ACC2, quanto pelo aumento de FASN.

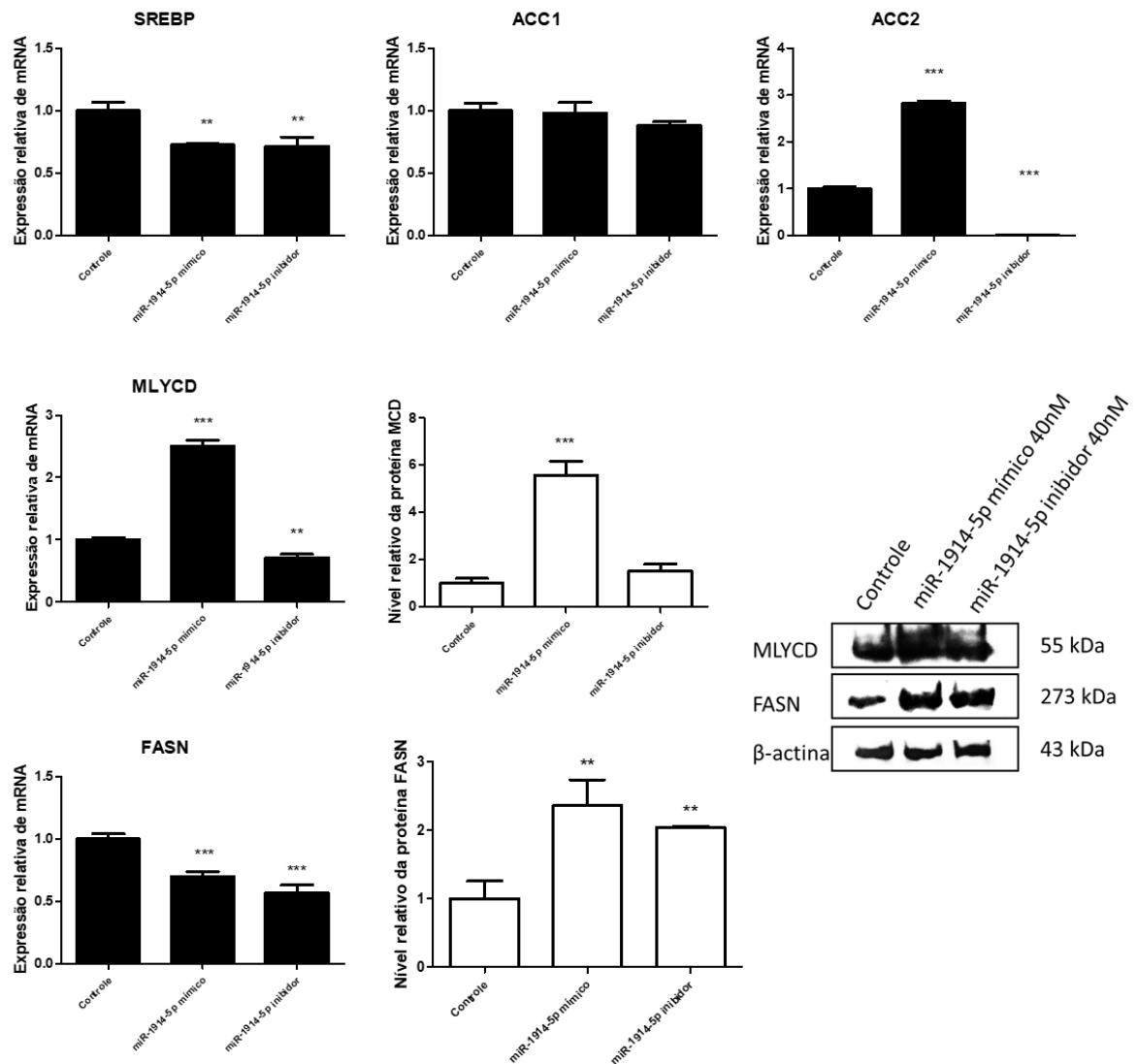
Prosseguindo as análises, a inibição do miR-1914-5p e, assim como observado na transfecção com a molécula mimetizadora, também ocorre diminuição dos níveis transcricionais do fator de transcrição SREBP-1c e os níveis de ACC1 não sofrem alterações em seus níveis de expressão, quando da comparação com a condição controle. Para ACC2, entretanto, houve uma queda muito significativa em seus níveis de expressão na células transfectadas com o miR-1914-5p inibidor em comparação com a célula controle. A expressão do mRNA de MLYCD também teve uma queda significativa, porém os níveis da sua proteína não foram alterados em comparação com a Hep G2 controle. Para FASN foi observado uma diminuição significativa nos níveis de mRNA em comparação com o controle e um aumento nos níveis de proteína, embora menor que os níveis de FASN encontrados nas células transfectadas com o miRNA mímico.

Conjuntamente os resultados sugerem indiretamente alterações metabólicas correlatas ao controle da  $\beta$ -oxidação. Os baixíssimos níveis de expressão de ACC2, indicam que a célula requer energia e procura inviabilizar o bloqueio desse processo na mitocôndria.. Por outro lado, a presença de moléculas inibidoras do miR-1914-5p não exerceu atuação direta na molécula MLYCD, observação essa, respaldada pelos níveis transcricionais e da proteína encontrados nas células transfectadas com o inibidor, quando da comparação com os níveis nas células controle. Em relação aos altos níveis de FASN encontrados, este se correlaciona com a necessidade da célula tumoral em continuar a síntese de lipídeos *de novo* referendado em diferentes estudos (CURIE et al, 2013; ZAYTSEVA et al., 2015; CAI et al., 2016; RÖHRIG, 2016). Porém, como observado pelo ensaio de *Oil Red O*, essas células não



acumularam gotículas de lipídeos mesmo perante a uma alta atividade de FASN, reforçando o indicativo de alta atividade oxidação desses AG pela célula.

**Figura 6:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs SREBP-1c, ACC1, ACC2, MLYCD e FASN e níveis relativos das proteínas MLYCD e FASN em células Hep G2 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 40nM. As análises foram realizadas em triplicatas, as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de qRT-PCR e os níveis de proteína foram mensurados por *Western blot*. Os gráficos foram plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



#### 4.3.2 Análises moleculares de genes correlatos ao armazenamento de lipídeos

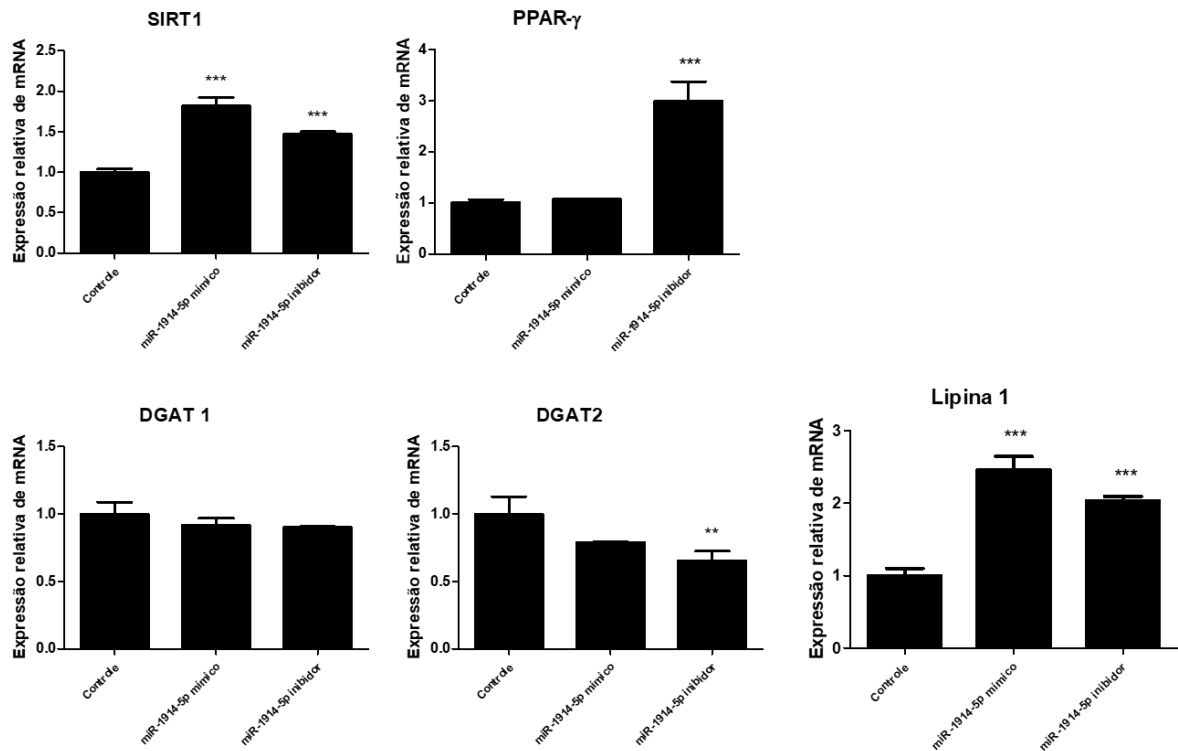
Considerando-se os resultados acima e para se investigar o armazenamento de lipídeos, importantes genes correlatos a esse mecanismo celular foram investigados por qRT-

PCR. Os resultados podem ser observados na Figura 7. Sirtuína 1 (SIRT1) é uma importante molécula para o metabolismo de lipídeos, sendo conhecida por regular os níveis de SREBP-1c (ZHANG et al., 2014). O receptor ativador proliferador de peroxissomo  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) auxilia na manutenção da homeostasia celular, promovendo o estoque de AG pela indução da expressão de Lipina 1, importante molécula do processo de biossíntese de triglicerídeos e fosfolipídeos que também co-regula SREBP-1c que atua no metabolismo lipídico (JANINI, 2015; JIA et al., 2016). Por fim, temos as enzimas diacil-glicerol aciltransferase (DGAT) que são responsáveis pela esterificação de diacilglicerol e acil-CoA graxo para a formação de triacilgliceróis. Nos mamíferos podemos encontrar ela de duas formas, a diacil-glicerol aciltransferase 1 (DGAT1) e diacil-glicerol aciltransferase 2 (DGAT2) (WELTE, 2015). Em nossas análises a alta concentração do miR-1914-5p modulou apenas a expressão gênica de SIRT1 e Lipina 1. Nas células He G2 transfectadas com o mímico de miR-1914-5p houve um aumento na expressão dessas moléculas comparado com as células Hep G2 controle. O aumento de SIRT1 e Lipina 1 podem justificar a maior quantidade de gotículas de lipídeos nas células transfectadas, quando das análises de *Oil Red O*.

Por outro lado, nas células Hep G2 onde houve a inibição do miR-1914-5p, observou-se também aumento nos níveis transcricionais de SIRT1 e Lipina 1, em relação às células controle. Diferencialmente, os níveis de expressão de PPAR- $\gamma$  aumentaram significativamente nas células transfectadas com o inibidor. Esses altos níveis de expressão reforçam as alterações no metabolismo de lipídeos e o favorecimento de processo oxidativos, considerando-se que esse importante fator auxilia na regulação da  $\beta$ -oxidação em peroxissomos (LASAR et al., 2018). Em relação aos elementos DGATs, os níveis de expressão de DGAT2 diminuíram consideravelmente nas células transfectadas com o inibidor, quando em comparação com as células controle. Em hepatócitos, a redução de seus níveis sugere uma redução no acúmulo de lipídeos (CHOI et al, 2015).

Em conjunto, os resultados sugerem que a célula está ativando vias de armazenamento de AG para um estoque energético, porém, como observado no ensaio de *Oil Red O*, essas células onde o miR-1914-5p foi inibido tiveram suas quantidades de gotículas lipídicas drasticamente reduzidas. Essas análises referendam a relevância do miR-1914-5p no controle do metabolismo energético das células tumorais.

