

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2021.

**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.^a Dr.^a 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^ª Dr^ª 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 auxiliarão 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 a 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 β -oxidação caracterizado pela ausência de gotículas lipídicas e alta expressão de Acetil-CoA Carboxilase β . 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 β -oxidation pathway characterized by the absence of lipid droplets and high expression of Acetyl-CoA Carboxylase β . 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 α
- ACC2 – Acetil-CoA carboxilase β
- 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- α – Receptor ativador proliferador de peroxissomo α
- PPAR- γ – Receptor ativador proliferador de peroxissomo γ
- 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

1 INTRODUÇÃO.....	12
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
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivos gerais.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
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
CAPÍTULO 1: HEPG2 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
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 β -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
CAPÍTULO 1: SK-HEP-1 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
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 β -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
6 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS.....	68

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 β 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).

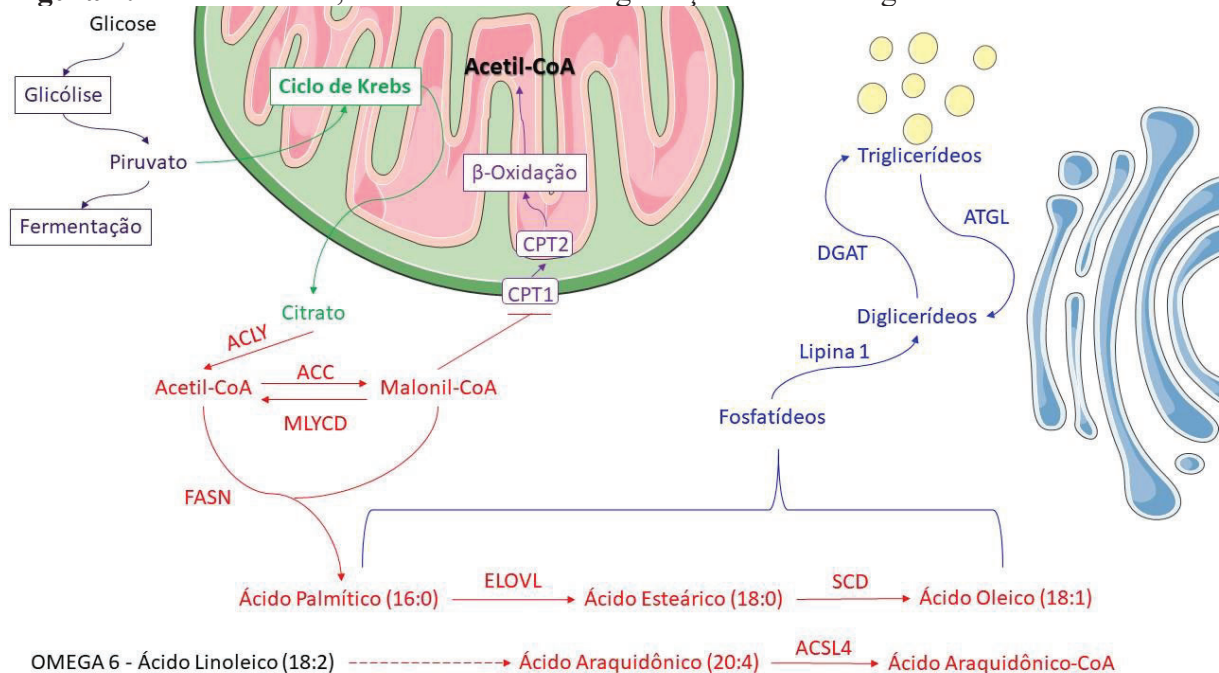
O carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma (HCC) é o tipo de câncer de fígado primário mais frequente, entre 85%-90% dos casos, (EL-SERAG, 2007). É caracterizado por alta e heterogênea distribuição geográfica (EL-SERAG, 2012; FERLAY, J. et al., 2015;

TATENO et al., 2015). Em 2014, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO, World Healthy 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 β -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 β -oxidação, outras duas enzimas são essenciais na coordenação do metabolismo dos AG: a acetil-CoA carboxilase α (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 β (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.

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).

