

---

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

---

**LETÍCIA FERREIRA RAMOS**

**ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRORNA-769-3P NO  
PROCESSO FIBROSANTE HEPÁTICO E SUA  
CORRELAÇÃO COM ELEMENTOS PRÓ-  
INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS ESTRELADAS  
HUMANAS.**

LETÍCIA FERREIRA RAMOS

ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRORNA-769-3P NO PROCESSO  
FIBROSANTE HEPÁTICO E SUA CORRELAÇÃO COM ELEMENTOS  
PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS ESTRELADAS HUMANAS.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de  
Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e  
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2017

574.88 Ramos, Letícia Ferreira  
R175a      Análise funcional do microRNA-769-3p no processo  
fibrosante hepático e sua correlação com elementos  
pró-inflamatórios em células estreladas humanas / Letícia  
Ferreira Ramos. - Rio Claro, 2017  
65 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e  
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual  
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Biologia molecular. 2. Fibrose hepática. 3. Processo  
pró-inflamatório. 4. Células LX-2. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Mirian e José Augusto e ao meu irmão, Lucas, por todo o amor, incentivo e apoio incondicional que me deram durante a minha formação, não medindo esforços para que eu completasse essa etapa.

Ao meu namorado, Jonathan William, por estar sempre ao meu lado, como melhor amigo e confidente, pela compreensão nos diversos momentos de estudo e afazeres, pela motivação nos momentos necessários e pelo compartilhamento de amor e alegrias.

À professora Dr<sup>a</sup> Karen, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de crescimento e amadurecimento profissional, pela demonstração de dedicação e competência a qual realiza seu trabalho, pelos ensinamentos proporcionados e pelas broncas e risadas dadas nos momentos certos.

À todos os meus amigos do laboratório, Andréa, Kelvin, Letícia Scarinci, Juliana, Lara, Ana Paula, Marina e Caio, pelas experiências e risadas compartilhadas. Agradeço em especial à Brenda e à Letícia Rocha, pela paciência, boa vontade em sempre ajudar, pelo conhecimento compartilhado, pelas mantas e pela amizade nesses anos de convivência. À Priscila, que apesar do pouco tempo de convivência, já compartilhou comigo encrencas, risadas, noites de pizza e pelo compartilhamento no estilo de vida, muito obrigada.

Obrigada às amigas que sempre estiveram presentes ao decorrer do curso, Maria Paula (Fantine), Camila, Lídia e Louise; agradeço pelos longos trabalhos realizados em grupo que aconteciam de forma leve, pelas saídas durante e ao final dos semestres, pelas noites de cachorro quente, pizza, brigadeiro e jogos, pela convivência diária, pelas conversas e compreensões e por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis e felizes.

Agradeço à todos do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à professora Dr<sup>a</sup> Márcia Regina e seus alunos, pela convivência diária no laboratório e pela troca de conhecimentos e à professora Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marin Morales por disponibilizar equipamentos para a realização de alguns ensaios.

À FAPESP (Processo 2013/21186-5) e ao CNPq (Processos 136384/2015-3 e 117218/2016-2) pelo apoio financeiro proporcionado que possibilitou a conclusão deste trabalho.

Por fim, agradeço à todos que, de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho e na minha construção profissional e pessoal.

*“Mantenha seus pensamentos positivos, porque  
seus pensamentos tornam-se suas palavras.  
Mantenha suas palavras positivas, porque  
suas palavras tornam-se suas atitudes.  
Mantenha suas atitudes positivas, porque  
suas atitudes tornam-se seus hábitos.  
Mantenha seus hábitos positivos, porque  
seus hábitos tornam-se seus valores.  
Mantenha seus valores positivos, porque  
seus valores... Tornam-se seu destino.”*

(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

O fígado desempenha várias funções na homeostase celular, mas infelizmente o número de pessoas acometidas por doenças hepáticas é alto, caracterizando-as como um grave problema de saúde pública. Uma característica presente nessas doenças hepáticas é a fibrose, que se caracteriza como uma resposta de cicatrização a lesões acometidas pelo tecido, acarretando no acúmulo de componentes da matriz extracelular. Caso a lesão seja contínua, mecanismos pró-inflamatórios se estabelecem comprometendo as funções do órgão. As células responsáveis pela síntese dos elementos da matriz extracelular são as células estreladas hepáticas, as quais, armazenam gotículas lipídicas ricas em vitamina A nos fígados normais. Em fígados fibrosados, a célula perde sua conformação estrelada e as gotículas lipídicas. No geral a resposta inflamatória é característica das injúrias hepáticas, e os estímulos pró-inflamatórios são decorrentes do metabolismo do ácido araquidônico, na via de síntese de prostaglandinas, mediada pela atuação das proteínas ciclooxygenases. Estudos recentes apontam uma conexão entre a proteína ciclooxygenase 2 e as enzimas formadoras de gotículas lipídicas (Acil-CoA sintetases). Paralelamente, terapias eficazes contra a fibrose ainda são elusivas e a caracterização de novas moléculas que subsidiem o desenvolvimento de terapias alternativas é objetivado e microRNAs se destacam. Dentro desse contexto, o estudo com o microRNA-769-3p possibilitou uma análise funcional de sua correlação nas vias de metabolismo lipídico e processo pró-inflamatório. Para o desenvolvimento deste trabalho, células estreladas hepáticas de linhagem LX-2 foram cultivadas para a realização de análise das gotículas lipídicas através de *Oil Red O*, para análises de expressão gênica por RT-PCR e qRT-PCR e análises de imunofluorescência e ELISA para a identificação de algumas proteínas importantes no processo fibrosante hepático. As células transfectadas com o mímico e inibidor do microRNA-769-3p demonstraram um reaparecimento das gotículas lipídicas, sendo este, significativo nas células transfectadas com o inibidor do microRNA-769-3p, sugerindo um ambiente celular desfavorável. Além disso, a inibição do microRNA-769-3p ocasiona um aumento significativo em diversas enzimas importantes no metabolismo lipídico e em citrato sintase, indicando um aumento metabólico celular principalmente na via mitocondrial oxidativa e na formação das gotículas lipídicas. Apesar de não demonstrar regulação em vias relacionadas com a reversão do processo fibrosante hepático, a inibição do microRNA-769-3p apresentou resultados interessantes indicando o seu papel importante no impedimento de um quadro pró-inflamatório mais elevado.

Palavras-chave: fibrose hepática; processo pró-inflamatório; células LX-2.

## ABSTRACT

The liver plays several roles in cellular homeostasis, but, unfortunately, high number of people are accomited by hepatic problems, characterizing them as a serious public health problem. One ordinary characteristic of such pathologies is fibrosis, which is stablished due to the intense healing response to the damaged tissue resulting in the accumulation of extracellular matrix components. If the lesion is continuous, pro-inflammatory mechanisms are established compromising the organ functions. In the liver, the cells responsible for the synthesis of extracellular matrix elements are the hepatic stellate cells. In health liver, such cells store vitamin A in lipid droplets. In pro-fibrotic livers, the cell loses its star-shaped conformation and the lipid droplets. In general, the inflammatory response is characteristic of liver injury, and pro-inflammatory stimuli are the result of arachidonic acid metabolism in the prostaglandin synthesis pathway, mediated by the action of cyclooxygenase proteins. Recent studies point to a connection between cyclooxygenase 2 protein and lipid droplet forming enzymes (acyl-CoA synthetases). In parallel, effective therapies against fibrosis are still elusive and the characterization of new molecules that support the development of alternative therapies is aimed. In this context, microRNAs comes as a promising molecule. In this study the microRNA-769-3p was functionally investigated focusing in its metabolic correlation with the lipid metabolism and pro-inflammatory processes. For the development of this work, LX-2 lineage liver cells were cultured for the analysis of lipid droplets by *Oil Red O*, for analysis of gene expression by RT-PCR and qRT-PCR, and immunofluorescence and ELISA analyzes for the identification of some important proteins in the fibrogenic process. Cellular transfection with either miRNA-769-3p mimic or inhibitor change their metabolism and conduce to the reappearance of lipid droplets. A more pronounced number of lipid droplets were observed in the microRNA-769-3p inhibitor transfected cells, suggesting an unfavorable cellular environment. In addition, inhibition of microRNA-769-3p causes a significant increase in several important enzymes in lipid metabolism and citrate synthase, suggesting high level of cellular metabolism mainly in the oxidative mitochondrial pathway and in the formation of lipid droplets. Although it did not demonstrate regulation in pathways related to the reversal of the hepatic fibrosing process, inhibition of microRNA-769-3p presented interesting results indicating its important role in preventing a higher proinflammatory environment.

Keywords: hepatic fibrosis; pro-inflammatory process; LX-2 cells.

## SUMÁRIO

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                | 7  |
| 1.1. O processo fibrosante hepático: um painel geral                                                | 7  |
| 1.2. O metabolismo lipídico e a sua correlação com o processo pró-inflamatório                      | 13 |
| 1.3. Os microRNAs e sua atuação na fibrose hepática                                                 | 16 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                 | 19 |
| 2.1. Objetivos gerais                                                                               | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos                                                                          | 19 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                        | 19 |
| 3.1. Cultura de células e transfecção celular                                                       | 19 |
| 3.2. Análises morfológicas: a microscopia de campo claro e as análises das gotículas de lipídeos    | 21 |
| 3.3. Análises morfológicas: imunofluorescência e as análises de ACSL4 e COX-2                       | 22 |
| 3.4. Análise molecular: extração de RNA e mensuração da expressão gênica                            | 22 |
| 3.5. Mensurações de TGF $\beta$ -1 em ELISA                                                         | 26 |
| 3.6. Análises estatísticas                                                                          | 27 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                    | 27 |
| 4.1. Análises preliminares com o miRNA                                                              | 27 |
| 4.2. Análise de gotículas lipídicas pelo ensaio de Oil Red O                                        | 28 |
| 4.3. Análise de expressão gênica em reações de polimerase em cadeia                                 | 30 |
| 4.3.1. Análises moleculares de genes marcadores moleculares de fibrose hepática                     | 30 |
| 4.3.2. Análises moleculares de genes correlatos ao processo de estresse oxidativo                   | 34 |
| 4.3.3. Análise da expressão de genes correlatos ao processo apoptótico                              | 36 |
| 4.3.4. Análise da expressão de genes correlatos ao processo pró-inflamatório                        | 39 |
| 4.3.5. Análise da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos                          | 42 |
| 4.3.6. Análise da expressão de genes correlatos ao ciclo celular e à transição epitélio-mesenquimal | 49 |



|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| 4.4. Imunofluorescência de ACSL4 e COX-2..... | 50 |
| 4.5. Mensuração de TGFβ-1 em ELISA .....      | 53 |
| 5. <b>CONCLUSÃO</b> .....                     | 53 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....       | 55 |