**Figura 7:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs SIRT1, PPAR- $\gamma$ , DGAT1, DGAT2, Lipina 1 em células Hep G2 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 40nM. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



### 4.3.3 Análises moleculares de genes correlatos à $\beta$ -oxidação

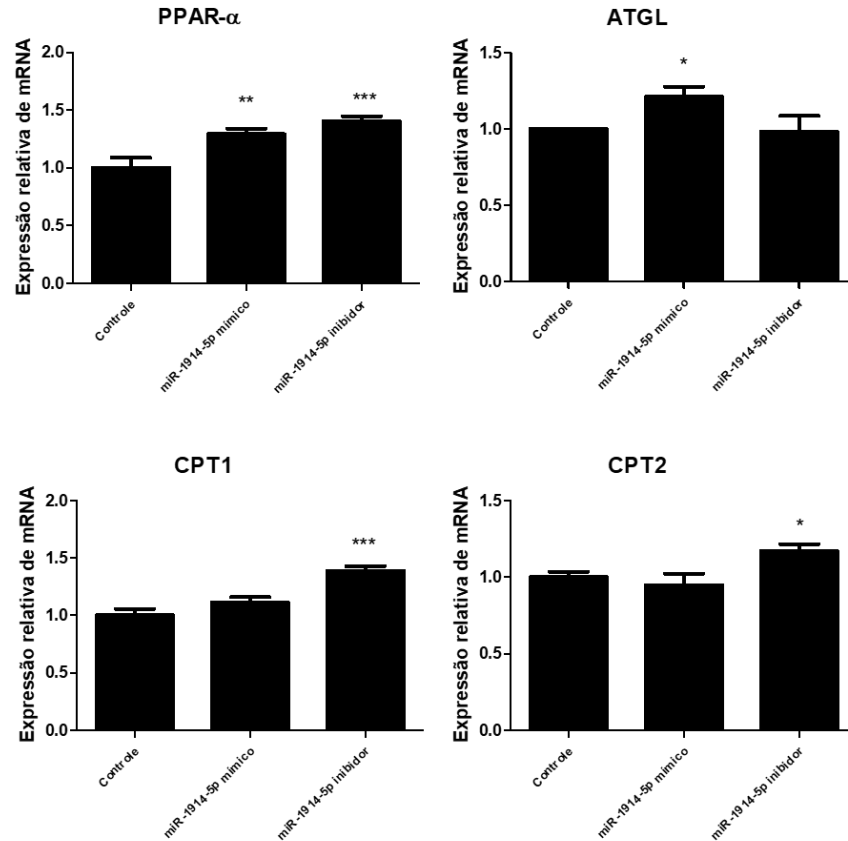
Para melhor elucidar as vias de sinalização celular que são moduladas pelo miR-1914-5p, ensaios de qRT-PCR foram realizados. Essas análises se centraram na investigação da expressão de genes importantes à via de  $\beta$ -oxidação. Os resultados podem ser observados na Figura 8. A  $\beta$ -oxidação é o processo de oxidação que ocorre na mitocôndria ou no peroxissomo, no qual os AG são sequencialmente degradados em acetil-CoA para a produção de ATP (NAKAMURA, 2014). O câncer, a  $\beta$ -oxidação é necessária principalmente em situações de estresse celular, porém seu papel no tratamento da doença ainda não está bem descrito (RÖHRIG, 2016; XIONG, 2018). Um importante gene para a ativação da  $\beta$ -oxidação é o receptor ativador proliferador de peroxissomo  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), essa molécula é conhecida por ser um fator transcricional que induz a oxidação de AG (JIA, 2017; RODRIGUEZ, 2016). Na escassez de nutrientes, as células podem aproveitar os triglicerídeos armazenados nas gotículas lipídicas para utilizá-los na oxidação de AG. Para isso, enzimas lipases quebram

esses triglicerídeos em lipídeos mais simples para emprega-los em reações de oxidação para a geração de ATP. Uma importante lipase é a ATGL (lipase de triglicerídeos de tecido adiposo), que é conhecida como a principal lipase hepática, pois catalisa o passo inicial da degradação lipídica (CURRIE et al., 2013; MASHEK et al., 2015). Por fim, temos a CPT1 e a carnitinapalmitoil-transferase 2 (CPT2) que são transportadoras dos grupos acil-graxos para a mitocôndria que serão oxidados (GOLDBERG, 2017).

Nas células Hep G2 transfectadas com o miR-1914-5p mímico, observou-se um aumento significativo no nível de expressão de PPAR- $\alpha$  e de ATGL, mas não o aumento na expressão de CPT1 e CPT2. Conjuntamente com resultados anteriores a alta síntese de lipídeos indicado pelo aumento de FASN, a quantidade de gotículas de lipídeos e o aumento na expressão de ACC2, reforçam a a sugestão de que o aumento do miR-1914-5p, além do metabolismo celular basal, conduzem ao bloqueio da  $\beta$ -oxidação nessas células.

Já nas células Hep G2 transfectadas com o miR-1914-5p inibidor, foi possível observar um aumento significativo na expressão de PPAR- $\alpha$  e CPT1, e um aumento não tão significativo, mas ainda significativo, na expressão de CPT2. Esses resultados somados ao já que foi discutido reforçam que quando o miR-1914-5p foi inibido em células Hep G2 houve uma depleção energética, levando a célula à realizar  $\beta$ -oxidação.

**Figura 8:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs PPAR- $\alpha$ , ATGL, CPT1 e CPT2 em células Hep G2 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 40nM. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



#### 4.4 Análise dos AG: quantidade, alongamento e dessaturação

##### 4.4.1 Análise de AG por CG-MS

Tendo como objetivo principal a análise do metabolismo de lipídeos, ensaios para a quantificação dos principais AG foram realizadas utilizando metodologia de CG-MS. Células oriundas dos diferentes grupos experimentais foram analisadas. Nas células Hep G2 foram encontrados os seguintes AG: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido esteárico (C18:0) e ácido araquidônico (C20:4). Em geral, a desregulação do miR-1914-5p elevou a quantidade total de AG encontrados na célula (Tabela 4). O ácido palmítico foi o ácido encontrado em maior abundância nas células, ~35%. Sabe-se que em HCC esse ácido altera a fluidez da membrana celular, suprimindo o crescimento e migração

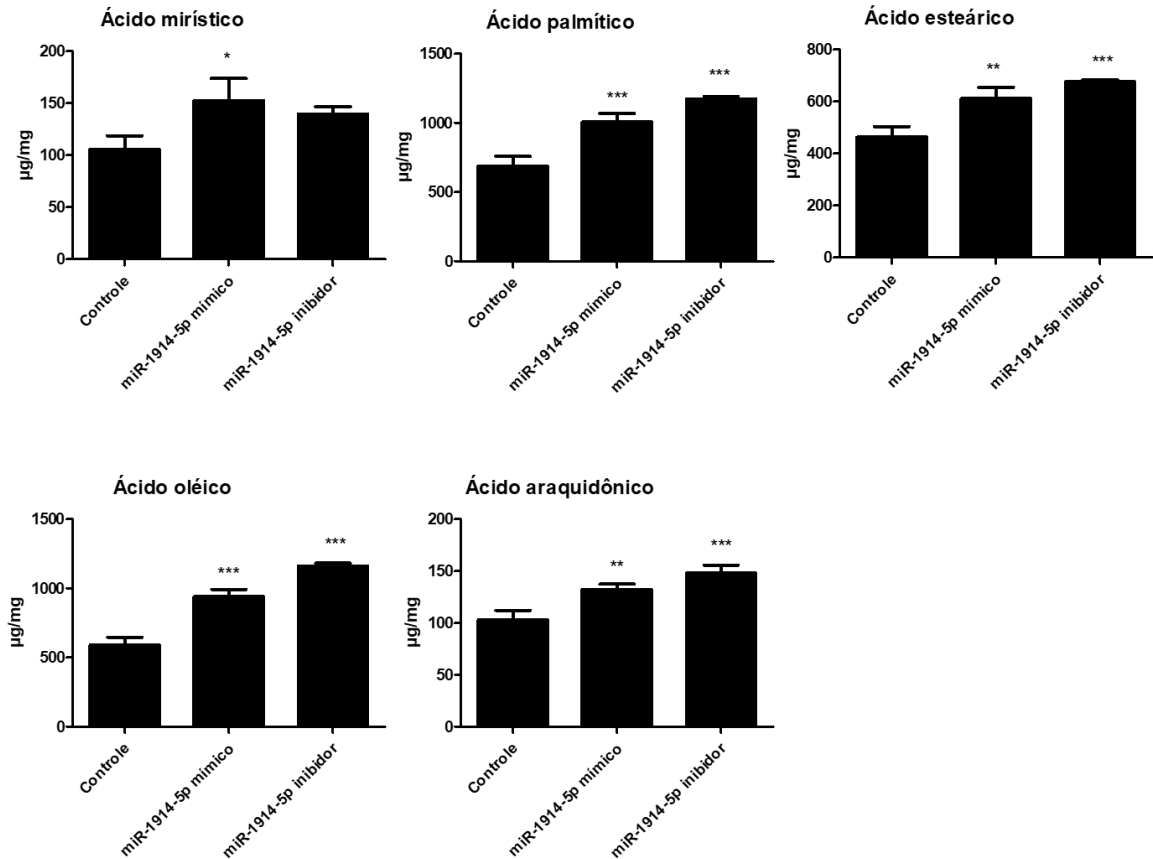
de hepatócitos tumorais (LIN et al., 2017). O segundo AG mais encontrado foi o ácido oleico, esse ácido é conhecido por causar acumulação de lipídeos em células hepáticas (ALKHATATBEH, 2016). Além disso, a suplementação de ácido oleico aumenta a metástase através da modulação da expressão de genes envolvidos na adesão célula-célula e de elementos da matrix extracelular (NATH et al., 2015; ZHAO et al., 2016) Em seguida, temos o ácido esteárico, esse é um AG saturado com 18 carbonos e seu papel em células tumorais ainda não foi profundamente elucidado, porém, sabe-se que altos níveis desse AG e baixa razão entre ácido oleico/ ácido esteárico levam a célula à apoptose (LI et al., 2018). Por fim, encontrado em menores concentrações temos o ácido mirístico e o ácido araquidônico, importante AG necessário em respostas inflamatórias e sobrevivência celular (KUWATA, 2015).

**Tabela 4:** Quantificação de AG em células Hep G2 controle, transfectada com miR-1914-5p mímico e transfectada com o miR-1914-5p inibidor. Valores representados em µg de AG por mg de células e sua porcentagem correspondente nos AG totais. O resultado da quantidade total de AG foi submetido à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\*p<0.0005.

Ácido Graxo	HepG2 Controle		HepG2 miR-1914-5p mímico		HepG2 miR-1914-5p inibidor	
	(µg/mg)	(%)	(µg/mg)	(%)	(µg/mg)	(%)
Ácido Palmítico	689,7650	35,32	1007,7380	35,41	1173,8660	35,57
Ácido Oléico	590,7774	30,25	941,3872	33,08	1161,3573	35,19
Ácido Esteárico	463,6613	23,74	611,8014	21,50	676,5665	20,50
Ácido Mirístico	105,5085	5,40	152,5588	5,36	139,9951	4,24
Ácido Araquidônico	102,9941	5,27	132,3423	4,65	148,3287	4,49
Total	1952,7063	100	2845,8277 (***)	100	3300,1136 (***)	100

A análise comparativa dos AG entre os diferentes grupos experimentais permitiu observar um aumento significativo na quantidade desses, nos grupos de células transfectadas. Isso já era esperado devido a modulação do miR-1914-5p em ambos os grupos de célula, que causou aumento da proteína FASN. Outro fator importante a ser observado é que os meios de cultura em que os diferentes grupos de células foram cultivados também foram analisados por CG-MS e não houve nenhuma mudança significativa da quantidade de AG entre o meio fresco para o meio do cultivo que ficou em incubação com as células por 24 horas. Com isso pode-se inferir que a diferença na quantidade de AG encontrados nas células transfectadas é resultante da síntese *de novo* de AG. Os resultados apresentados na Tabela 4 foram tabulados na Figura 9.

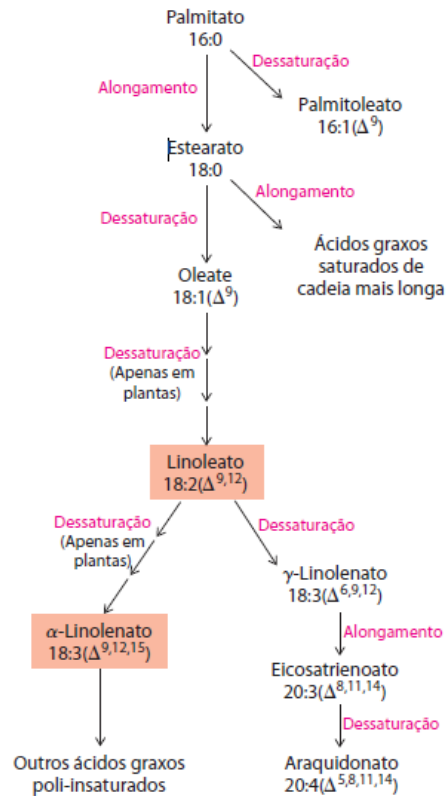
**Figura 9:** Quantidade em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de AG em células Hep G2 controle, transfectada com miR-1914-5p mímico e transfectada com o miR-1914-5p inibidor. As análises foram realizadas em triplicatas e a quantidade de AG foi obtida por CG-MS, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ .



#### 4.4.2 Análise molecular da ativação, dessaturação e alongamento dos AG

Para melhor compreender a modulação do miR-1914-5p na ativação, dessaturação e alongamento dos AG encontrados nas células, análises de qRT-PCR de genes envolvidos nesses processos foram realizadas. A Figura 10 esquematiza esses processos.

**Figura 10:** Dessaturação e alongamento do ácido palmítico.



Fonte: Adaptado de NELSON, D. L.; COX M. M., 2014.

As Acil-CoA sintetases são enzimas importantes no processamento de AG, pois são elas que ativam os AG adicionando o acil-CoA em sua cadeia (CURRIE et al., 2013). Os mamíferos possuem cinco formas dessas acil-CoA sintetases, nesse estudo foram analisadas duas dessas isoformas, a acil-CoA sintetase de cadeia longa 4 (ACSL4) e a acil-CoA sintetase de cadeia longa 5 (ACSL5), ambas geralmente superexpressas em tumores (DOLL et al., 2017; RAJKUMAR et al., 2018). Os resultados podem ser observados na Figura 11.

Tanto as células transfectadas com o miR-1914-5p mímico quanto com o inibidor tiveram um aumento muito significativo na expressão do mRNA dessas enzimas. O nível da proteína ACSL4 foi quantificado por análises de *Western Blot* e esse ensaio demonstrou que há um aumento para as células transfectadas com o miR-1914-5p mímico. Esse resultado somado ao aumento da quantidade de ácido araquidônico na célula, pode estar associado à sobrevivência celular causado pela prevenção da apoptose, já observado em outros tumores (CAO et al., 2000; WU et al., 2015).

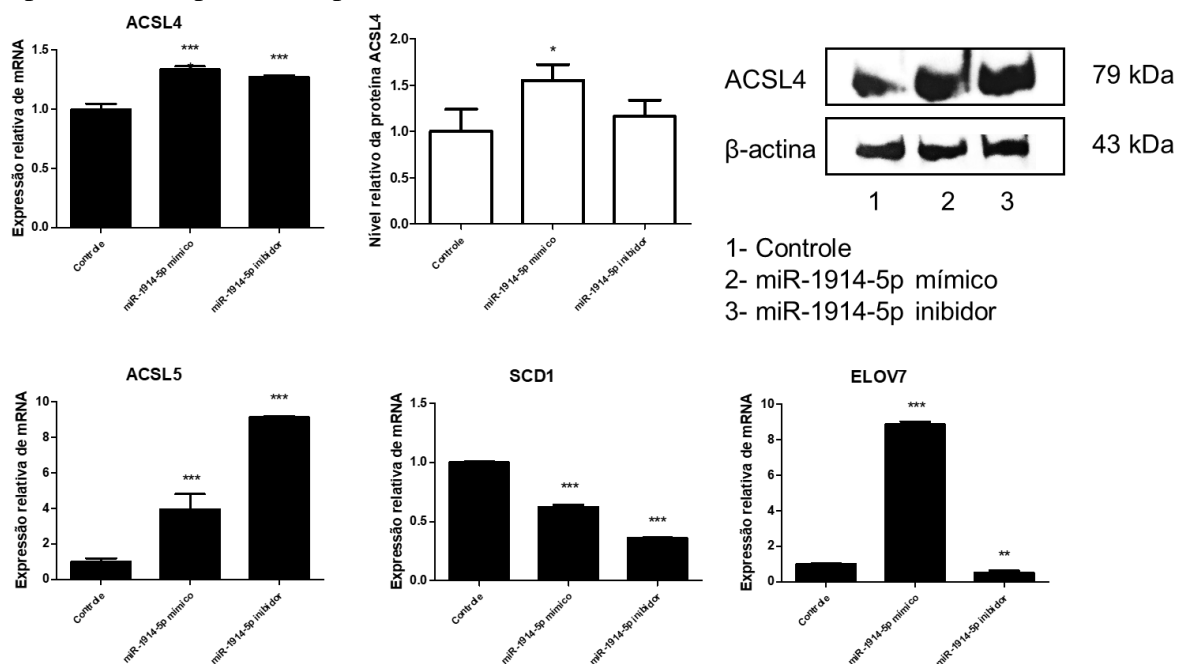
Seguindo as análises, também foi investigado uma importante enzima na saturação de AG, a esteroil-coa dessaturase ou delta-9 dessaturase (SCD1). Essa dessaturase catalisa a introdução de ligação dupla na posição C9 em AG de cadeia curta e sabe-se que em HCC sua



alta expressão está relacionada a baixa sobrevivência e a resistência a quimioterápicos (MA et al., 2017). Em nossas análises, o nível de expressão gênica de SCD1 apresentou uma expressiva redução, tanto nas células Hep G2 onde houve a transfecção com miR-1914-5p mimico, quanto com o miR-1914-5p inibidor.

Ainda foi analisado o nível de expressão gênica de elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 7 (ELOV7), uma importante elongase de ácidos graxos acima de 20 carbonos. Sabe-se que em cânceres essa enzima é superexpressa e está relacionada à sobrevivência tumoral (TAMURA et al., 2009; MARIEN et al., 2016)). A qRT-PCR do gene de ELOV7 revelou um aumento drástico em sua expressão em células Hep G2 transfectadas com o miR-1914-5p mimico e uma redução acentuada na expressão para as células com o miR-1914-5p inibido. É interessante apontar que o miR-1914-5p possui putativos alvos no mRNA de ELOV7 e considerando o baixo tempo de vida dessa proteína, de 3 à 4 horas, pode sugerir efeitos modulares desse miR na expressão dessa elongase, porém análises mais específicas precisam ser realizadas para corroborarmos essa hipótese.

**Figura 11:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs ACSL4, ACSL5, SCD1 e ELOV7 e nível relativo da proteína ACSL4 em células Hep G2 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mimico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 40nM. As análises foram realizadas em triplicatas, as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real e os níveis de proteína foram mensurados por *Western blot*. Os gráficos foram plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

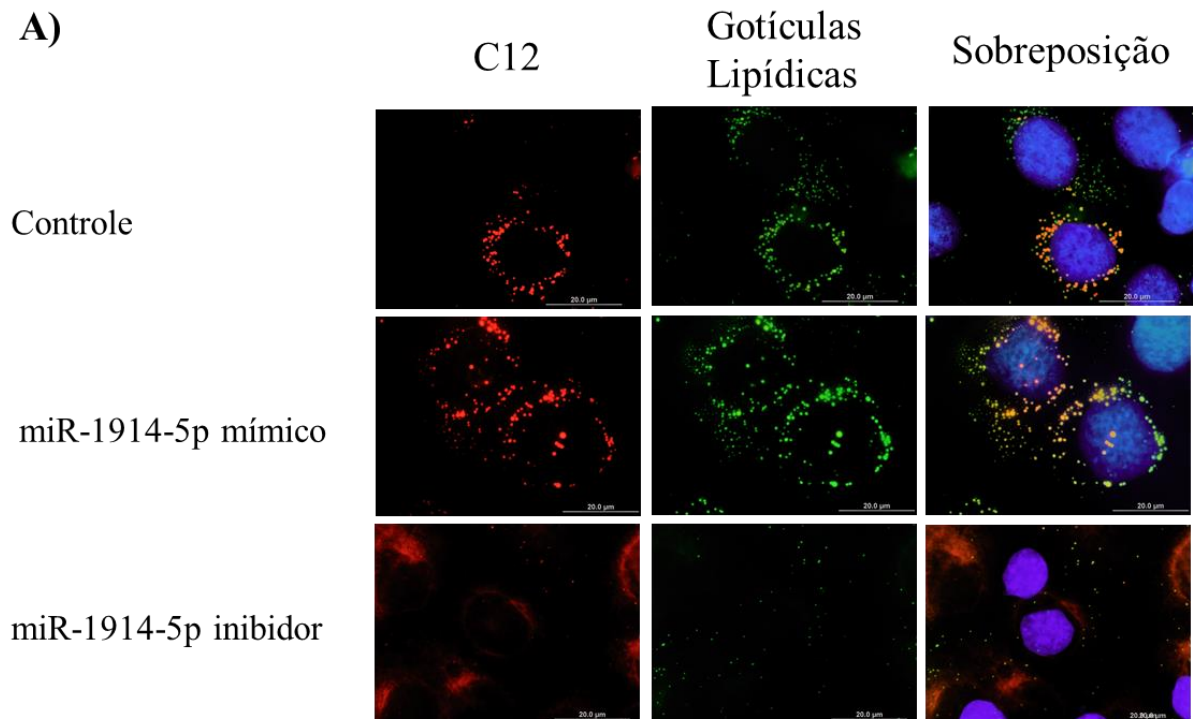


#### 4.5 Análises da oxidação de AG

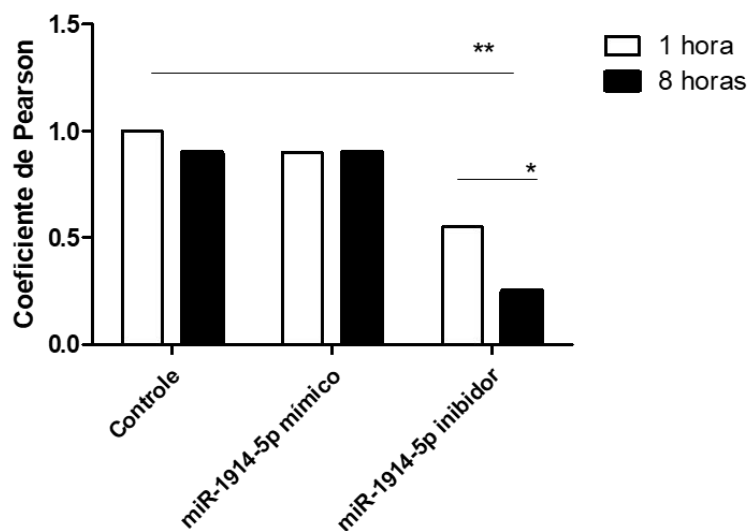
Em nossos ensaios as células transfectadas com o miR-1914-5p mímico a localização do vermelho C12 estava quase completamente sobreposta ao verde das gotículas de lipídeos. Esse fenômeno é observado em células onde há um meio de cultivo altamente nutritivo onde as células não realizam a oxidação dos AG (RAMBOLD et al., 2015). Em nossos ensaios, a observação desse fenômeno juntamente com a modulação dos genes de  $\beta$ -oxidação observados sugere o bloqueio dessa via como já hipotetizado. Para confirmar essa hipótese, o mesmo ensaio foi realizado nas células Hep G2 cultivadas com Etomoxir (Merck) na concentração de 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M (dados não apresentados). O Etomoxir é um sódio de sal hidratado conhecido por inibir a CPT1, dessa forma bloqueando a oxidação dos AG. As células que tiveram a  $\beta$ -oxidação bloqueada por Etomoxir apresentaram os mesmos resultados observados nas células Hep G2 transfectadas com o miR-1914-5p mímico, que aumentou a quantidade intracelular do miRNA em estudo.

Por outro lado, as células onde o miR-1914-5p foi inibido demonstram uma perda acentuada de sinal do vermelho C12 entre os intervalos observados, além de uma distribuição de sinal diferente, não concentrando apenas nas gotículas de lipídeos verdes. Estudos mostraram que isso é observado em células cultivadas em meio de cultivo depletado de nutrientes, onde há uma maior necessidade de obtenção de ATP pela oxidação de AG (RAMBOLD et al., 2015). Dessa forma, esses resultados em conjunto com a modulação dos genes dessa via sugerem uma maior ocorrência da  $\beta$ -oxidação nas células Hep G2 quando o miR-1914-5p é inibido. Esses resultados podem ser observados na Figura 12.