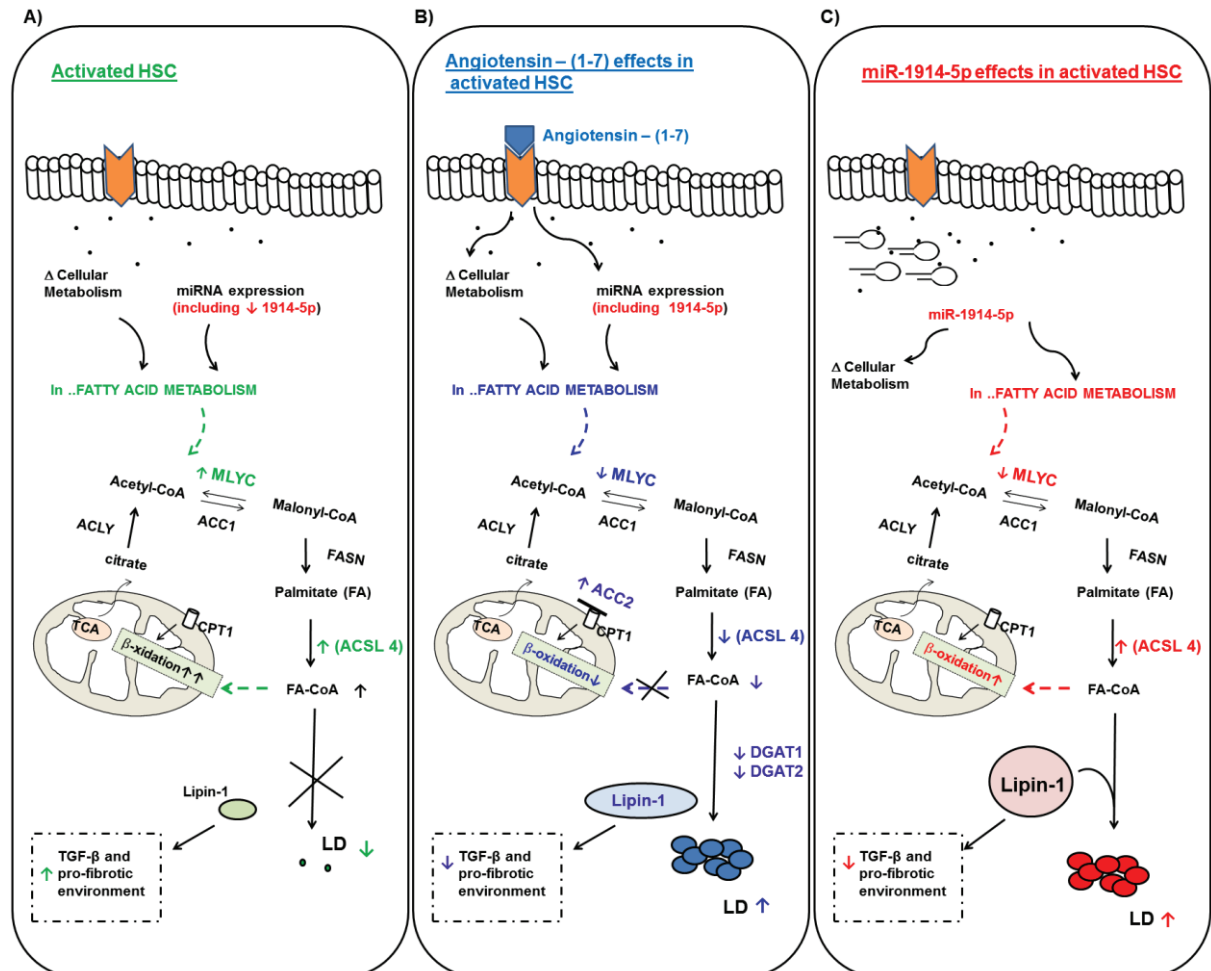
Dentre os avanços em terapias com miRNA em HCC temos tecnologias como os oligonucleotídeos antisense (ASOs), que são ácidos nucleicos modificados e estáveis que agem de maneira a formar um complexo RNA-ASO que permite a ação de RNAses no RNA alvo (Dias, 2002; CROOKE et al., 2018). Existem ASOs modificados 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