## 1. INTRODUÇÃO

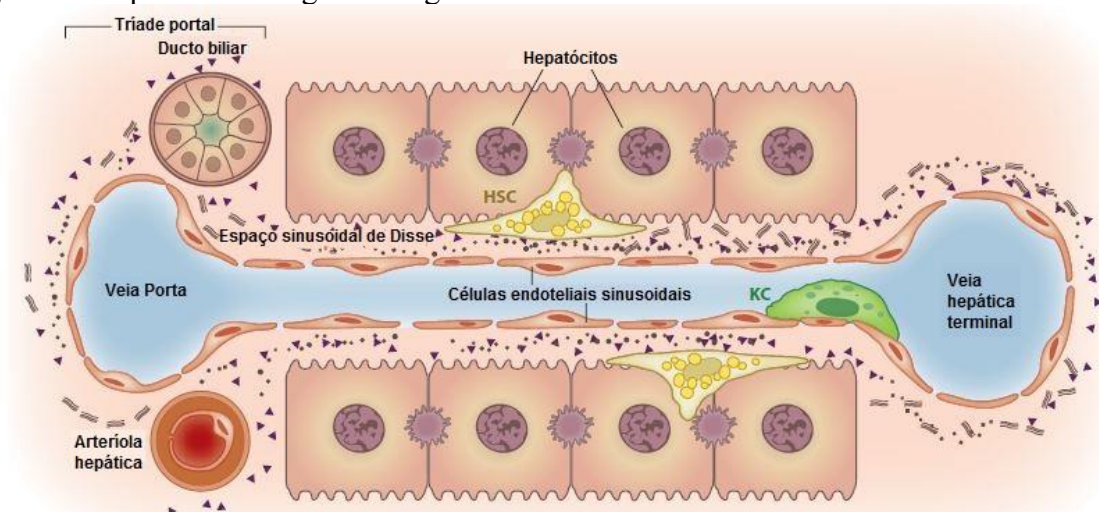
### 1.1. O processo fibrosante hepático: um painel geral

O fígado, considerado a maior glândula e o segundo maior órgão do nosso organismo, possui uma arquitetura em lóbulos hexagonais, que permite o desempenho de muitas funções importantes no equilíbrio celular e na homeostase do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RUI, 2014; TARASENKO; MCGUIRE, 2017). Dentre as funções metabólicas mais importantes estão a metabolização de carboidratos, aminoácidos e gorduras, a oxidação de ácidos graxos, a ureagênese e desintoxicação de resíduos endógenos e xenobióticos. Além disso, por receber 30% do volume sanguíneo total por minuto, o fígado também pode atuar como imunovigilante, sendo também conhecido pela produção de proteínas de fase aguda em respostas inflamatórias (TARASENKO; MCGUIRE, 2017). Infelizmente, é crescente o número de pessoas acometidas pelos problemas hepáticos, como é possível observar nos dados da Organização Mundial da Saúde (2015) em que a cirrose e o câncer de fígado subiram de colocação nas causas de morte mundiais entre os anos de 2000 a 2015 (de 13º para 11º e de 20º para 16º, respectivamente). Dessa forma, esses problemas hepáticos acarretam alta morbidade e mortalidade, caracterizando-se como grave problema de saúde pública. As doenças hepáticas e entre elas as hepatites, esteatoses, cirrose e hepatocarcinoma podem ser decorrentes de injúrias provenientes de vírus, álcool, alimentação, desordens metabólicas, parasitas e toxicidade por drogas, entre outros agentes químicos e biológicos que podem levar à progressão de fibrose (PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013; LI; OU-YANG; HAN, 2014; ZHAO et al., 2014; GAO; BATALLER, 2015; WALLACE; MANN; FRIEDMAN, 2015). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que em países de renda média-baixa e média-alta a cirrose e o câncer hepático aparecem como 9ª causa de morte (WHO, 2015).

Nas condições patológicas, uma característica marcante é a fibrose que acomete o organismo. A fibrose hepática é uma resposta à inflamação crônica e lesão hepática e se caracteriza como uma resposta de cicatrização a injúrias acometidas pelo tecido hepático, que acarreta no acúmulo de componentes da matriz extracelular (MEC). Quando a injúria do tecido hepático é transitória há a possibilidade de restauração do mesmo, voltando o fígado à sua condição normal. No entanto, se a injúria for contínua, a inflamação crônica persistirá e ocorrerá uma substituição do parênquima do fígado por tecido cicatricial, o que acarretaria no comprometimento de suas funções (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013; SEKI; BRENNER, 2015; HOROWITZ et al., 2017).

Considerando-se os elementos da MEC, estes se caracterizam como um conjunto de macromoléculas estruturais como colágenos, não-colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos, fatores de crescimento ligados à matriz e glicosaminoglicanos (SCHIFF; MADDREY; SORRELL, 2012). Em um fígado normal, a matriz extracelular é dinâmica possuindo um equilíbrio entre sua síntese e degradação, contudo, durante a injúria hepática esse equilíbrio é quebrado e a síntese de matriz extracelular se sobressai desenvolvendo-se na fibrose hepática (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). Particularmente, o fígado é constituído pelos hepatócitos (células epiteliais, que constituem 80% do volume do órgão), pelas células endoteliais e pelas células não-parenquimatosas associadas ao fígado que incluem as células de *Kupffer* (KC), células dendríticas e células estreladas hepáticas (HSC) (Figura 1) (SENOO et al., 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). No processo fibrogênico, as células estreladas hepáticas (hepatic stellate cell - HSC) são caracterizadas como efetoras e responsáveis pela síntese acentuada de elementos da MEC (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; WALLACE; FRIEDMAN, 2014; LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015). Além disso, essas células apresentam um metabolismo lipídico dinâmico, participando do armazenamento de gotículas de lipídeos na forma de vitamina A (aproximadamente 50% a 80% do total corporal) e também de seu transporte. Nas células 95% da vitamina A se apresenta como éster de retinil, sendo que de 30% a 50% estão envoltas nas gotículas lipídicas (SENOO et al., 2013; LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015; SEKI; BRENNER, 2015; SENOO; MEZAKI; FUJIWARA, 2017). No fígado normal, as células estreladas se encontram em estado quiescente, contendo gotículas de lipídeos no citoplasma e conformação de estrela; durante as perturbações hepáticas ocorre a liberação de citocinas e quimiocinas que provocam a ativação da célula estrelada hepática, a qual perde as gotículas de lipídeos, a forma estrelada e aumenta sua síntese de componentes da matriz extracelular, permanecendo desta forma com o fenótipo ativado, transformando-se em miofibroblasto, proliferativo, contrátil, quimiotático e inflamatório (PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013; TRAUTWEIN, 2015; TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Elas apresentam uma característica transcriptômica interessante pois expressam genes e proteínas que as distinguem dos outros tipos celulares do fígado, como o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo b (PDGFRb), a enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT), proteínas do citoesqueleto como desmina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017).

**Figura 1.** Esquema histológico do fígado.



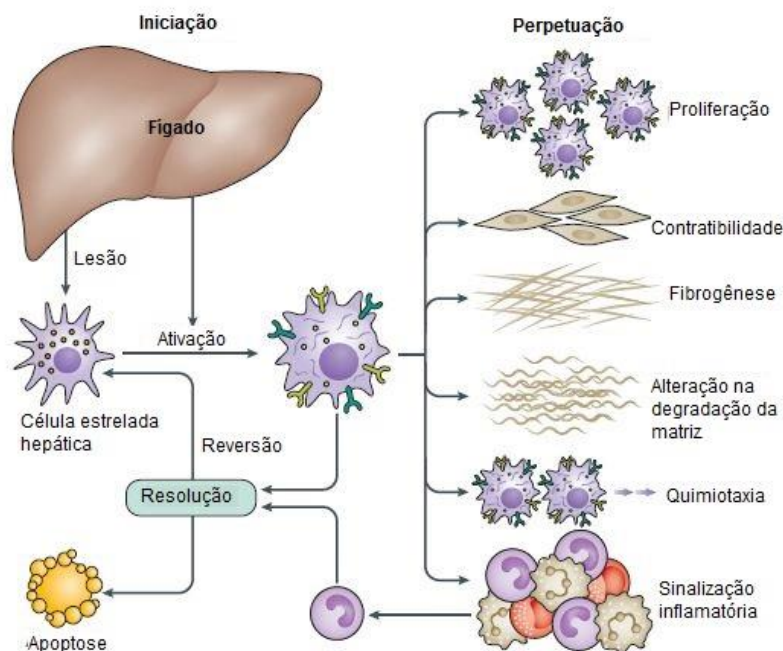
HSC – células estreladas hepáticas e KC- células de Kupffer. Adaptado de Hernandez-Gea e Friedman (2011).

Considerando-se a relevância das HSCs para o estabelecimento do quadro fibrogênico hepático, essas células tornaram-se alvo de interesse de diferentes pesquisas. Essas células representam 5-8% do volume hepático, e estudos com culturas primárias sempre foram alvos de questionamento e burocracias éticas (CASTILHO-FERNANDES et al., 2011; WEISKIRCHEN et al., 2013). Na busca de solucionar esses problemas, as linhagens celulares LX-1 e LX-2 foram estabelecidas por Xu et al. (2005) e se demonstraram como uma opção positiva pois mantêm um crescimento contínuo e as características fenotípicas das células estreladas, permitindo a reprodução de experimentos (CASTILHO-FERNANDES et al., 2011; WEISKIRCHEN et al., 2013). As células LX-2 apresentam a capacidade de se transdiferenciar do estado quiescente ao fibrosado em cultura celular, além de expressarem marcadores moleculares específicos como alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), vimentina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo b (PDGFRb) (WEISKIRCHEN et al., 2013), o que torna essas células um modelo de estudo na elucidação do processo fibrosante hepático (CASTILHO-FERNANDES et al., 2011).