**Figura 12:** A) Microscopia de fluorescências de células Hep G2 controle e transfectadas com o miR-1914-5p mímico ou inibidor na concentração de 40nM e coradas com BODIPY™ 558/568 C12 (lipídeo C12 em vermelho), BODIPY™ 493/503 (gotículas lipídicas em verde) e as imagens sobrepostas junto a coloração DAPI (núcleo em azul) citoesqueleto em vermelho. B) Quantificação da sobreposição do C12 com as gotículas lipídicas pelo o coeficiente de Pearson. Os gráficos foram plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



**B)**  
Sobreposição de C12 com gotículas lipídicas



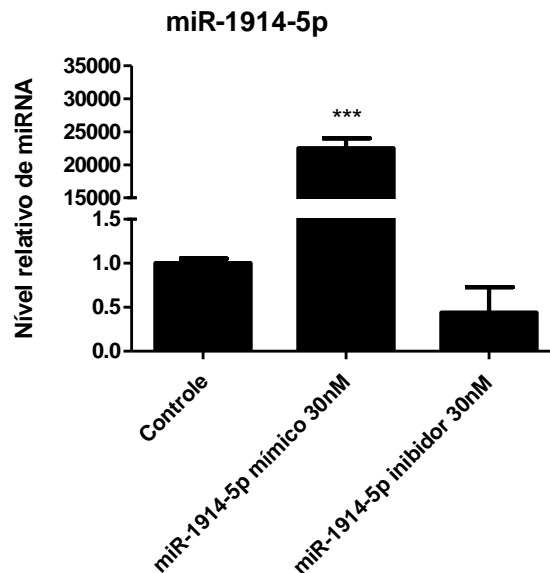
## CAPÍTULO 2: SK-HEP-1

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miR-1914-5p: mensuração dos níveis do miR-1914-5p em células SK-HEP-1 transfectadas

Após reações de transcrição reversa, o cDNA obtido foi utilizado em reações de qRT-PCR afim de verificar a alteração da quantidade de miR-1914-5p nas células utilizadas nas análises desse estudo. Como esperado, a concentração do miRNA nas células transfectadas com o mímico estava muito maior quando comparado ao controle e a concentração do miRNA nas células transfectadas com o inibidor estava menor quando comparado ao controle. A Figura 13 demonstra esses resultados.

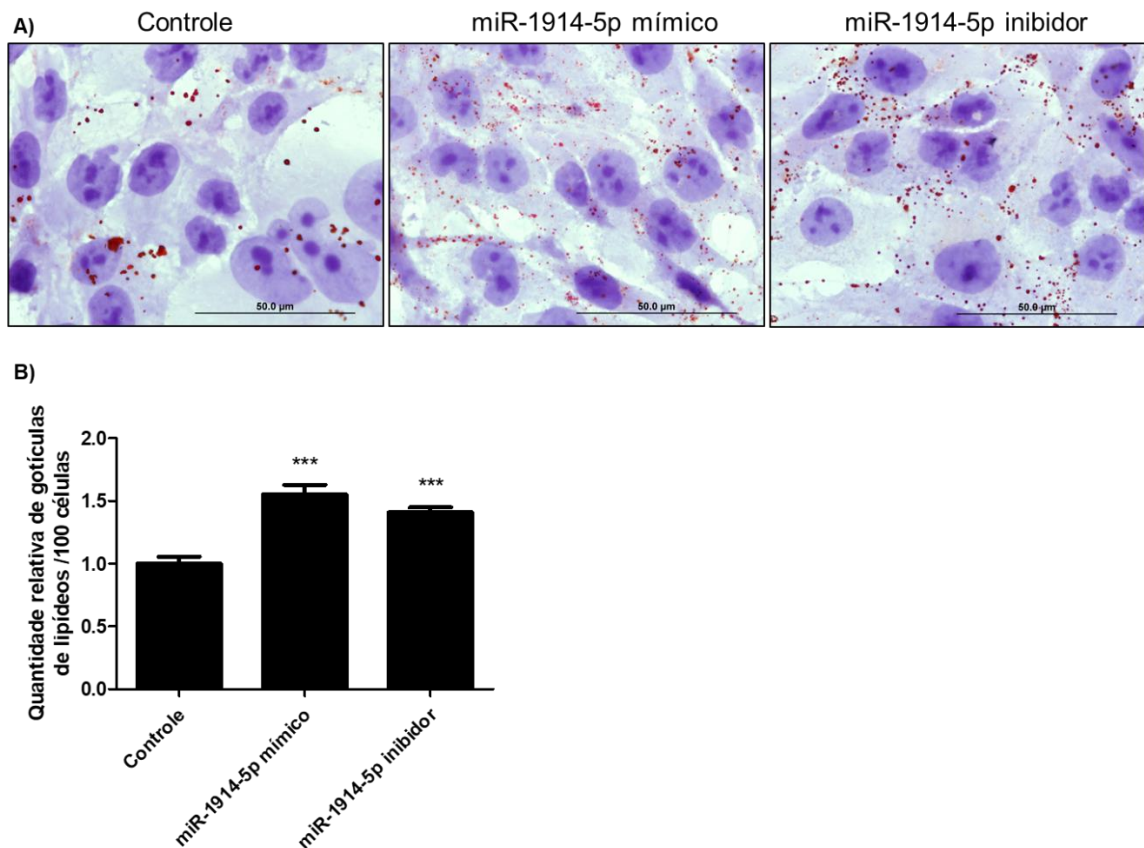
**Figura 13:** Níveis de expressão relativa do miRNA-1914-5p em células SK-HEP-1 transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor. As análises foram realizadas em triplicatas e a expressão do miRNA foi obtida pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo o gráfico plotado utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



## 5.2 Análises de *Oil Red O*

Como anteriormente mencionado, as gotículas de lipídeos são consideradas estruturas dinâmicas e funcionais, responsáveis não somente pelo armazenamento de gordura e energia, mas também estão envolvidas na biossíntese de membranas, metabolismo de lipídeos, sinalização celular, inflamação e câncer (CURRIE, 2013; WELTE, 2015; JU, 2016). Para a análise da alteração da quantidade de gotículas lipídicas frente a alta concentração e a inibição do miR-1914-5p em células SK-HEP-1, foram realizados ensaios de microscopia de campo claro com marcação de *Oil Red O*. Os resultados demonstraram um aumento expressivo nas células transfectadas tanto com o miR-1914-5p mímico quanto com o inibidor (Figura 14). É interessante notar que diferente de Hep G2, o inibidor na SK-HEP-1 também aumentou o número de gotículas, sugerindo mecanismos de atuação dessas moléculas dependentes do tipo celular.

**Figura 14:** Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro. A) Células SK-HEP-1 transfectadas com miR1914-5p mímico ou inibidor. B) Quantificação relativa de gotículas lipídicas. Gráfico plotado utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



### **5.3 Análise da regulação da expressão gênica mediada pelo miR-1914-5p: as análises transcricionais e de proteínas**

Através da análise de gotículas lipídicas, foi possível observar a ocorrência de alterações metabólicas. Para melhor explorar o metabolismo celular frente aos miRNAs mímicos e inibidores, análises de mensuração de expressão gênica foram realizadas para genes correlatos à diferentes etapas do metabolismo de lipídeos. Para alguns genes chaves desse metabolismo foram também realizadas análises de *Western Blot*. O conjunto dessas análises permitiram uma melhor compreensão de particularidades funcionais do miR-1914-5p no contexto da regulação funcional do metabolismo lipídico.

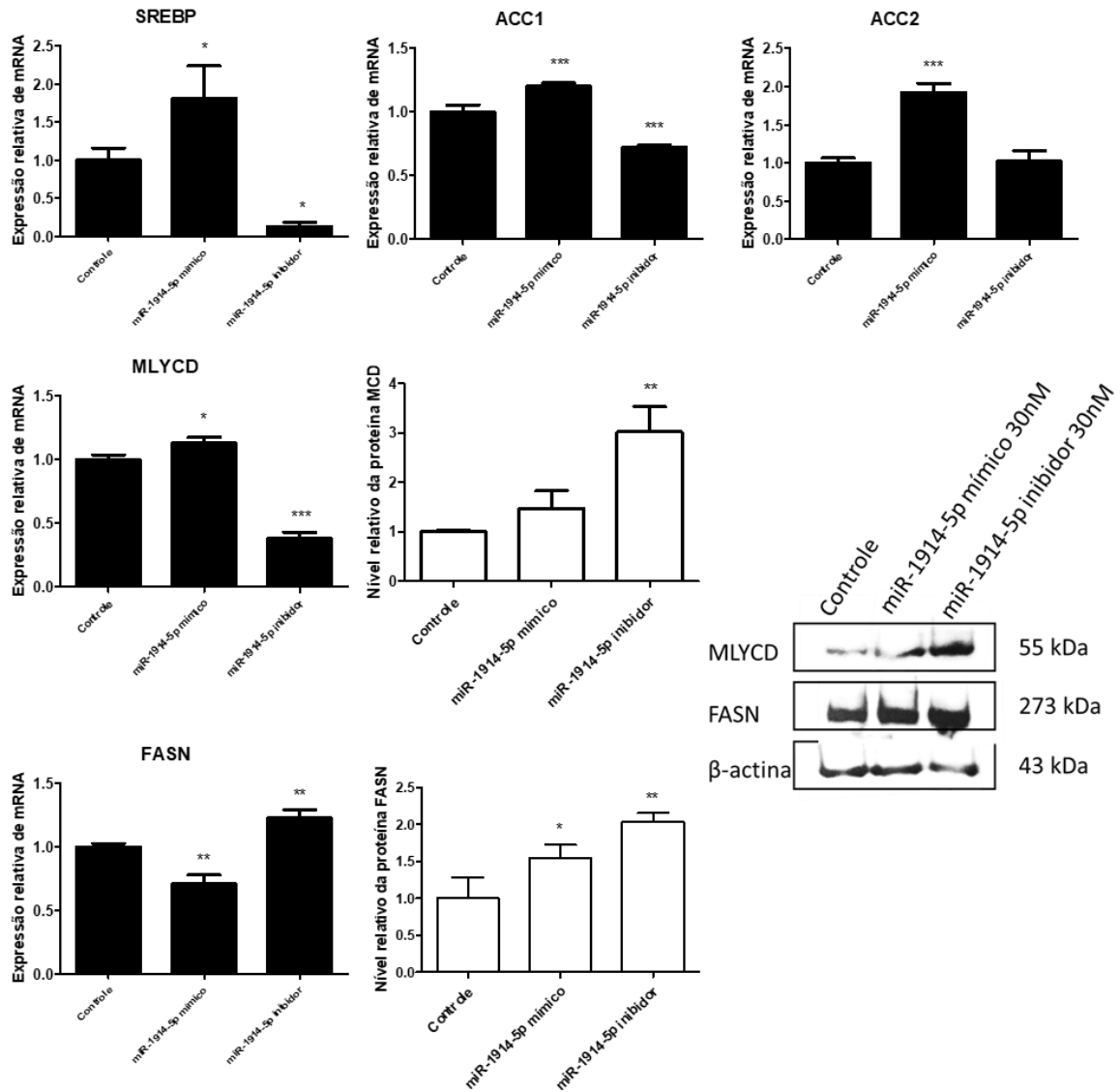
#### **5.3.1 Análises moleculares de genes correlatos à síntese de lipídeos**

Seguindo as análises, os genes chaves do metabolismo de lipídeos, ACC1, ACC2, MLYCD e FASN, e seu fator de transcrição SREBP-1c foram analisados através por RT-PCR. Os níveis proteicos de MLYCD e FASN foram quantificados por *Western Blot*. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos. Podemos observar na Figura que o nível transcricional dos genes SREBP-1c, ACC1 e ACC2 aumentou nas células transfectadas com o miR-1914-5p mímico em relação as células controle, sendo esse aumento mais expressivo em ACC1 e ACC2. Entretanto, para MLYCD, houve um aumento na expressão gênica, mas este aumento não resultou em elevação da quantidade de proteínas para as células, no qual o miRNA estava em maior quantidade, que sugere a presença de mecanismos de RNAi, considerando-se trabalhos anteriores que demonstram esse mecanismos, como o trabalho desse grupo de pesquisa (Silva, 2018). Por fim, ainda nesse grupo de células, a expressão de mRNA de FASN sofreu uma redução significativa, porém seus níveis de proteínas sofreram leve alteração positiva, o que pode estar diretamente correlacionado com a meia vida proteica. O aumento de ACC1 pode ter causado o leve aumento de FASN, já que o substrato para a reação da sintase pode estar mais abundante. Porém não se espera altas taxas de AG nessas células. Por se tratar de uma célula de adenocarcinoma, a SK-HEP-1 possui um metabolismo um tanto plástico e pode depender mais de AG exógenos do que da síntese *de novo* de lipídeos, como é observado em células metastáticas (RÖHRIG, 2016; PASCUAL et al., 2017). As gotículas lipídicas encontradas nessas células possuíam um tamanho muito reduzido se comparado às SK-HEP-1 controle, além disso também houve alta expressão de

ACC2, que pode estar bloqueando a  $\beta$ -oxidação indiretamente pela produção de malonil-CoA, justificando o acúmulo de lipídeo. Em conjunto esses resultados sugerem que a alta concentração desse miRNA nessa célula pode não ser tão efetivo devido ao seu metabolismo lipídico flexível.