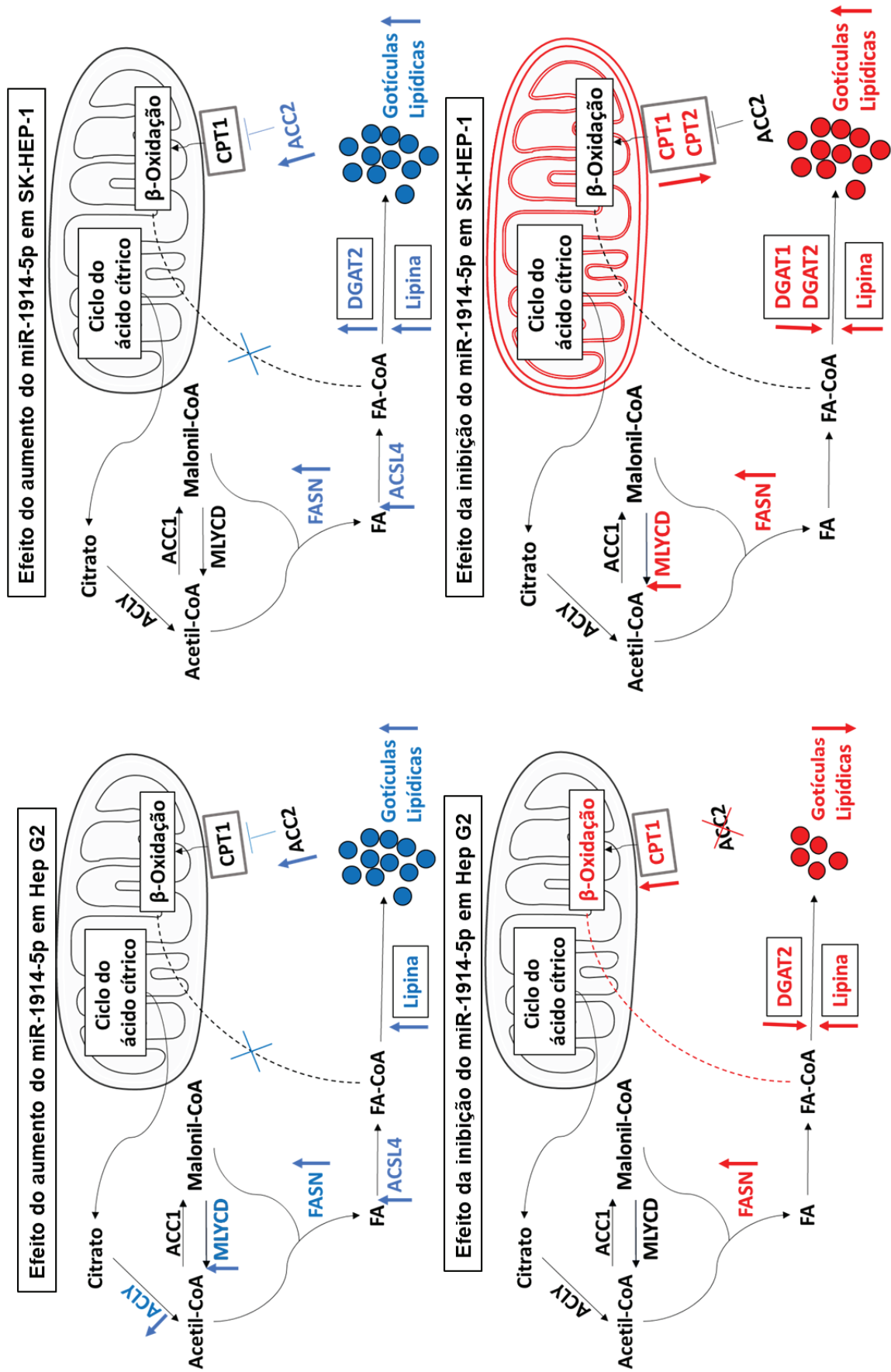
avaliou os efeitos moleculares e celulares do miR-1914-5p em culturas celulares hepáticas tumorais, no que tange o seu papel no metabolismo de lipídeos, visando uma caracterização de elementos centrais do controle da progressão tumoral pela caracterização de um alvo molecular a ser utilizado como biomarcador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

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 β -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- γ , 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. Miravirsin (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^a 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 γ : 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^a 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.