Nas HSCs, o início da síntese dos componentes da MEC ocorre por meio da ativação das mesmas, o que pode ocorrer pelos processos de iniciação e perpetuação (Figura 2). A iniciação ocorre deixando as células sensíveis a muitos sinais extracelulares. Ela é realizada através de estímulos ocasionados por fatores pró-inflamatórios e pró-fibrinogênicos oriundos de células vizinhas (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; WALLACE, MANN; FRIEDMAN, 2015; TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Entre os elementos indutores do início da ativação das HSCs temos o fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) e o fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sendo que o primeiro é o principal estimulador de produção de colágeno I (WALLACE, MANN; FRIEDMAN, 2015; JI et al., 2017). Na perpetuação, ocorre a amplificação do fenótipo ativado, as células respondem a citocinas e fatores de crescimento de outras células hepáticas, resultando na cicatrização do tecido através da proliferação, contratilidade, fibrogênese e sinalização pró-inflamatória. Durante este processo de perpetuação ocorrem modificações comportamentais na célula, como a modificação de seu potencial contrátil verificada pela expressão da proteína alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), considerada um importante marcador molecular da ativação de células estreladas (PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013; ELPEK, 2014; TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Outra modificação é a perda das gotículas lipídicas, a qual pode ser regulada pelo receptor ativador proliferador de peroxissomo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) encontrado em baixa expressão nas células ativadas. Entretanto essas são características fenotípicas reversíveis quando da transdiferenciação celular do estado ativado para o quiescente (SHARVIT et al., 2013; LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015).

**Figura 2.** Ativação das células estreladas hepáticas através dos processos de iniciação e perpetuação celular.



Adaptado de Tsuchida e Friedman, 2017.

Histologicamente, a fibrose hepática ocasiona alterações quantitativas e qualitativas nos componentes da matriz extracelular, entretanto, a biópsia do fígado não é considerada o método adequado para o diagnóstico, pois possui baixa aceitação do paciente e pequeno risco de

complicações, além de não ser útil para o monitoramento do quadro hepático a longo prazo e estar suscetível a erros de amostragem e interpretação do patologista (HOROWITZ et al., 2017; LOOSEN et al., 2017). Embora o fígado apresente uma capacidade regenerativa, as opções para o tratamento são escassas, o principal tratamento é o transplante ou a retirada do estímulo agressor, sendo uma terapia eficaz para a fibrose algo ainda elusivo (WESTRA et al., 2016). Dentro deste contexto, o heptapeptídeo Ang-(1-7), uma pequena molécula que compõe o sistema renina-angiotensina e foi inicialmente descrita pelos seus efeitos no sistema cardiovascular (PACHAURI et al., 2017; HAY et al., 2017), vem apresentando atuação em diversos tecidos (MACHADO-SILVA et al., 2016) e alguns estudos preliminares apontam efeitos positivos da pequena molécula no controle e/ ou reversão da fibrose hepática (WANG et al., 2016; SILVA; TEIXEIRA, 2016; LU et al., 2017). Assim, elucidar particularidades mecanísticas da atuação desse peptídeo na modulação do processo fibrosante hepático é relevante. Particularmente, nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos moduladores desse peptídeo na expressão de miRNAs em células LX-2, visando a caracterização de moléculas que auxiliem no desenvolvimento de novos fármacos.

No geral, as doenças hepáticas em sua fase inicial são marcadas pela presença de uma resposta inflamatória, que se caracteriza como uma resposta a estímulos nocivos sofridos pelo órgão na tentativa de manter a homeostase do tecido (LIN; LIN-HUI; XIANG-HUO, 2016; LIU; WANG; JIANG, 2017), caracterizando-se como uma resposta aguda ou crônica. Na resposta inflamatória crônica ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e reparo reduzido no DNA (LIN; LIN-HUI; XIANG-HUO, 2016). No fígado, nas diversas formas de lesão tecidual, a inflamação precede a fibrogênese e as células inflamatórias chegam ao local da injúria através de quimiocinas, produtos de células em apoptose ou fragmentos de glicosaminoglicanos e proteínas (BISSELL, 2010). Estudos realizados por Boaru et al. (2012); Wree et al. (2014) e Alegre, Pelegrin e Feldstein (2017) relacionam o papel dos inflamassomos ao desenvolvimento da fibrose hepática. Os inflamassomos são complexos multiproteicos que detectam sinais de perigo de fontes exógenas e endógenas e produzem a clivagem de citocinas pró-inflamatórias em citocinas maduras como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-18 (IL-18), a principal família que os formam são as proteínas que apresentam domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NLRs) (LIU; WANG; JIANG, 2017; ALEGRE; PELEGRIN; FELDSTEIN, 2017). Segundo Alegre, Pelegrin e Feldstein (2017) a ativação dessas proteínas nos inflamassomos resulta em um aumento no nível de expressão de  $\alpha$ -SMA, sendo associado ao desenvolvimento espontâneo da fibrose, além disso, a formação de espécies reativas ao oxigênio mostra também uma função de ativadores dos inflamassomos. Além dessas

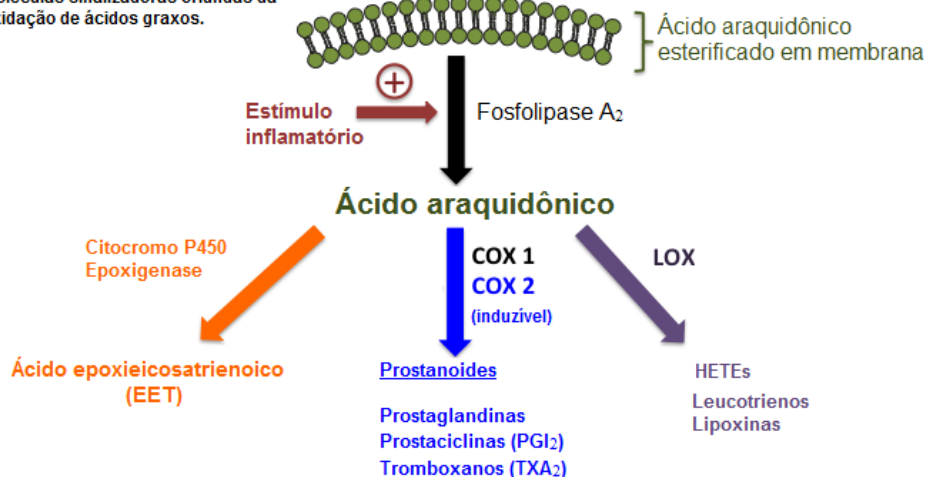
moléculas, quando da ativação dos mecanismos inflamatórios, elementos correlatos à via do ácido araquidônico atuam.

Mediante um estímulo pró-inflamatório, a fosfolipase A2 hidrolisa fosfolipídeos insaturados de membrana, liberando ácidos graxos livres, entre eles, o ácido linoleico e o ácido araquidônico, precursor dos eicosanoides, podendo se tornar substrato da via das ciclooxygenases (COXs) originando prostaglandinas e tromboxanos, ou se tornar substrato da via das lipoxigenases originando leucotrienos e ácidos hidroxi-eicosatetranoicos (HETEs) (Figura 3). Em seguida, o ácido araquidônico é convertido pela enzima COX em um intermediário instável, a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), o qual é o precursor comum de todos os prostanoides. Inicialmente, o ácido araquidônico passa por uma bis-oxigenação e se transforma em  $PGG_2$ , este, por sua vez, é convertido por uma reação de hidroperoxidase para  $PGH_2$ . Essas prostaglandinas primárias têm pouca atividade, mas servem de substrato para a formação de diversas PGs ( $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ), prostaciclina e tromboxanos ( $TXA_2$ ), que atuam nos processos inflamatórios, na proliferação e diferenciação celular, angiogênese e apoptose (HERSCHMAN, 2004; HARDWICK et al., 2013; BHARDWAJ et al., 2017).

**Figura 3.** Cascata enzimática do fosfolipídeo de membrana: ácido araquidônico.

### Eicosanóides

Moléculas sinalizadoras oriundas da oxidação de ácidos graxos.



Adaptado de <http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/lib/exe/fetch.php/eicosanoids.png>.

A enzima ciclooxygenase é encontrada em três isoformas no organismo, a ciclooxygenase 1, 2 e 3 (COX-1, COX-2 e COX-3). COX-1 é expressa de forma constitutiva no organismo, sendo responsável pela produção basal de prostaglandinas (PGs) que coordenam

funções de homeostase como a regulação do sistema cardiovascular e gastrointestinal. Contrário a isso, COX-2 é expressa em baixos níveis em condições normais, tendo seus níveis rapidamente regulados positivamente em resposta a estímulos patogênicos, mitogênicos e pró-inflamatórios como citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais, sendo uma evidência de seu envolvimento direto com o processo inflamatório. Por sua vez COX-3, uma variante de COX-1, é expressa apenas em partes específicas do cérebro e tem sua função ainda incerta. (GILROY; SAUNDERS; WU, 2001; BHARDWAJ et al., 2017; CHEN et al., 2017). Nos últimos anos, um interesse crescente sobre os mecanismos da COX-2 em diferentes patologias surgiu, pois esta é uma enzima muito mais complexa do que apreciada, uma vez que a mesma pode exercer efeitos benéficos ou deletérios dependendo da intensidade e da causa de sua indução. Estudos recentes demonstraram a correlação entre COX-2 e a carcinogênese humana em diferentes tecidos (BHARDWAJ et al., 2017; CHEN et al., 2017); no fígado prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um dos produtos oriundos de COX-2, participa ativamente das funções hepáticas como a regulação da pressão do sangue portal, na homeostase glicolítica, na distribuição de nutrientes para as células hepáticas e na patogenia da fibrose hepática (A MOHAMMED, 2004). A importância de COX-2 no fígado ainda é incerta, alguns estudos demonstram sua alta expressão correlacionada com o desenvolvimento de inflamação e fibrose hepática ou sua ação como um agente acelerador de injúrias teciduais (A MOHAMMED, 2004; BRENNER et al., 2013), enquanto outro estudo aponta COX-2 como um protetor contra a insuficiência hepática induzida por FAS, assim como as prostaglandinas, citadas como essenciais na redução de injúrias de reperfusão em fígados transplantados (HOSSAIN et al., 2006; LI et al., 2009). Em conjunto a isso, Chen et al. (2016a) demonstraram que o tratamento com ácido palmítico em células de mioblastos de ratos induziu um aumento na expressão de COX-2, localizado especificamente nas gotículas lipídicas, inferindo a possibilidade do uso das gotículas lipídicas para detecção e controle da homeostase energética celular.