Seguindo as análises, em células SK-HEP-1 transfectadas com o miR-1914-5p inibidor, houve uma redução do nível de expressão gênica do fator de transcrição SREBP-1c, o que pode justificar a redução encontrada nos níveis de expressão do mRNA de ACC1, considerando-se o papel desse fator de transcrição na expressão desse gene. No entanto, para MLYCD, observamos uma redução no nível de seu mRNA mas um aumento dessa proteína se comparada com as células controle. Novamente é importante ressaltar que diferenças nos níveis gênicos e protéicos são justificados por mecanismos pós-transcricionais e pelo tempo de vida das proteínas. A alta quantidade de proteína MLYCD pode ter ocasionado o aumento significativo de FASN, tanto da expressão gênica quanto do nível protéico. Estes resultados analisados, juntamente com o aumento de gotículas lipídicas, tanto na quantidade quanto no tamanho, e ainda a não modulação de ACC2, podem sugerir um aumento na produção de AG nesse grupo de células.

**Figura 15:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs SREBP-1c, ACC1, ACC2, MLYCD e FASN e níveis relativos das proteínas MLYCD e FASN em células SK-HEP-1 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 30nM. As análises foram realizadas em triplicatas, as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real e os níveis de proteína foram mensurados por *Western blot*. Os gráficos foram plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



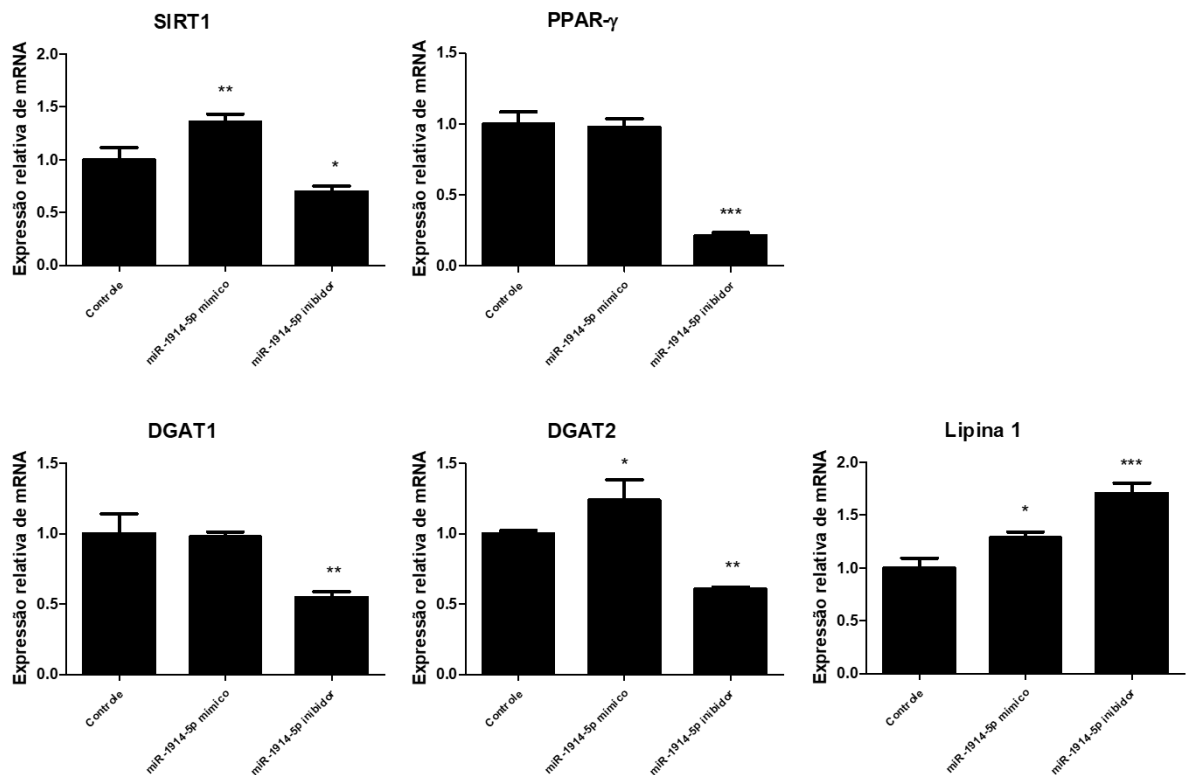
### 5.3.2 Análises moleculares de genes correlatos ao armazenamento de lipídeos

A indicação da modulação e distúrbios causados ao metabolismo das células direcionou uma análise mais pontual sobre o armazenamento dos lipídeos em gotículas citoplasmáticas. Para isso, da mesma maneira que realizado quando do estudo de HEPG2, genes correlatos ao armazenamento de lipídeos como DGAT1 e DGAT2; Lipina 1 e seu fator



de transcrição PPAR- $\gamma$ ; e também de SIRT1, importante molécula reguladora de SREBP-1c, foram analisados por qRT-PCR. nos diferentes grupos de células SK-HEP-1 (controle, transfectada com o miR-1914-5p mímico e transfectada com o miR-1914-5p inibidor). A Figura 16 apresenta os resultados obtidos.

**Figura 16:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs SIRT1, PPAR- $\gamma$ , DGAT1, DGAT2, Lipina 1 em células SK-HEP-1 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 30nM. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



Por sua vez o aumento dos níveis do miR-1914-5p em células SK-HEP-1 conduziu a variação na expressão gênica. A expressão de SIRT1 apresentou aumento significativo se comparada com as células controle. Também foi observado um aumento na expressão dos genes DGAT2 e Lipina 1 nesse grupo de células. Esses aumentos transcricionais são relevantes, pois está correlacionado à maior quantidade de gotículas lipídicas encontradas nessas células (REUE, 2008; WELTE, 2015).

Nas células onde houve a inibição do miR-1914-5p, podemos observar uma redução da expressão de SIRT1 e de PPAR- $\gamma$ , sendo a última mais expressiva. A redução da expressão

desses genes sugere uma redução no acúmulo de lipídeos em células hepáticas (JIA et al, 2016), porém não observamos tal fenótipo nas análises de *Oil Red O*. Ainda, as expressões gênicas de DGAT1 e DGAT2 também sofreram redução significativa quando comparamos as células SK-HEP-1 transfectadas com o miR-1914-5p inibidor com o as células SK-HEP-1 controle. Mais uma vez as análises moleculares sugerem redução de gotículas lipídicas. Dessa forma, o aumento expressivo na expressão do gene Lipina 1 levanta a hipótese que o acúmulo de gotículas lipídicas nessa célula está sendo modulado por uma rota onde a Lipina 1 tem função (DA SILVA, 2018).

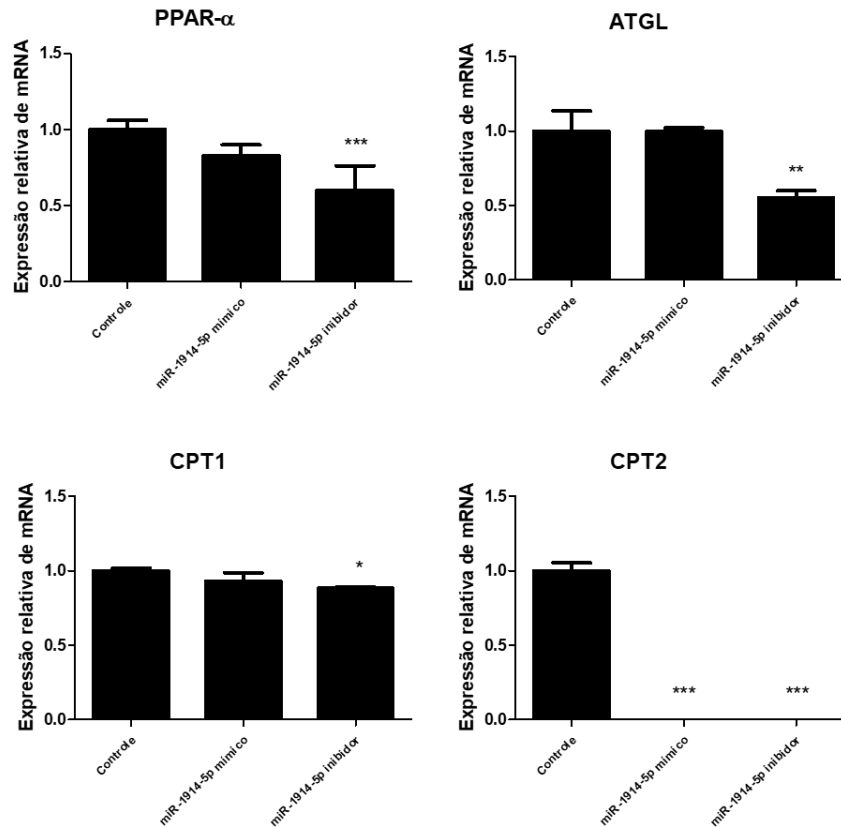
### 5.3.3 Análises moleculares de genes correlatos à $\beta$ -oxidação

Continuando as análises funcionais do miR-1914-5p sobre o metabolismo de lipídeos, ensaios de qRT-PCR para genes importantes na oxidação de AG foram realizados. Em câncer a  $\beta$ -oxidação é necessária para atender as altas demandas energéticas, já que este processo produz ATP para a célula. Em situações de estresse celular, a  $\beta$ -oxidação pode auxiliar na sobrevivência da célula, no entanto o papel da  $\beta$ -oxidação em célula tumorais ainda é muito discutido (RÖHRIG, 2016; XIONG, 2018). Os genes investigados nesse estudo, correlatos à esse processo, foram o fator de transcrição que regula diretamente a expressão de diversos genes na absorção ou oxidação de ácidos graxos PPAR- $\alpha$ , a lipase ATGL e as transportadoras dos grupos acil-graxos CPT1 e CPT2. Os resultados dessas análises estão representados na Figura 17.

As células SK-HEP-1 transfectadas com o miR-1914-5p mimico quando comparadas com as células SK-HEP-1 controle, apenas demonstraram diferença no nível de expressão gênica de CPT2, onde foi possível visualizar uma redução expressiva e significativa nos níveis transcricionais desse gene.

Para as células SK-HEP-1 transfectadas com o miR-1914-5p inibidor, houve modulações negativas em todos os genes analisados, sendo mais evidente em PPAR- $\alpha$  e CPT2. Esses resultados sugerem novamente alterações metabólicas causadas nas células SK-HEP-1.

**Figura 17:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs PPAR- $\alpha$ , ATGL, CPT1 e CPT2 em células SK-HEP-1 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 30nM. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

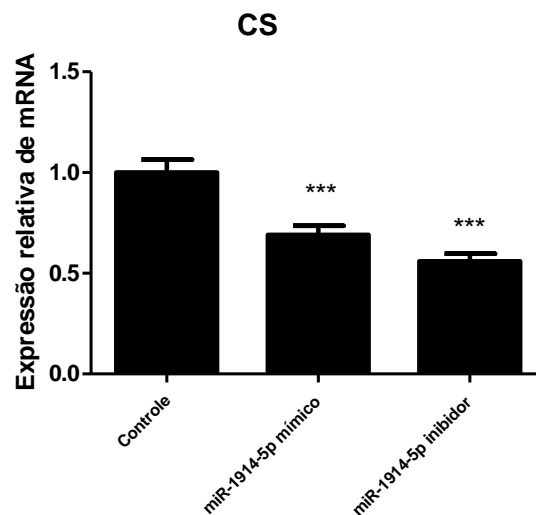


### 5.3.4 Análises moleculares de genes correlatos ao metabolismo energético

Em tumores, a ativação de oncogenes e a perda de supressores tumorais causam reprogramação metabólica nas células, resultando em aumento da necessidade energética e vias biossintéticas. No entanto, a limitação nutricional faz com que as células tumorais flexibilizem seu metabolismo com o intuito de sustentar sua sobrevivência (RIBAS, 2016; ZHANG, 2017). Dessa forma, o metabolismo de lipídeos vem se tornando foco de interesse no estudo de câncer, já que a síntese de AG é um processo essencial para células, pois converte nutrientes em metabólitos intermediários para a biossíntese da membrana lipídica, estoque energético e moléculas de vias de sinalização (WAKIL, 2009; CURRIE, 2013; JU, 2016; RÖHRIG, 2016). Porém, os resultados apresentados para as análise da SK-HEP-1 sugeriram desvios no metabolismo de lipídeos frente à inibição do miRNA-1914-5p. Portanto,

a expressão de citrato sintase (CS) foi analisada para se investigar possíveis mecanismos desenvolvidos pelas células para obtenção de energia. CS catalisa a conversão de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato e coenzima A (CoA) (ALEKSANDROV, 2014; NELSON, 2014). A formação de citrato ocorre na membrana mitocondrial. Quando seus níveis estão muito altos, o mesmo é encontrado também no citoplasma, seguindo para o metabolismo lipídico (BERG, 2002). Os resultados estão apresentados na Figura 18.

**Figura 18:** Níveis de expressão relativa do mRNA CS em células SK-HEP-1 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mimíco e miR-1914-5p inibidor na concentração de 30nM. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde  $***p<0.0005$ ,  $**p<0.005$ ,  $*p<0.05$ .



Como pode ser observado, tanto a alta concentração quanto a inibição do miR-1914-5p diminuiu significativamente a expressão de mRNA de CS. Os resultados sugerem que a transfecção das células parece induzir um baixo metabolismo celular aeróbio e uma diminuição no nível de expressão de CS sugeriria uma baixa concentração de citrato a nível celular que poderia ser encaminhado para o metabolismo lipídico. O baixo metabolismo aeróbico em câncer já é observado e descrito, conhecido como efeito de Warburg (DEBERARDINIS et al., 2008). Esse efeito se caracteriza pela alteração nas taxas do metabolismo oxidativo de produção energética na via ciclo de Krebs, e uma maior utilização da via anaeróbica (MATOBA et al., 2006; DEBERARDINIS et al., 2008). Todavia, a concentração de CS é um indicativo de atividade mitocôndrial e sua baixa expressão pode mais uma vez sugerir desvios metabólicos causados à célula tumoral. Com essas análises

pode-se observar que há uma regulação para baixa atividade mitocondrial pela redução da expressão de CS, baixa oxidação de AG pela redução da expressão de PPAR- $\alpha$  e ATGL, porém alta síntese e armazenamento de AG pelo aumento de MLYCD, FASN e Lipina, além da alta quantidade de gotículas lipídicas identificadas.

## 5.4 Análise dos AG: quantidade, alongamento e saturação

### 5.4.1 Análise de AG por CG-MS

As análises celulares e moleculares realizadas, demonstraram alterações em todo o metabolismo lipídico das células SK-HEP-1 transfectadas. Considerando-se os resultados obtidos, observou-se aumento nos níveis protéicos e de mRNA de FASN, principalmente em células onde o miR-1914-5p foi inibido. Considerando a função dessa enzima na síntese de AG, foram realizados ensaios de esterificação de AGs para a quantificação dos mesmos, utilizando-se a metodologia de CG-MS. Os resultados dessas análises se encontram na Tabela 5. Nas células SK-HEP-1 foram encontrados os seguintes AG: ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16), ácido oleico (C18:1), ácido esteárico (C18) e ácido aracdônico (C20:4). Como esperado, podemos observar na Tabela 5, o aumento nos níveis do miR-1914-5p pela transfecção reduz a quantidade total de AG encontrado nas células SK-HEP-1 em comparação com as células SK-HEP-1 controle, enquanto a inibição do miRNA aumentou essa quantidade em 40,8%.

O ácido esteárico foi o AG mais presente em todos os grupos de células, seguido do ácido palmítico e do ácido oleico que foram encontrados em quantidade equivalentes. Por fim, encontrado em menores concentrações, temos o ácido mirístico e o ácido araquidônico.

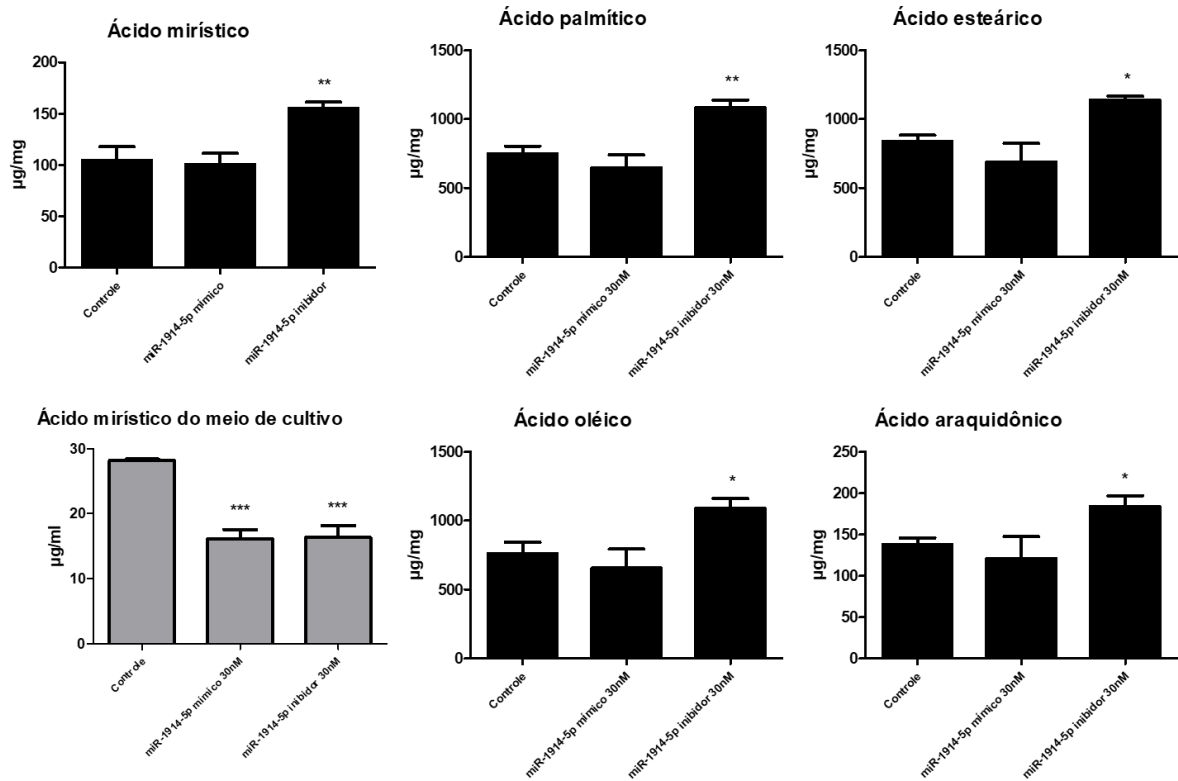
**Tabela 5:** Quantificação de AG em células SK-HEP-1 controle, transfectada com miR-1914-5p mímico e transfectada com o miR-1914-5p inibidor. Valores representados em  $\mu\text{g}$  de AG por mg de células e sua porcentagem correspondente nos AG totais.

Ácido Graxo	SkHep Controle		SkHep miR-1914-5p mímico		SkHep miR-1914-5p inibidor	
	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	(%)	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	(%)	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	(%)
Ácido Palmítico	748,2925	28,85	646,5909	29,20	1083,0137	29,65
Ácido Oléico	762,8694	29,41	656,4439	29,65	1089,4927	29,83
Ácido Esteárico	840,5339	32,40	689,4387	31,14	1140,7760	31,23
Ácido Aracdônico	137,6249	5,31	120,8870	5,46	184,0346	5,04
Ácido Mirístico	104,7435	4,04	100,7656	4,55	155,2550	4,25
Total	2594,0643	100	2214,1261	100	3652,5720	100

A análise isolada de cada AG entre os diferentes grupos de células SK-HEP-1 demonstrou que apenas as células em que o miR-1914-5p foi inibido apresentou aumento da concentração de AG. Esse aumento foi mais expressivo principalmente no ácido mirístico e no ácido palmítico. A análise do meio de cultivo após 24 horas de incubação das células transfectadas com o miR-1914-5p mímico e inibidor demonstrou redução da quantidade apenas para o ácido mirístico quando comparado ao meio das células controle, demonstrando que as células devem ter obtido esse ácido através de transporte para manter a sua sobrevivência. Apenas o dado obtidos com o ácido mirístico foi apresentado.

Em conjunto, esses resultados corrobora o anteriormente discutido, que as células SK-HEP-1 apresentam perfil metastático e possuem metabolismo de lipídeos mais flexível, podendo dessa maneira se valer dos AGs no meio de cultura. Para o ácido palmítico, as análises não apresentaram diferenças nas quantidades encontradas nos meios de cultivo, sugerindo que esse AG foi obtido através da síntese por FASN. Isso já era esperado, já que o ácido palmítico é o principal produto da ação da FASN, e os níveis dessa enzima se encontram altos nas células SK-HEP-1 transfectadas com o miR-1914-5p inibidor (CURRIE et al., 2013). Resultados representados na Figura 19.

**Figura 19:** Quantidade em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de AG em células SK-HEP-1 controle, transfectada com miR-1914-5p mímico e transfectada com o miR-1914-5p inibidor. As análises foram realizadas em triplicatas e a quantidade de AG foi obtida por CG-MS, sendo os gráficos plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ .



#### 5.4.2 Análise molecular da dessaturação e alongamento dos AG

Para melhor correlacionar a atividade funcional do miR-1914-5p na dessaturação e alongamento dos AG encontrados nas células, análises de qRT-PCR de genes envolvidos nos processos de ativação, alongamento e saturação desses AG foram realizadas. Os níveis das Acil-CoA sintetases, ACSL4 e ACSL5, enzimas que ativam os AG adicionando o acil-CoA em sua cadeia, foram analisadas. Os resultados apresentados na Figura 20 demonstraram que não houve modulação muito significativa frente a desregulação do miR-1914-5p na expressão gênica destes. O nível da proteína ACSL4 foi quantificado por análises de *Western Blot* e esse ensaio demonstrou mesmo resultado.

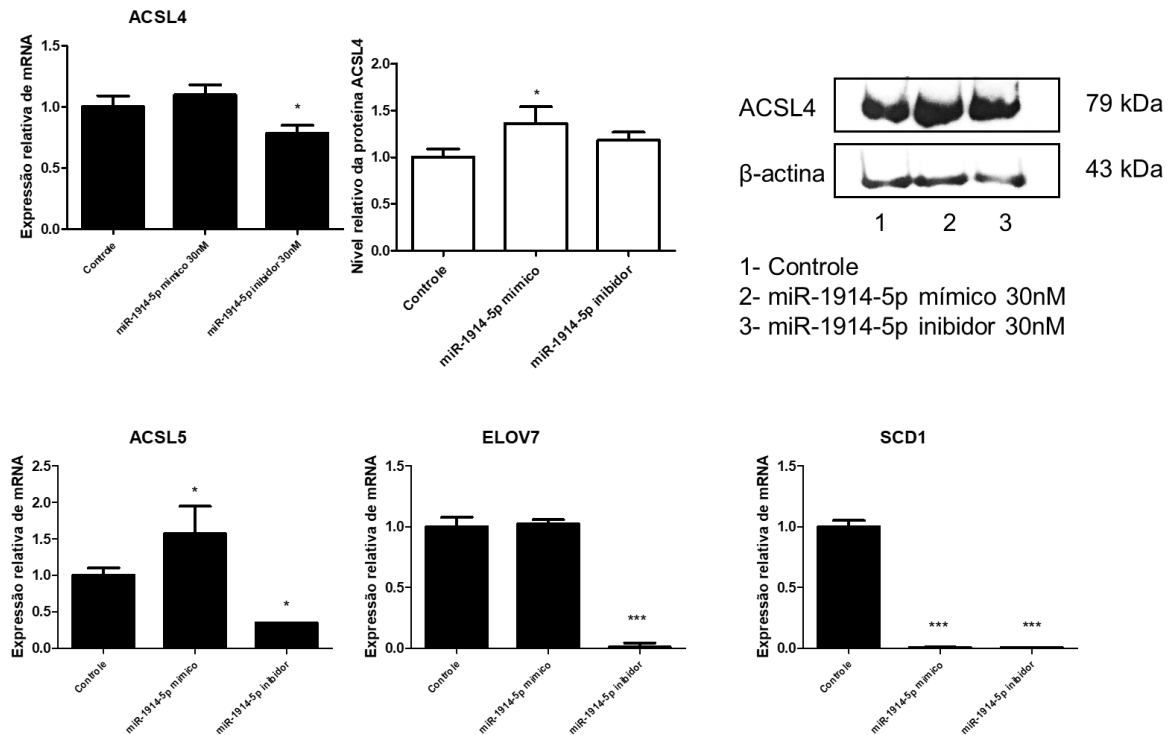
Seguindo as análises, a investigação de SCD1 se fez necessária devido a sua ação de dessaturase do ácido esteárico para o ácido oleico, os dois ácidos mais abundantes nas células SK-HEP-1. Em nossas análises o nível de expressão gênica de SCD1 apresentou uma redução significativa tanto nas células SK-HEP-1, onde há altos níveis do miR-1914-5p, quanto nas

células que tiveram o miRNA inibido. O mesmo padrão de expressão gênica foi observado na linhagem celular Hep G2, demonstrando uma ação efetiva de miR-1914-5p na regulação dessa enzima em duas células de HCC diferentes. É interessante apontar que o mRNA da SCD1 possui sítios putativos de ligação ao miR-1914-5p., o que pode facilitar mecanismos de RNAi pela interação física miRNA: mRNA. Entretanto, essa validação ainda precisa ser realizada. Por outro lado, observamos que a presença da molécula inibidora reduz consideravelmente os níveis transcricionais de SCD1, o que na SKHEP-1, pode estar correlacionado com a redução brusca nos níveis de PPAR- $\gamma$ , considerado um elemento ligante da região promotora de SCD1 (KAWAI, 2010).