## **1.2. O metabolismo lipídico e a sua correlação com o processo pró-inflamatório**

Lipídeos são biomoléculas insolúveis em água variando de hidrofóbicos a anfifílicos, além disso, apresentam funções celulares importantes como a compartimentação celular, segregação celular, transdução de sinais, armazenamento de energia, produção hormonal e fissão ou fusão de membrana (BURDGE; CALDER, 2014; XU; ZHANG; LIU, 2017; ONAL et al., 2017). Os lipídeos existentes na célula são originados da alimentação e/ ou da síntese *de novo* de ácidos graxos e podem seguir para diferentes processos como a incorporação na



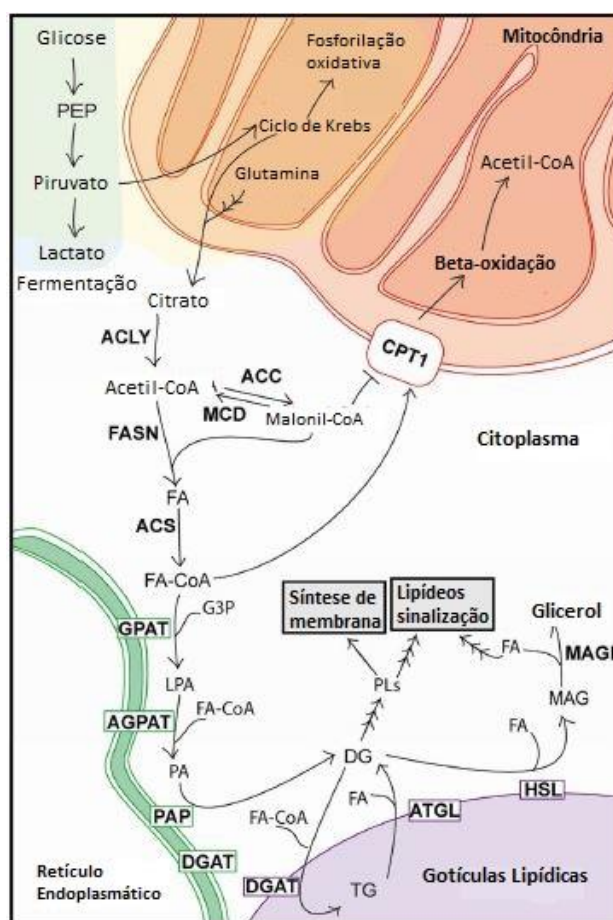
membrana celular, atuação como moléculas de sinalização celular, oxidação e armazenamento em gotículas lipídicas. Essa capacidade de armazenamento é considerada um mecanismo de proteção, pois permite que a célula encare flutuações no suprimento de ácidos graxos sem arriscar a entrada no processo lipotóxico (RODRIGUEZ; KERSTEN, 2017).

As gotículas lipídicas estão presentes em células de vários organismos, como animais, plantas, fungos e bactérias. No passado a presença de gotículas de lipídeos nas células estava envolvida apenas com o armazenamento e o tráfego lipídico se demonstrando no geral como uma vesícula inerte, porém, atualmente essas gotículas são conhecidas por serem altamente reguladas e envolvidas em muitos processos celulares, como ativação e metabolismo, degradação de proteínas, sequestro de fatores de transcrição e de componentes da cromatina, além de estarem envolvidas nos processos inflamatórios (BOZZA; VIOLA, 2010; WELTE; GOULD, 2017; ONAL et al., 2017). Estudos proteômicos recentes identificaram diversos tipos de proteínas presentes nas gotículas lipídicas, como proteínas estruturais nomeadas de perilipinas, cuja função é a proteção das gotículas contra a ação de lipases; enzimas para o metabolismo lipídico; proteínas envolvidas no tráfego de membrana; proteínas de sinalização, como a presença de alguns sinalizadores pró-inflamatórios, COX-2 especificamente; proteínas envolvidas na degradação de proteínas, proteínas ribossomais; histonas e proteínas de citoesqueleto (WELTE; GOULD, 2017; XU; ZHANG; LIU, 2017).

No geral, a biossíntese de lipídeos e, particularmente, o armazenamento dos mesmos envolvem diferentes vias de maneiras dependentes de estímulos e receptores. Para o início da biogênese lipídica, os ácidos graxos livres requerem uma modificação covalente realizada pela junção à coenzima A (CoA) e catalisada pelas Acil-CoA sintetases (ACSSs) (Figura 4) (CURRIE et al., 2013; ONAL et al., 2017). Posteriormente, os ácidos graxos podem ser esterificados com cadeias de glicerol ou esterol originando triacilgliceróis ou éster de esteróis, respectivamente, para enfim serem armazenados em gotículas de lipídeos (GL) (CURRIE et al., 2013; RODRIGUEZ; KERSTEN, 2017). A síntese de triacilgliceróis *de novo* ocorre em quatro passos envolvendo diversas enzimas como aciltransferase de glicerol-3-fosfato (GPAT), a O-aciltransferase de 1-acilglicerol-3-fosfato (AGPAT), a lipina (PAP) e as enzimas de diacilglicerolaciltransferase (DGAT) (ONAL et al., 2017). Quando a síntese das gotículas lipídicas ocorre através de enzimas como a DGAT, elas são denominadas de gotículas lipídicas nascentes. Após a sua formação, elas podem continuar crescendo através da síntese lipídica local ou de tecidos próximos especializados, como o tecido adiposo (WELTE; GOULD, 2017). Além das enzimas citadas, alguns mecanismos dependentes de transcrição também podem estar envolvidos na biogênese, como os fatores de transcrição proteína ligadora do elemento

regulatório de esterol (SREBP) e receptor ativado por proliferadores de peroxissomo (PPAR) como previamente mencionado, sendo o receptor ativado por proliferadores de peroxissomo  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) o fator de transcrição que regula diretamente a expressão de diversos genes na absorção ou oxidação de ácidos graxos, metabolismo e armazenamento de triglicerídeos e alguns mediadores pró-inflamatórios como o fator de ativação de plaquetas (PAF) e a prostaglandina D2, podendo atuar como potentes indutores da formação de gotículas lipídicas (BOZZA; VIOLA, 2010; RODRIGUEZ; KERSTEN, 2017).

**Figura 4.** Biossíntese de ácidos graxos.



Adaptado de Currie et al. (2013).

Uma das primeiras enzimas da biogênese, a Acil-CoA sintetase (ACS), tem papel importante na formação de triacilgliceróis e diacilgliceróis. Ela é encontrada em cinco subfamílias nos mamíferos, a de maior interesse nesse caso são as Acil-CoA sintetases de cadeia longa (ACSL), as quais foram identificadas 5 isoformas diferentes nos mamíferos (ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5 e ACSL6). Os membros dessa subfamília se diferenciam pela especificidade aos tipos de ácidos graxos e pela sua distribuição (WATKINS; ELLIS, 2012;

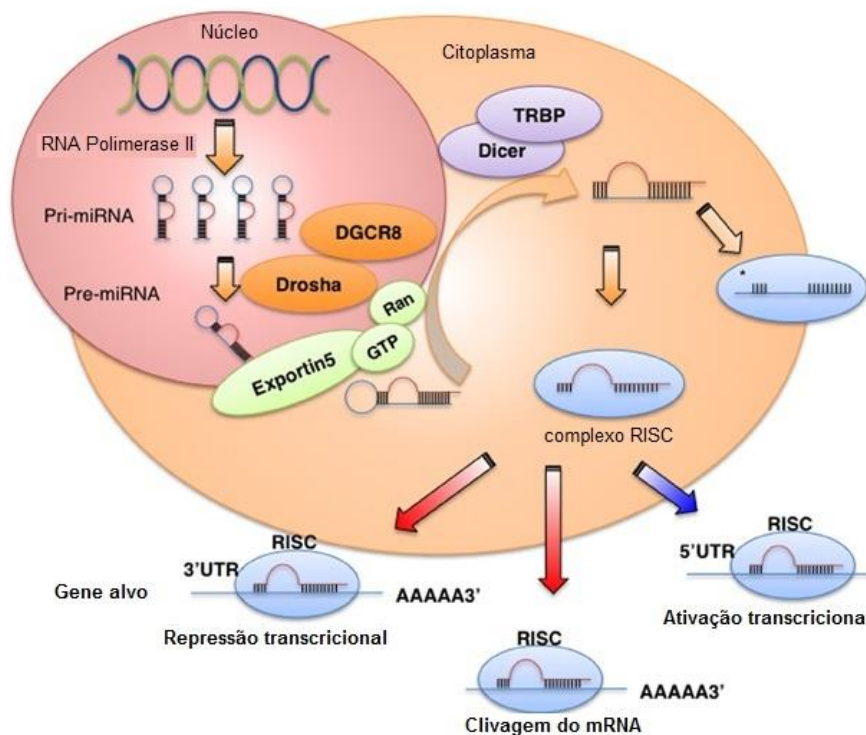
TUOHETAHUNTILA et al., 2015). A Acil-CoA sintetase de cadeia longa 4 (ACSL4) é uma proteína de membrana periférica reconhecida por sua alta afinidade pelo ácido araquidônico (AA) e por outros ácidos graxos de cadeia longa poli-insaturados e que pode ser encontrada em tecidos humanos com uma expressão alta em cérebro, placenta, testículo, ovários, baço e córtex adrenal. Em fígados normais é encontrada em baixos níveis, entretanto fígados com condições patológicas como hepatocarcinoma e esteatose não-alcoólica apresentam altos níveis de expressão de ACSL4 (KAN et al., 2014; TUOHETAHUNTILA et al., 2015). O ácido araquidônico, além de estar envolvido na via lipídica como substrato de ACSL4, também pode ser utilizado na conversão de alguns mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos, nesse caso sendo utilizado pelas enzimas lipooxigenase (LOX) ou ciclooxigenase (COX-2) (KUWATA; HARA, 2015). Segundo Kuwata e Hara, (2015) a inibição de ACSL4 em fibroblastos embrionários de ratos apresenta um aumento significativo na produção dependente de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) e prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>), produtos de COX-2. Em contraponto, estudos desenvolvidos em células de câncer de mama mostram um aumento no nível de expressão de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, como COX-2 e ACSL4. Ao tratarem as células com rosiglitazona, fármaco conhecido por inibir ACSL4, ocorreu uma inibição na indução de COX-2 levando os pesquisadores a concluírem que os níveis de COX-2 presentes sofriam regulação por ACSL4 (ASKARI et al., 2007; SCODITTI et al., 2009; ORLANDO et al., 2012). Ademais, outros estudos demonstram a correlação entre a formação das gotículas lipídicas e o aumento na geração de COX e lipoxigenase (LOX); a regulação positiva de ACSL4 sugerindo controle da proliferação celular pela geração de eicosanoides e o silenciamento de ACSL4 causando efeitos na secreção de várias prostaglandinas em células estreladas hepáticas ativadas, todos corroborando a existência da correlação entre COX-2 e ACSL4 (BOZZA; VIOLA, 2010; MALOBERTI et al., 2010; TUOHETAHUNTILA et al., 2015).