Por fim, foram também analisados os níveis transcricionais da elongase de AG longos, a ELOV7. Sabe-se que em cânceres, essa enzima é superexpressa e está relacionada à sobrevivência tumoral. A qRT-PCR do gene de ELOV7 revelou uma redução acentuada em sua expressão em células SK-HEP-1 transfectadas com o miR-1914-5p inibidor, assim como observados nas células Hep G2 (Figura 11). Esse resultado reforça a idéia de uma possível aplicação biotecnológica do miR-1914-5p no metabolismo de patogenias hepáticas.



**Figura 20:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs ACSL4, ACSL5, SCD1 e ELOV7 e nível relativo da proteína ACSL4 em células SK-HEP-1 não transfectadas e transfectadas com miR-1914-5p mímico e miR-1914-5p inibidor na concentração de 30nM. As análises foram realizadas em triplicatas, as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real e os níveis de proteína foram mensurados por *Western blot*. Os gráficos foram plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



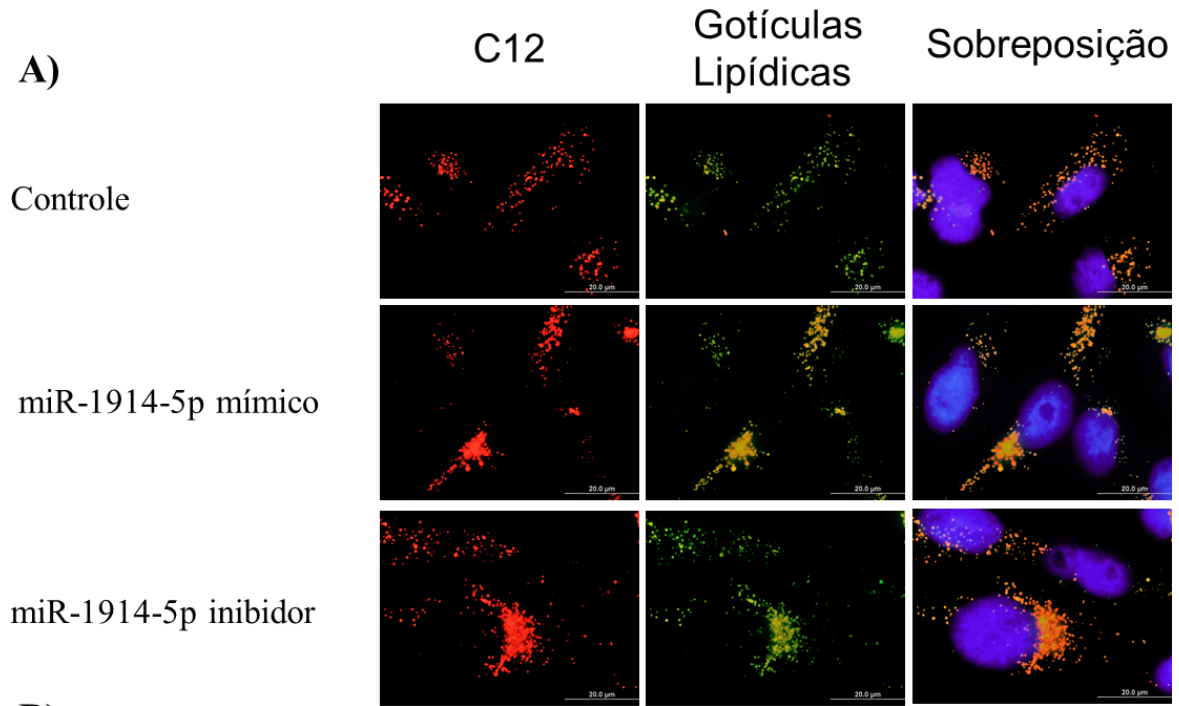
## 5.5 Análises da oxidação de AG

Para as análises de oxidação dos AG nas células SK-HEP-1, ensaios de microscopia de fluorescência que se baseiam em mensuração de lipídeos gastos e incorporados foram realizados. Os resultados dessas análises podem ser observados na Figura 21.

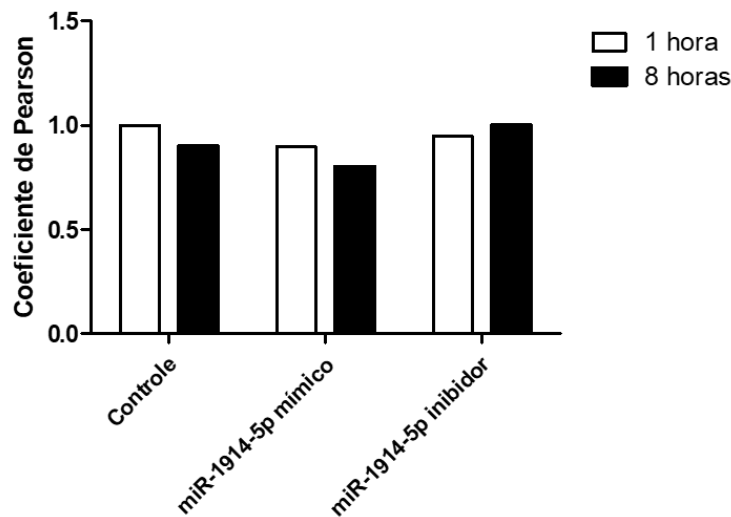
Em nossos ensaios, a transfecção de moléculas mimetizadoras ou inibidoras do miR-1914-5p não alteraram o perfil das gotículas lipídica, quando da comparação com o perfil de gotículas apresentados nas células controle. Nas células transfectadas, a localização do vermelho C12, um análogo de ácido graxo saturado de cadeia de 12 carbonos, estava quase completamente sobreposta ao verde das gotículas de lipídeos. Como já discutido, nas células Hep G2, esse fenômeno é observado em células onde há escassez nutritiva e essa observação em nossos ensaios sugere o bloqueio dessa via como já hipotetizado. Análises utilizando o Etomoxir (Merck) na concentração de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  foram realizadas e observado foi o

mesmo, co-localização do vermelho C12 e das gotículas lipídicas verdes. Podemos então sugerir novamente que o miR-1914-5p tanto em células Hep G2 quanto em células SK-HEP-1 bloqueia a obtenção de ATP através da via de oxidação de AG quando em altas concentrações. No entanto a inibição desse miRNA em células SK-HEP-1 parece causar o mesmo fenômeno, no entanto outras vias de obtenção energética analisadas nesse estudo também parecem estar comprometidas. Dessa forma, a inibição do miR-1914-5p em células SK-HEP-1 parece causar algum estresse à mitocôndria.

**Figura 21:** A) Microscopia de fluorescências de células SK-HEP-1 controle e transfectadas com o miR-1914-5p mímico ou inibidor na concentração de 40nM e coradas com BODIPY™ 558/568 C12 (lipídeo C12 em vermelho), BODIPY™ 493/503 (gotículas lipídicas em verde) e as imagens sobreposta junto a coloração DAPI (núcleo em azul) citoesqueleto em vermelho. B) Quantificação da sobreposição do C12 com as gotículas lipídicas pelo coeficiente de Pearson. Os gráficos foram plotados utilizando-se o software Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .



**B)**  
Sobreposição de C12 com gotículas lipídicas

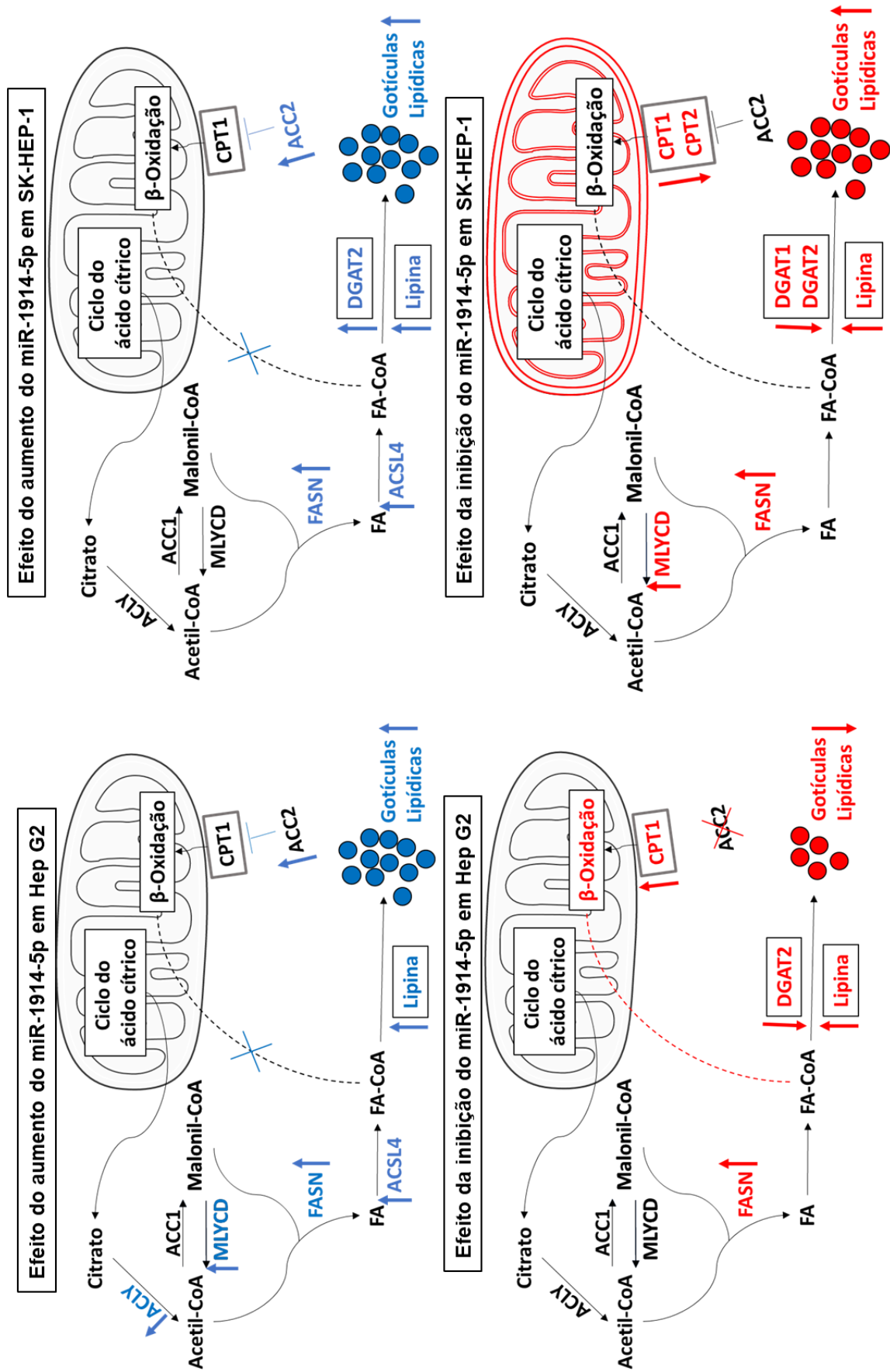


## 6. CONCLUSÕES

Nas células Hep G2, células de HCC humano, o miR-1914-5p causou desregulação de MLYCD, aumentando seu nível proteico. Em consequência desse aumento os níveis de FASN subiram, provavelmente devido à maiores quantidades de acetil-CoA disponíveis para a síntese de lipídeos. Com isso as quantidades de AG na célula aumentaram e devido ao aumento drástico da expressão de ACC2 e a não oxidação de AG C12 pode-se sugerir que a  $\beta$ -oxidação esteja bloqueada, levando à célula a acumular lipídeos. Esse acúmulo é justificado pelo aumento de Lipina 1 e das gotículas lipídicas citoplasmáticas. Além disso, a alta concentração de Lipina 1 pode estar regulando o fator de transcrição SREBP-1c que, por sua vez, irá desregular novamente os níveis de MLYCD e FASN. Por outro lado, perante a inibição do miR-1914-5p em células Hep G2, não se observam alterações nos níveis de MLYCD, mas níveis da proteína FASN são encontrados em altas quantidades, favorecendo a síntese de altas concentrações de AG. Porém não há acúmulo de lipídeos nesse caso, mesmo com a alta expressão de Lipina 1, os níveis de PPAR- $\gamma$ , CPT1 e CPT2 nessa célula estavam altos. Ainda os níveis de expressão ACC2 extremamente baixos e a oxidação de AG C12 sugerem que diferente do efeito de acúmulo de lipídeos do aumento do miR-1914-5p, a inibição causa oxidação dos AG produzidos pela FASN.

Em células SK-HEP-1, células de adenocarcinoma hepático humano, o aumento do miR-1914-5p pareceu modular de maneira semelhante a observada em Hep G2, porém de forma mais sutil já que essa célula apresenta metabolismo mais plástico. A principal diferença é a modulação sutil da expressão de MLYCD e FASN, o que por consequência não alterou as quantidades de ácido graxo produzidos nessa célula. Porém, as análises nos levam a inferir que há uma possibilidade de bloqueio da oxidação de AG pelo miR-1914-5p nessas células, considerando o acúmulo de gotículas de lipídeos, aumento da expressão de ACC2 e a não oxidação de AG C12. Já em células SK-HEP-1 onde houve a inibição do miR-1914-5p, os resultados sugerem que o miR-1914-5p causou um estresse metabólico. Os níveis de expressão de CS, ATGL e CPT2 estavam sendo regulados negativamente, podendo estar bloqueando duas das principais vias de obtenção de ATP da célula. Além disso, o acúmulo alto de lipídeos, através das gotículas lipídicas de grande tamanho e produção de AG por FASN para armazenamento, sugerem um possível ambiente lipotóxico para a célula. A Figura 22 apresenta essas informações lado a lado em forma de esquema, com as vias de atuação elucidadas. Dessa forma, o miR-1914-5p se mostrou um importante regulador do metabolismo de lipídeos.

**Figura 22:** Esquema do efeito da transfecção do miRNA miR-1914-5p mímico ou inibidor sobre o metabolismo de lipídio nas células Hep G2 e SK-HEP-1.



## 8 REFERÊNCIAS

- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.
- BOROUGHES, L. K.; DEBERARDINIS, R. J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 351, 2015.
- BOUZAKRI, K. et al. Malonyl CoenzymeA decarboxylase regulates lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1508-1516, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CAI, Y. et al. Loss of chromosome 8p governs tumor progression and drug response by altering lipid metabolism. **Cancer Cell**, v. 29, n. 5, p. 751-766, 2016.
- CALVISI, D. F. et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 1071-1083. e5, 2011.
- CAO, Y et al. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11280-11285, 2000.
- CARRILLO, F. J. et al. Brazilian society of hepatology recommendations for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, p. 2-14, 2015.
- CHOI, Y. et al. Increased hepatic Fatty Acid uptake and esterification contribute to tetracycline-induced steatosis in mice. **Toxicological Sciences**, v. 145, n. 2, p. 273-282, 2015.
- CROOKE, Stanley T. et al. RNA-targeted therapeutics. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 714-739, 2018.
- CURRIE, E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153-161, 2013.
- DA SILVA, B. O. et al. Altered global microRNA expression in hepatic stellate cells LX-2 by angiotensin-(1-7) and miRNA-1914-5p identification as regulator of pro-fibrogenic elements and lipid metabolism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 98, p. 137-155, 2018.
- DE JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.
- DE MARTEL, C. et al. World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 62, n. 4, p. 1190-1200, 2015.

DEBERARDINIS, R. J. et al. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 18, n. 1, p. 54-61, 2008.

DIAS, N.; STEIN, C. A. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 5, p. 347-355, 2002.

DOLL, S. et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 91, 2017.

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1264-1273. e1, 2012.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-2576, 2007.

FAHY, E. et al. Update of the LIPID MAPS Comprehensive Classification System for Lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 50.Suppl, p. S9-S14. 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806, 1998.

FUTREAL, P. A. et al. A census of human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 3, p. 177-183, 2004.

GEBERT, L. F. R. et al. Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 609-621, 2013.

GOLDBERG, E; L.; DIXIT, V. D. Carnitine acetyltransferase (CRAT) expression in macrophages is dispensable for nutrient stress sensing and inflammation. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 219-225, 2017.

HALL, J. E. **Guyton E Hall Tratado De Fisiologia Médica**. Elsevier Brasil, 2017.

HASHEMI, H. F.; GOODMAN, J. M. The life cycle of lipid droplets. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p. 119-124, 2015.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125-1131, 2002.

HU, J. et al. The Plasma microRNA miR-1914\* and-1915 Suppresses Chemoresistant in Colorectal Cancer Patients by Down-regulating NFIX. **Current Molecular Medicine**, v. 16, n. 1, p. 70-82, 2016.

- JANANI, C.; KUMARI, BD Ranjitha. PPAR gamma gene—a review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2015.
- JANSSEN, Harry LA et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 18, p. 1685-1694, 2013.
- JIN, H. Y. et al. Transfection of microRNA mimics should be used with caution. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 340, 2015.
- JOPLING, C. L. et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1577-1581, 2005.
- JORDE, L. B. et al. **Genética Médica**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 406p.
- JU, H. L.; RO, S. W. Making cancer fat: reprogramming of lipid metabolism by CD147 in hepatocellular carcinoma. **Chinese Journal of Cancer Research**, 2016.
- KASTANIOTIS, A. J. et al. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 1, p. 39-48, 2017.
- KATSIKI, N.; MIKHAILIDIS, D. P.; MANTZOROS, C. S. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. **Metabolism**, 2016.
- KAWAI, M.; ROSEN, C. J. PPAR $\gamma$ : a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, n. 11, p. 629, 2010.
- KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 126, 2009.
- KUWATA, H.; HARA, S. Inhibition of long-chain acyl-CoA synthetase 4 facilitates production of 5, 11-dihydroxyeicosatetraenoic acid via the cyclooxygenase-2 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 3, p. 528-33, 2015.
- LASAR, D. et al. Peroxisome proliferator activated receptor gamma controls mature brown adipocyte inducibility through glycerol kinase. **Cell Reports**, v. 22, n. 3, p. 760-773, 2018.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.
- LEE, S. et al. Dysregulated signaling hubs of liver lipid metabolism reveal hepatocellular carcinoma pathogenesis. **Nucleic Acids Research**, p. gkw462, 2016.
- LI, F. Q. et al. Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 739-47, 2015.



LI, H, et al. Zhiheshouwu ethanol extract induces intrinsic apoptosis and reduces unsaturated fatty acids via SREBP1 pathway in hepatocellular carcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

LING, H.; FABBRI, M.; CALIN, G. A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 11, p. 847, 2013.

MARIEN, E. et al. Phospholipid profiling identifies acyl chain elongation as a ubiquitous trait and potential target for the treatment of lung squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p. 12582, 2016.

MASHEK, D. G. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 6, p. 697-710, 2013.

MATSUI, M.; PRAKASH, T. P.; COREY, D. R. Argonaute 2-dependent regulation of gene expression by single-stranded miRNA mimics. **Molecular Therapy**, 2016.

MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p.1650-1653, 2006.

MCMANUS, M. T. et al. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. **RNA**, v. 8, n. 6, p. 842-850, 2002.

NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 53, p. 124-144, 2014.

NATH, A. et al. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14752, 2015.

NELSON, D. L.; COX M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1300p.

OLIVIERI, F. et al. Circulating miRNAs and miRNA shuttles as biomarkers: perspective trajectories of healthy and unhealthy aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 165, p. 162-170, 2017.

PASCUAL, G. et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Nature**, v. 541, n. 7635, p. 41-45, 2017.

PEREIRA, D. M. et al. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 282-289, 2013.

POLINATI, P. P.; VALANNE, L.; TYNI, T. Malonyl-CoA decarboxylase deficiency: long-term follow-up of a patient new clinical features and novel mutations. **Brain and Development**, v. 37, n. 1, p. 107-113, 2015.

RAJKUMAR, A. et al. ACSL5 genotype influence on fatty acid metabolism: a cellular, tissue, and whole-body study. **Metabolism**, v. 83, p. 271-279, 2018.

RAMBOLD, A. S.; COHEN, S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. **Developmental Cell**, v. 32, n. 6, p. 678-692, 2015.

REUE, K.; ZHANG, P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 90-96, 2008.

RIBAS, V.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 22, 2016.

RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 732, 2016.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 203, 2017.

SAMBROOK, J.; GREEN, M.R. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 4ed. Cold Spring Harbor Press, New York, p. 2028, 2012.

SANTARIUS, T. et al. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 59-64, 2010.

SEBASTIANI, G. et al. Circulating microRNA (miRNA) expression profiling in plasma of patients with gestational diabetes mellitus reveals upregulation of miRNA miR-330-3p. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 345, 2017.

SETHI, G.; SHANMUGAM, M. K.; KUMAR, A. P. SREBP-1c as a molecular bridge between lipogenesis and cell cycle progression of clear cell renal carcinoma. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 6, p. BSR20171270, 2017

SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 9, p. 542-552, 2013.

TAMURA, K. et al. Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. **Cancer Research**, v. 69, n. 20, p. 8133-8140, 2009.

TATENO, D. A. et al. Carcinoma hepatocelular não invasivo e quimioembolização: relato de caso e revisão da literatura. 2015.

THAKRAL, S.; GHOSHAL, K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. **Current Gene Therapy**, v. 15, n. 2, p. 142-150, 2015.

TIRINATO, L. et al. An overview of lipid droplets in cancer and cancer stem cells. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; DAVID, C.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. The race of 10 synthetic RNAi-based drugs to the pharmaceutical market. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 7, p. 1339-1363, 2017.

VAN ROOIJ, E. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 575-579, 2007.

VODOVOTZ, Y. et al. “Thinking” vs. “Talking”: Differential Autocrine Inflammatory Networks in Isolated Primary Hepatic Stellate Cells and Hepatocytes under Hypoxic Stress. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1104, 2017.

WAKIL, S. J.; ABU-ELHEIGA, L. A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S138-S143, 2009.

WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis and the microenvironment: fertile soil for hepatocellular carcinoma development. **Gene expression**, v. 16, n. 2, p. 77-84, 2014.

WELTE, M. A. Expanding roles for lipid droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. R470-R481, 2015.

WIGGINS, H.; RAPPOPORT, J. An agarose spot assay for chemotactic invasion. **Biotechniques**, v. 48, n. 2, p. 120-123, 2010.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-862, 1993.

WHO – World Health Organization. Encontrado em: <http://www.who.int/en/>

WU, J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 2015.

WU, X. et al. ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44849, 2015.

YIZHAK, K. et al. Phenotype-based cell-specific metabolic modeling reveals metabolic liabilities of cancer. **Elife**, v. 3, p. e03641, 2014.

ZAYTSEVA, Y. Y. et al. Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via upregulation of cellular respiration. **Oncotarget**, v. 6, n. 22, p. 18891, 2015.

ZHANG, H. et al. MicroRNA-449 suppresses proliferation of hepatoma cell lines through blockade lipid metabolic pathway related to SIRT1. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 5, p. 2143-2152, 2014.

ZHANG, H. et al. Effect of Creosote Bush-Derived NDGA on Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism in Liver of High-Fructose Fed Rats: Relevance to NDGA Amelioration of Hypertriglyceridemia and Hepatic Steatosis. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0138203, 2015.

ZHANG, J.; PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 10, p. 1302-1315, 2017.

ZHAO, W. et al. Candidate anti-metastasis drugs suppress the metastatic capacity of breast cancer cells by reducing membrane fluidity. **Cancer Research**, p. canres. 1970.2015, 2016.