### **1.3. Os microRNAs e sua atuação na fibrose hepática**

Como mencionado, o diagnóstico hepático atual realizado através da biópsia do fígado não é considerado adequado por diversos fatores, como a dificuldade em monitoramento a longo prazo, entre outros (LOOSEN et al., 2017). Atualmente, a busca por terapias e diagnósticos inovadores é constante e estratégias alternativas menos invasivas que a biópsia para uma melhor avaliação e terapêutica do quadro clínico são de grande importância, neste contexto, os estudos com microRNAs como uma modalidade terapêutica tem obtido resultados

positivos. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs endógenos não codificantes que regulam a expressão de genes em níveis pós-transcricionais (VAN ROOIJ, 2011; MOQADAM; PIETERS; BOER, 2012; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; LOOSEN et al., 2017). Os genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II e III e resultam num transcrito primário de miRNA (pri-miRNA). Esse transcrito é processado dentro do núcleo celular por um complexo enzimático chamado Drosha-DGCR8 resultando num miRNA precursor (pré-miRNA) com aproximadamente 70 nucleotídeos. Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma pela exportina-5 e posteriormente são clivados pelo complexo enzimático Dicer-TRBP para retirada da alça *stem-loop* formando dúplex de miRNAs. O dúplex ao ser integrado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) terá as duas fitas separadas, a qual uma delas permanecerá integrada ao complexo, formando assim o miRNA maduro, e a outra fita sofrerá degradação (Figura 5) (VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; LOOSEN et al., 2017).

**Figura 5.** Biogênese do microRNA.



Adaptado de Takahashi, Miyazaki e Ochiya (2014).

Complementar a isto, segundo Moqadam, Pieters e Boer (2012) predições computacionais sugerem que por volta de 60% dos genes codificadores de proteínas nos

mamíferos podem ser regulados por esses miRNAs, sendo que essa regulação surge em vários processos celulares como apoptose, proliferação e diferenciação e possibilita a modulação de uma via inteira da doença, pois esses miRNAs possuem vários alvos dentro de uma rede celular (MOQADAM; PIETERS; BOER, 2012; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; JONAS; IZAURRALDE, 2015) e a afinidade de interação dessas moléculas é dependente da fisiopatologia do órgão. Essa diversidade de regulação se deve à ligação imperfeita (região seed) da 3'-UTR dos mRNAs, a qual resulta em várias possíveis ligações ao local (MAUBACH, 2011). Ademais, um aspecto comum encontrado em câncer, doenças do sistema nervoso central, inflamação, doenças cardiovasculares e desordens metabólicas é a desregulação dos miRNAs (MOQADAM; PIETERS; BOER, 2012; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014). Todo esse conhecimento, sugere que os miRNAs possuem várias vantagens que subsidiam a sua utilização para o desenvolvimento de novos fármacos (VAN ROOIJ, 2011; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014).

A regulação do processo pró-inflamatório no fígado em conjunto com a ocorrência de fibrose hepática, pode ser realizada por miRNAs, que por sua vez, se apresentam desregulados na presença de inflamação hepática crônica (LIN; LIN-HUI; ZUANG-HUO, 2016). O miR-122, é um exemplo, possui uma expressão abundante no fígado e em ratos com o miR-122 silenciado há o desenvolvimento de fibrose hepática (LIN; LIN-HUI; ZUANG-HUO, 2016). Por sua vez, com o miR-146a-5p, estudos demonstraram sua participação na regulação de proliferação e ativação das células estreladas hepáticas, além deste miRNA, outros se mostraram envolvidos na regulação da diferenciação, proliferação e produção de MEC pelas HSCs (CHEN et al, 2016b). Estudos mais recentes com o miR-146a indicam seu envolvimento em doenças inflamatórias e na regulação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), além de também estar relacionado com a ativação das células estreladas hepáticas (MAUBACH, 2011). Loosen et al. (2017) demonstraram em pacientes com fibrose a superexpressão de alguns miRNAs comparando com a célula quiescente; entre eles estão presentes os miR-138, -140, -143, -325, -328 e -349. Todos esses estudos recentes exemplificam a importância de análises mais aprofundadas com miRNAs para um maior entendimento da regulação gênica, principalmente quando estão envolvidas nesse contexto, patologias graves.

Análises preliminares de nosso grupo de pesquisa apontaram a expressão do miRNA-769-3p como expoente entre as condições simuladoras da quiescência celular (2% de SBF) e ativação pró-fibrótica (10% de SBF). Segundo Luo et al. (2014), o miRNA-769-3p tem correlação com o aumento de apoptose em células de câncer de mama durante a reoxigenação, baseando-se nisso e no entendimento que o processo apoptótico pode ocorrer na fibrose

hepática sendo resultante de um processo pró-inflamatório celular, *cox-2*, um gene bem caracterizado na inflamação foi analisado, mostrando resultados interessantes e uma possível regulação do miRNA-769-3p em vias correlatas com o processo pró-inflamatório. Dessa maneira o miRNA-769-3p foi selecionado para análises funcionais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Analisar aspectos funcionais da atuação do miR-769-3p no processo pró-fibrosante em células estreladas hepáticas LX-2, focando-se em sua correlação com a modulação do processo pró-inflamatório e o metabolismo de lipídeos.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Acompanhar alterações morfofisiológicas nas culturas de células LX-2 transfectadas ou não com o miRNA 769-3p mimico e inibidor no acúmulo de gotículas lipídicas;
2. Avaliar, nas condições de cultivo das células LX-2 em estudo, alterações moleculares na expressão de genes correlatos as vias dos processos pró-fibrosante, pró-inflamatório, do metabolismo de lipídeos e do estresse oxidativo;
3. Investigar a expressão das proteínas COX-2 e ACSL4, nas condições de cultivo celular em estudo, buscando-se uma correlação da atuação das enzimas e os processos metabólicos em análise;
4. Mensurar os níveis de TGF- $\beta$ 1 produzido pelas culturas celulares em ensaios de ELISA.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Técnicas usuais em biologia molecular foram utilizadas de acordo com as metodologias descritas ou adaptadas de Ausubel et al. (1995) e Sambrook, Fritsch e Maniatis (2000). Normas básicas em biossegurança também foram atendidas.

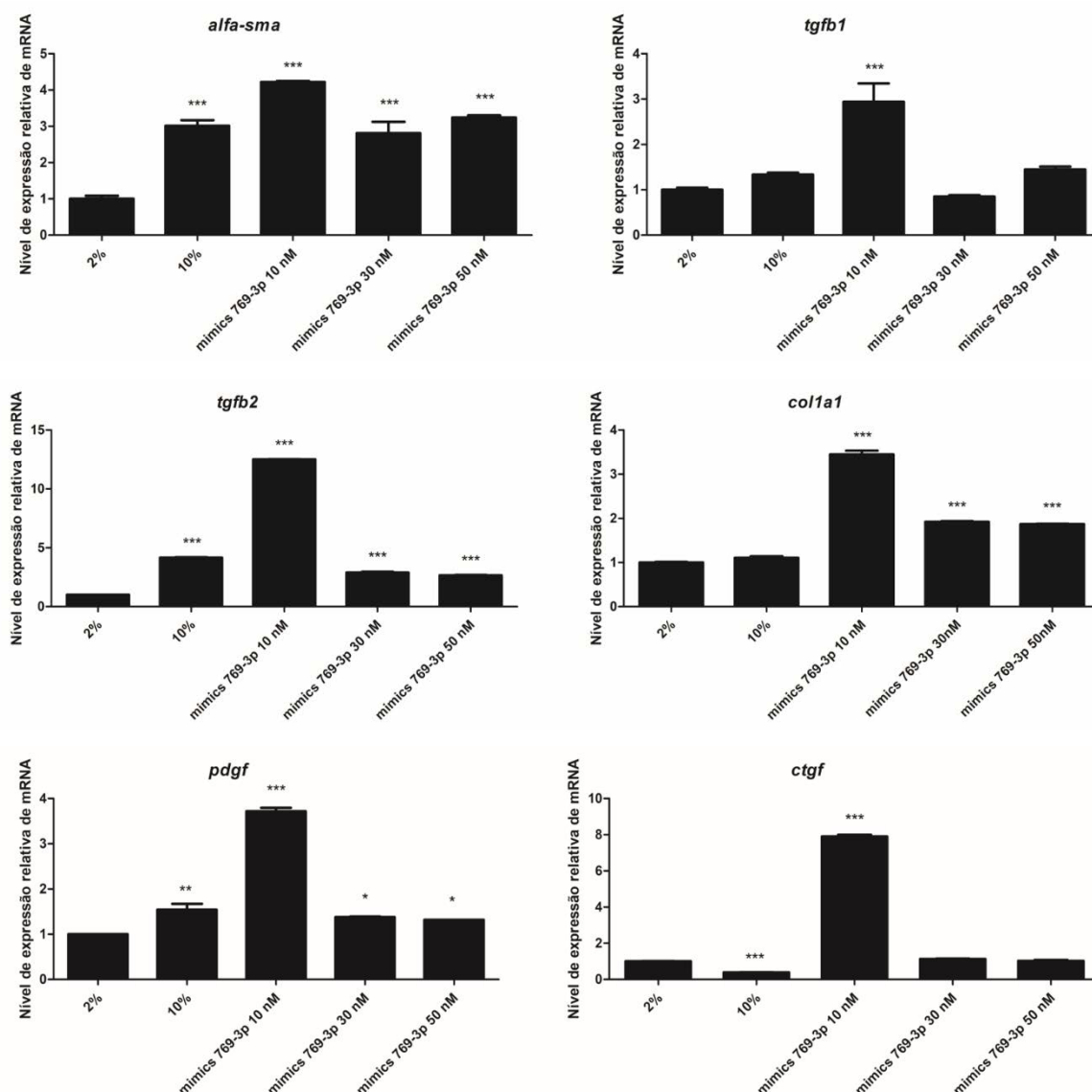
### **3.1. Cultura de células e transfecção celular**

Culturas da linhagem hepática estrelada humana LX-2 (Cedidas pelo professor Scott L. Friedman, NY, EUA) foram crescidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em meio *Dulbecco's Modified*

*Eagle's Medium* (DMEM) contendo soro bovino fetal (SBF) e antibiótico Anti-anti (Thermo Fisher Scientific) a 37° C e em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. 1.5 x 10<sup>5</sup> células foram semeadas e os ensaios foram realizados quando as culturas atingiram aproximadamente 80% de confluência. Para a manutenção da quiescência, as células LX-2 foram crescidas em meio contendo 2% de soro bovino fetal (SBF); para a ativação do processo pró-fibrosante as células LX-2 foram crescidas em meio contendo 10% de SBF (XU et al., 2005).

Para as análises funcionais do miRNA, padronizações da transfecção celular precisaram ser realizadas. Para isso, células LX-2 foram crescidas em microplacas de 24 poços em meio contendo 10% SBF até a confluência de aproximadamente 60% e em seguida foram transfectadas com diferentes concentrações do *miRVana*<sup>TM</sup> *Mimics* 769-3p (Thermo Fisher Scientific) (10 nM, 30 nM e 50 nM), utilizando-se o reagente de transfecção Lipofectamina® RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), seguindo condições previamente estabelecidas pelo nosso grupo (Silva et al., 2016). Análises posteriores de qPCR com marcadores de fibrose hepática demonstraram que as células transfectadas com 10 nM do miRNA-769-3p não apresentavam um quadro clínico positivo se considerado a reversão do processo pró- fibrosante, pois o nível de expressão dos genes estava elevado em comparação com a célula quiescente, desta forma, as concentrações de 30 nM e 50 nM foram focadas (Figura 6). Estudos de microscopia de fluorescência de citoesqueleto e núcleo realizados demonstraram que as células transfectadas com 50 nM apresentavam morfologia mais semelhante com a célula quiescente, resultando assim, na escolha desta concentração de 50 nM para continuação do estudo. Em seguida, para análise funcional, as células LX-2 foram crescidas e transfectadas com 50 nM de *miRVana*<sup>TM</sup> *Mimics* 769-3p ou 50 nM *miRVana*<sup>TM</sup> *Inhibitor* 769-3p em conjunto com a Lipofectamina® RNAiMAX em meio Opti-MEM. O controle negativo do ensaio foi realizado com as células transfectadas apenas com Lipofectamina® RNAiMAX em meio Opti-MEM. Após as transfecções, as culturas celulares foram mantidas em cultivo por mais 48 h e em seguida as células foram utilizadas em análises celulares e moleculares pertinentes.

**Figura 6.** Gráficos de padronização do miRNA-769-3p nas concentrações 10 nM, 30 nM e 50 nM.



Os resultados foram submetidos à análise estatística One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

### 3.2. Análises morfológicas: a microscopia de campo claro e as análises das gotículas de lipídeos

Para se avaliar o metabolismo lipídico e a formação das gotículas de lipídeos,  $2,0 \times 10^4$  células LX-2 foram cultivadas em placas de 24 poços nas condições descritas acima. Após atingirem 80% de confluência, as células foram fixadas com formol cálcio (formaldeído a 37% + cloreto de cálcio a 1% + água destilada) durante 30 minutos. Após lavagem em água corrente e em água destilada, as células contidas nas lamínulas foram incubadas por 10 minutos em



propilenoglicol 100% (*Merck*). Posteriormente a solução de *oil red* a 0,7% (0,17 mM de *oil red* 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 as lâminas foram montadas com auxílio de gelatina glicerina e analisadas em microscópio de luz *OLYMPUS* BX51 utilizando-se contraste de fase.

### **3.3. Análises morfológicas: imunofluorescência e as análises de ACSL4 e COX-2**

Para investigação de proteínas através da imunofluorescência,  $2 \times 10^4$  células foram cultivadas como descrito no item 3.1 em lamínulas em placas de 24 poços e após atingirem 80% de confluências foram fixadas com paraformaldeído 3,7% e Triton X-100 a 0,02% por 5 minutos em temperatura ambiente. Para bloquear sítios inespecíficos de ligação com o anticorpo, as células foram incubadas por 2 horas em solução 1% de BSA (Albumina de Soro Bovino – Sigma-Aldrich + PBS 0,5x) e posteriormente incubadas separadamente overnight em 150  $\mu$ L de solução com anticorpos específicos para ACSL4 e COX-2 diluídos na proporção de 1:200 em TBS à 20°C. Em seguida, foi realizada marcação com 200  $\mu$ L de faloidina-TRITC diluída em BSA 0,5% (1% diluído em água) na proporção 1:150, a qual permaneceu na célula por 2 horas para visualização dos filamentos de actina; posterior a isso, foram realizadas duas lavagens de 5 minutos em agitação com PBS 0,5x e marcação das células com 180  $\mu$ L de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato) diluído em água na proporção de 1:2000 por 3 minutos para visualização do núcleo celular. Após a marcação com DAPI, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS 0,5x em agitação e as células foram incubadas por 4 horas com 150  $\mu$ L de FITC na proporção 1:40 diluído em TBS. Decorridas as 4 horas, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,5x duas vezes de 5 minutos em agitação e preparadas para a montagem das lâminas, para tal, foi utilizado o N-propilgalato. As fotografias foram realizadas com microscópio de fluorescência modelo BX51 *OLYMPUS* acoplado a uma câmera fotográfica.

### **3.4. Análise molecular: extração de RNA e mensuração da expressão gênica**

Para se verificar o efeito do peptídeo nas células LX-2, focando-se na modulação transcricional de proteínas do processo inflamatório-fibrosante e dos elementos em estudo, o

mRNA das células crescidas sob diferentes condições foi extraído utilizando-se *TRIZOL*® Reagent (Thermo Fisher Scientific). O RNA extraído foi analisado em NanoVue Plus (GE Healthcare, Life Sciences) para verificar a pureza e a quantificação e aproximadamente 200 ng do mRNA de cada amostra foi utilizado em reações de transcrição reversa para preparo do DNA complementar (cDNA), utilizando *SuperScript*® *III First-StrandSynthesis System for RT-PCR* (Thermo Fisher Scientific) e seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA, em seguida, foi utilizado em PCR semiquantitativa com 0.2 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de oligonucleotídeos específicos, tampões e enzima *Taq DNA polimerase* (0.025 U/ µl) em termociclador Mastercycler® ep (Eppendorf). Na PCR semiquantitativa para cada conjunto de oligonucleotídeo, temperaturas específicas de anelamento (TM) foram utilizadas. Após as reações, os produtos foram analisados em gel de agarose a 0.9% corado com *Gel Red* (Biotium™ -Uniscience) e fotografados em câmera digital (MiniBIS Pro –DNR Bio-Imaging Systems). A quantificação relativa das bandas foi realizada com a utilização de softwares apropriados como *Image-J* (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband, NIH, USA).

Para as análises envolvendo reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), foram realizadas utilizando-se os reagentes do *SYBR Green/ Rox qPCR Master MIX* (Thermo Fisher Scientific) em placas de 96 poços (MicroAmp® *Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems*) e seladas com adesivo óptico. As reações foram realizadas pelo ciclador A&B – *Step One Plus*™ Real-Time PCR System. Para análise dos dados foi realizado o método de quantificação relativa da expressão gênica ( $\Delta CT$ ), o qual permite verificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras. Os resultados foram obtidos pela fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo normalizado ( $2^{-\Delta CT}$ ). Os ensaios de PCR semiquantitativa e PCR quantitativa em tempo real foram realizados em triplicatas biológicas utilizando-se o gene  $\beta$ -actina como controle endógeno. Os oligonucleotídeos específicos para os genes envolvidos no processo fibrosante hepático, nas vias de estresse oxidativo e apoptose, nas vias lipídicas, no processo pró-inflamatório e em processos regulatórios como ciclo celular e transição epitélio-mesenquimal (Tabela 1) foram investigados pela sua relevância funcional. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se sequências depositadas no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o programa *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR e RT-PCR.

| Gene                           | Primer Sense (5'-3')        | Primer Antisense (5'-3')   | TM (°C) | Amplicon (pb) |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------|---------------|
| <i>tgfb1</i>                   | GACTCGCCAGAGTG<br>GTTATC    | GGAGCTGAAGCAAT<br>AGTTGG   | -       | 80            |
| <i>tgfb2</i>                   | GCACCTCCACATATA<br>CCAGT    | GGCAATAACATTAGC<br>AGGAG   | -       | 80            |
| <i>pdgf</i>                    | CCCAGGAATTACTC<br>GGTCAA    | ACAGCCACAATTTCC<br>TCCAC   | -       | 84            |
| <i>ctgf</i>                    | GCTGACCTGGAAGA<br>GAACAT    | ACAGCGATTCAAAG<br>ATGTCA   | -       | 81            |
| <i>colla1</i>                  | ATGACGTGATCTGTG<br>ACGAG    | AAATTCCTCCGGTTG<br>ATTTC   | -       | 110           |
| <i><math>\alpha</math>-sma</i> | AATCCTGACCCTGA<br>AGTACC    | TAGAAAGAGTGGTG<br>CCAGAT   | -       | 84            |
| <i>smad3</i>                   | CTTTGAGGCTGTCTA<br>CCAGT    | TGACAACAATGGGTT<br>GAGTA   | 44      | 294           |
| <i>smad2</i>                   | CAAATTCAGAGAGG<br>TTCTGC    | CCCTGATTAACAGAC<br>TGAGC   | 47      | 286           |
| <i>plau</i>                    | TGGAAAACCTCATC<br>CTACAC    | CTTCAGAGCCGTAGT<br>AGTGG   | 47      | 300           |
| <i>sod-1</i>                   | TGTGGGGAAGCATT<br>AAAGGA    | CACCTTTGCCCAAGT<br>CATCT   | 56      | 297           |
| <i>rac1</i>                    | GCAAAGTGGTATCC<br>TGAGGTG   | CAGCAGGCATTTTCT<br>CTTCC   | 52      | 291           |
| <i>gss</i>                     | AAGACCGAAGGCTG<br>TTTGTG    | TCTTCACCCACATCC<br>AGTGA   | 55      | 289           |
| <i>por</i>                     | TGGAGGAGGACTTC<br>ATCACC    | TTTTGGAGTCCGAGA<br>TGTC    | 52      | 300           |
| <i>bax</i>                     | TGGCAGCTGACATG<br>TTTTCTGAC | GTCCCAACCACCCTG<br>GTCTTGG | 58      | 300           |
| <i>casp3</i>                   | GCAGCAAACCTCAG<br>GGAAAC    | TGTCGGCATACTGTT<br>TCAGCA  | 55      | 300           |

|               |                               |                             |    |     |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------|----|-----|
| <i>casp9</i>  | TCGAAGGTCCTCAA<br>ACCTTCCTGG  | CGTGGTGGTCATTCT<br>CTCTCA   | 55 | 300 |
| <i>fas</i>    | ACCTCTGGTTCTTAC<br>GTCTGTTGC  | CATGTCCTTCATCAC<br>ACAATC   | 56 | 300 |
| <i>cox-2</i>  | CAGCACTTCACGCAT<br>CAG        | CTAGCCAGAGTTTCA<br>CCG      | -  | 110 |
| <i>pten</i>   | CCGGCAGCATCAAA<br>TGTTTC      | GGCAACCACAGCCAT<br>CGTTA    | -  | 110 |
| <i>akt1</i>   | CGGGCACATTAAGA<br>TCACAG      | TCATTGTCCTCCAGC<br>ACCTC    | -  | 98  |
| <i>foxo1</i>  | GCCTGACCCAAGTG<br>AAGAC       | GCCCATTCTGCCATA<br>GCC      | -  | 93  |
| <i>nf-κB</i>  | TTGAAACACTGGAA<br>GCACGA      | TTGCAAATAGGCAAG<br>GTCAG    | -  | 89  |
| <i>il-1</i>   | ACAAGCTGAGGAAG<br>ATGCTGGTTCC | CTTATCATCTTTCAA<br>CACGCAGG | 58 | 300 |
| <i>il-6</i>   | CCTCTTCAGAACGA<br>ATTGAC      | TGTACTCATCTGCAC<br>AGCTC    | 44 | 299 |
| <i>acsl4</i>  | ATGGATGATTGCAG<br>CACAGA      | CTGCTTCTTTGCCAA<br>GTGTG    | -  | 80  |
| <i>mlycd</i>  | GACATCTCCAGCAA<br>CATCCA      | CTGGGTCAAGCTGAT<br>GGAAT    | -  | 108 |
| <i>fasn</i>   | TCCTGCTGACCAAG<br>AAGTCC      | CTTGCTCCTTGAAGC<br>CATCT    | -  | 87  |
| <i>acacal</i> | TGTAAGAGCTCATTT<br>TGGAGGA    | GAATCGAGAGTGCTG<br>GTTGAG   | -  | 82  |
| <i>pap</i>    | CCATCAGCCAGTCTT<br>TCACA      | CAGGGTTGCAGACAC<br>TCAAG    | -  | 81  |
| <i>cs</i>     | CCATCCACAGTGAC<br>CATGAG      | GCTGCAAAGGACAG<br>GTAAGG    | -  | 94  |
| <i>magl</i>   | GATCGCCTATGTGAC<br>AGCAA      | GCTCCTTGTGGAGAA<br>CATGG    | -  | 87  |

|                                  |                            |                           |    |     |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|----|-----|
| <i>gpat1</i>                     | TCGATGAACACCAG<br>ATGGA    | CAAGAATTGCTGCTG<br>TCGAA  | -  | 83  |
| <i>atgl</i>                      | GGTGGCATTTCAGA<br>CAACCT   | GATGTTGGTGGAGCT<br>GTCCT  | -  | 92  |
| <i>dgat1</i>                     | GCCTTCTTCCACGAG<br>TACCT   | AGTGGGATCTGAGCC<br>ATCA   | -  | 86  |
| <i>dgat2</i>                     | TGAGTCTCTGAGCTC<br>CATGC   | AACCAGGTCAGCTCC<br>ATGAC  | -  | 97  |
| <i>cpt1a</i>                     | GCTCATGGTGAACA<br>GCAACT   | TAAAGCAGGATGGC<br>ATGGAT  | -  | 105 |
| <i>cpt2</i>                      | CCAGCCAGCTACCA<br>CTGACT   | TTAGCAGCTGTGATG<br>CCAGT  | -  | 90  |
| <i>rgcc</i>                      | TCTTCTCTCTGCCAC<br>TGTCACT | TGTCAAGATCAGCAA<br>TGAAGG | -  | 83  |
| <i>zeb1</i>                      | TGCACTGAGTGTGG<br>AAAAGC   | AAGCGTTTCTTGCAG<br>TTTGG  | -  | 107 |
| <i>zeb2</i>                      | AATGGACTGCAAGG<br>CTGAAG   | CGACAGGCGGAATA<br>TTAGGA  | -  | 110 |
| <i><math>\beta</math>-actina</i> | CGGGACCTGACTGA<br>CTAC     | CTCCTTAATGTCACG<br>CAC    | -  | 87  |
| <i><math>\beta</math>-actina</i> | TCGTGCGTGACATTA<br>AGG     | GATCTTCATTGTGCT<br>GGGTG  | 55 | 300 |

### 3.5. Mensurações de TGF $\beta$ -1 em ELISA

Para a mensuração de TGF $\beta$ -1, foi utilizado o reagente *ELISA kit – TGF $\beta$ -1* (Thermo Fisher Scientific – Invitrogen) seguindo as orientações do fornecedor. Para tal, as células LX-2 foram cultivadas em placas de 24 poços e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C para assentamento das partículas. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e transferido a um novo tubo com adição de 50  $\mu$ L da solução de extração e incubação por 30 minutos a 4°C. Em seguida, 250  $\mu$ L de Standard Diluent Buffer foram adicionados e misturados; 200  $\mu$ L desta solução de trabalho foi adicionada na placa de ELISA juntamente com 50  $\mu$ L de Biotin Conjugate para incubação por 3 horas em temperatura ambiente. Após as

3 horas, os poços foram lavados 4 vezes com Wash Buffer por 30 segundos e adicionados 100  $\mu$ L de Streptavidin-HRP Working Solution diluída conforme as instruções do fabricante. Posterior a isso, o sobrenadante foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e os poços foram lavados como descrito acima. 100  $\mu$ L da solução de Stabilized Chromogen foram adicionados aos poços para incubação por 30 minutos em temperatura ambiente protegido da luz; decorridos os 30 minutos, foi adicionado 100  $\mu$ L da solução Stop Solution e a leitura foi realizada em 450 nm em leitor RChistoInfinite M200 PRO TECAN.

Em conjunto com os ensaios anteriores, essas análises construirão um painel do efeito modulador do miRNA-769-3p na modulação de elementos da via lipídica e pró-inflamatória e no quadro fibrosante hepático nas células LX-2.

### **3.6. Análises estatísticas**

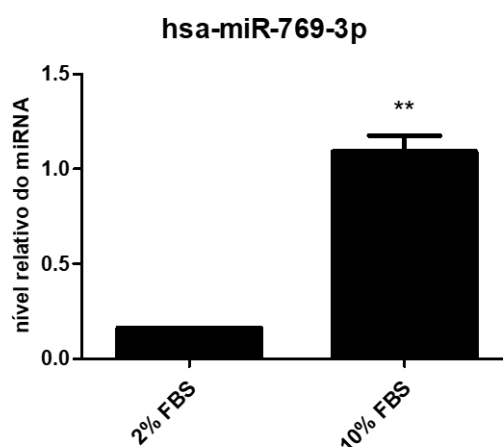
Análises estatísticas dos resultados foram geradas no programa *GraphPad*, versão 5.0 (Prism Inc.) utilizando-se ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Será adotado o valor  $*p < 0.05$  para significância estatística.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Análises preliminares com o miRNA**

Análises preliminares e em larga escala, realizadas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Karen CM Moraes (resultados não publicados), apontou como estatisticamente significativo ( $**p < 0.005$ ) o nível de expressão do miRNA-769-3p nas células cultivadas na presença de 10% SBF (células ativadas), quando da comparação com o nível de expressão encontrado nas células oriundas de culturas quiescentes (consideradas como controle experimental) (Figura 7). Esse alto nível de expressão motivou a análise funcional desse miRNA nas culturas celulares, pela utilização de moléculas mimetizadoras e inibidoras da pequena molécula, visando a um melhor entendimento das vias de sinalização moduladas pelo miRNA-769-3p.

**Figura 7.** Nível de expressão relativo do miRNA-769-3p em duas condições de cultivo (2% SBF; 10% SBF).



Os resultados foram submetidos à análise estatística One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.2. Análise de gotículas lipídicas pelo ensaio de *Oil Red O*

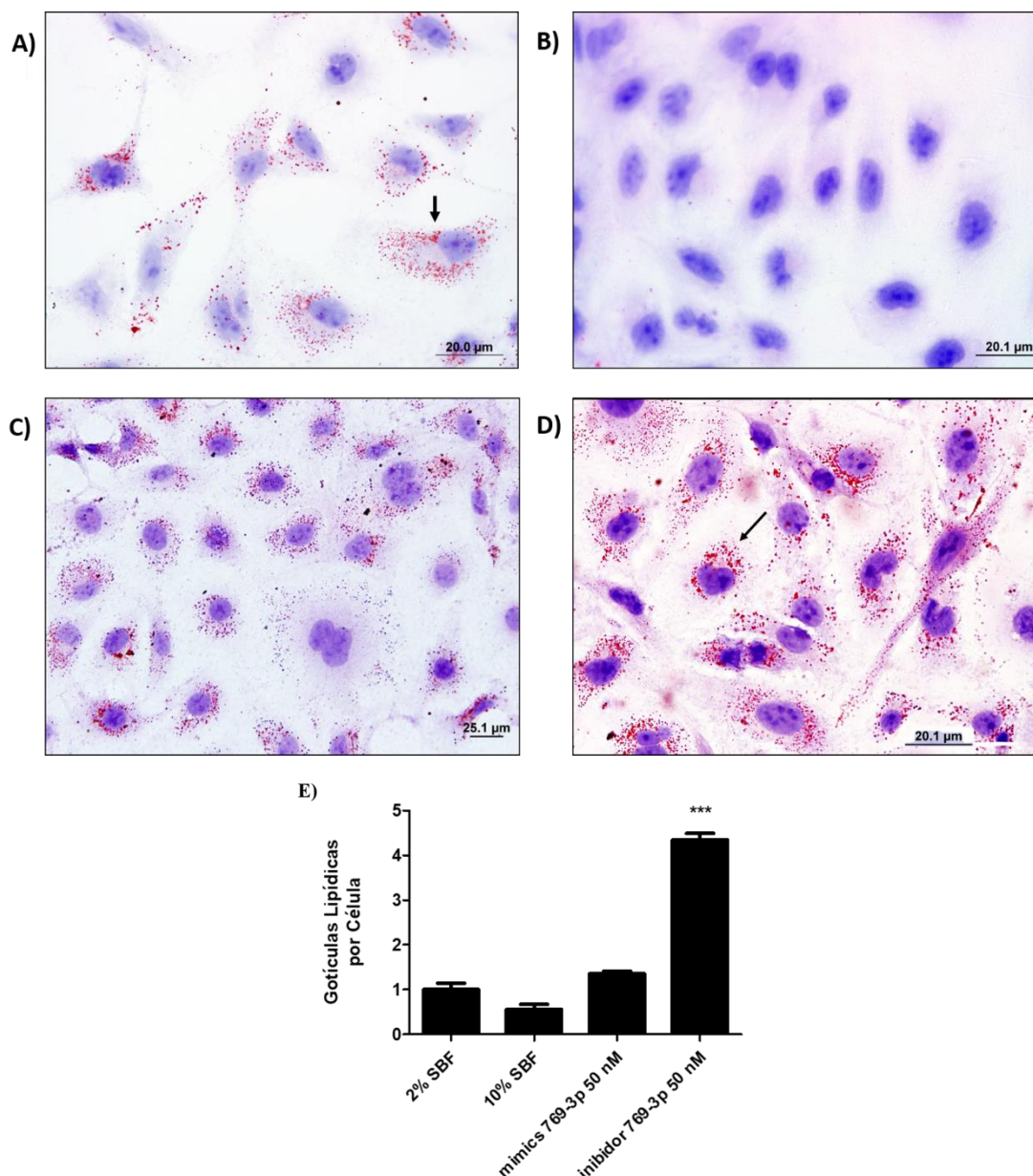
Para se avaliar o efeito das diferentes condições de cultivo e das moléculas mímicas e inibidoras do miRNA, primeiramente foram realizados ensaios de marcação de gotículas lipídicas com *Oil Red O*. Esse ensaio foi realizado, considerando-se que as gotículas reduzem em número e tamanho quando da transdiferenciação celular do estado quiescente ao ativado (YONEDA et al., 2016). Segundo Puche, Saiman e Friedman (2013) e Anthony et al. (2010), as células estreladas hepáticas de mamíferos se caracterizam como grandes armazenadoras de gotículas de vitamina A (retinóide) em sua condição quiescente em um fígado saudável. Entretanto, quando a célula sofre lesões e se transdiferencia para um fenótipo ativado, ocorre a perda de retinóides. Essa modificação lipídica pode ser observada na marcação de gotículas lipídicas realizada, as quais estão presentes na célula LX-2 quiescente e desaparecem nas células LX-2 ativadas (Figura 8).

Ao tratar as células com as moléculas mímicas ou inibidoras do miRNA-769-3p é observado o reaparecimento das gotículas lipídicas e um aumento no número das mesmas quando da comparação com as células quiescentes. Porém, esse aumento é significativo (\*\* $p < 0,0005$ ) apenas nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-769-3p, sugerindo que o miRNA-769-3p esteja envolvido na regulação de vias do metabolismo lipídico.

Apesar da presença das gotículas lipídicas nas células crescidas em condições saudáveis, uma excessiva presença das mesmas nas células pode indicar um ambiente celular desfavorável.

Segundo Currie et al. (2013), células com alta taxa proliferativa, apresentam alterações no metabolismo lipídico, sendo as células cancerígenas englobadas nessa classificação. Além disso, Ikura e Caldwell (2015) descrevem a alta quantidade de gotículas lipídicas como possível contribuição no desenvolvimento de desordens metabólicas relacionadas com o estresse oxidativo, o estresse do retículo endoplasmático e a resistência à insulina.

**Figura 8.** Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro em células LX-2.



A) LX-2 cultivada em 2% de SBF; B) LX-2 cultivada em 10% de SBF; C) LX-2 cultivada em 10% de SBF e na presença do mímico do miRNA-769-3p a 50 nM; D) LX-2 cultivada em 10% de SBF e na presença do inibidor do miRNA-769-3p a 50 nM. Gotículas lipídicas indicadas por seta. E) Quantificação relativa de gotículas lipídicas. Análise estatística



realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde  $***p \leq 0.0005$ ,  $**p \leq 0.005$  e  $*p \leq 0.05$ .

### **4.3. Análise de expressão gênica em reações de polimerase em cadeia**

Através da análise de gotículas lipídicas, foi possível observar a ocorrência de alterações metabólicas que podem sugerir a presença de transdiferenciação celular. Para melhor explorar o metabolismo celular frente aos miRNAs mímicos e inibidores, análise de mensuração de expressão gênica foram realizadas para genes marcadores moleculares de fibrose hepática, genes envolvidos com o estresse oxidativo e o processo apoptótico, genes envolvidos com o processo pró-inflamatório e genes relacionados com a via lipídica. O conjunto da análise permitiu uma melhor compreensão de particularidades funcionais do miRNA-769-3p no contexto da regulação funcional da fibrogênese hepática.

#### **4.3.1. Análises moleculares de genes marcadores moleculares de fibrose hepática**

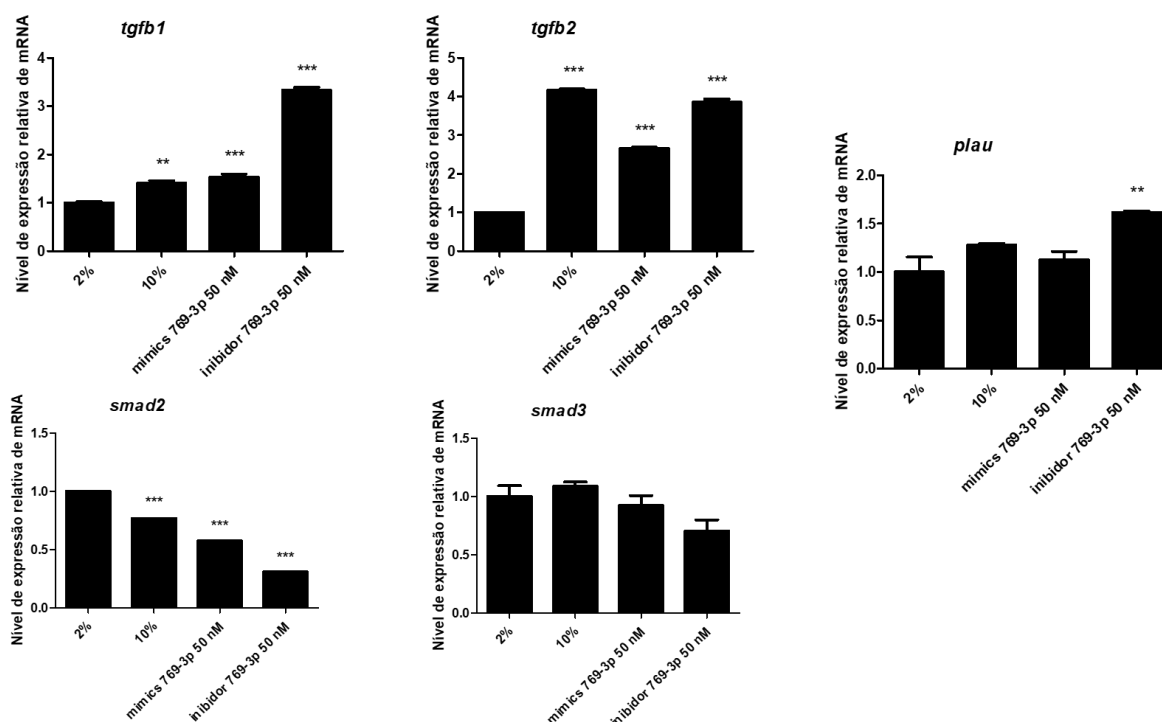
Diversos estudos vem relacionando o aparecimento da condição fibrosante no fígado com o aumento no nível de expressão de alguns genes específicos (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; ELPEK, 2014; WALLACE; FRIEDMAN; MANN, 2015). Nos resultados obtidos nas reações de polimerização em cadeia (Figura 9) é possível observar que o nível de expressão do fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (*tgf- $\beta 1$* ) tem um aumento significativo ( $**p < 0,005$ ) nas células cultivadas a 10% de SBF, nas células transfectadas com o mímico do miRNA-769-3p também houve um aumento significativo ( $***p < 0,0005$ ) em comparação com as células quiescentes – utilizadas como controle experimental. Entretanto, não houve diferença significativa entre a célula ativada e o mímico. Por sua vez, nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-769-3p, o resultado se mostra interessante, pois ocorre um aumento expressivo nos níveis transcricionais de *tgf- $\beta 1$*  em comparação com as células quiescentes ( $***p < 0,0005$ ), sugerindo que ao inibir a função do miRNA ocorre um desequilíbrio celular negativo à homeostase da LX-2. Os resultados do fator de crescimento transformador  $\beta 2$  (*tgf- $\beta 2$* ) demonstram que nas células cultivadas em 10% de SBF houve um grande aumento ( $***p < 0,0005$ ) no nível de expressão em comparação com as células quiescentes, nível que se mantém nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-769-3p ( $***p < 0,0005$ ). Entretanto, ao se transfectar as células com o mímico do miRNA-769-3p há um decaimento em seu nível de expressão, embora o mesmo continue apresentando diferença significativa com as células quiescentes ( $***p < 0,0005$ ). Esses resultados sugerem que o aumento do miRNA nas células auxiliaram na diminuição de *tgf- $\beta 2$* , possivelmente como uma forma de tentar buscar a

homeostase celular e uma diminuição do quadro pró-inflamatório que se estabelece anteriormente ao aparecimento do quadro pró-fibrosante.

Segundo Tu et al. (2014), o nível de expressão de *tgf-β* é aumentado em diversos modelos animais e pacientes humanos com fibrose hepática. A família TGF-β possui isoformas com atividades biológicas semelhantes no fígado, TGF-β1 e TGF-β2 que podem ser secretados por diversos tipos celulares estando envolvidos em várias funções como a proliferação e diferenciação celular, angiogênese e modificação da matriz extracelular. TGF-β1 atua no fígado como principal mediador pró-fibrogênico, sendo considerado o fator mais potente na aceleração fibrosante atuando na transdiferenciação das células estreladas hepáticas e favorecendo a síntese de MEC; o TGF-β2 também atua no processo fibrosante podendo induzir a expressão de marcadores fibróticos, contribuindo na proliferação celular e na expressão de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). (YU et al., 2016; PENG et al., 2017; ZOU et al., 2017). Nessa via fibrosante, TGF-β1 se liga ao seu receptor de tipo II (TβRII), recruta e ativa o receptor de tipo I (TβRI), que por sua vez, fosforila as proteínas SMAD family member 2 (SMAD2) e SMAD family member 3 (SMAD3) permitindo a transdução de sinais até a regulação de genes alvos no núcleo celular (TU et al., 2014). Baseando-se nessas informações, o nível de expressão dos genes das proteínas SMAD2 e SMAD3 também foram avaliados. *Smad2* apresenta um nível de expressão decrescente em células cultivadas a 10% de SBF, transfectadas com o mímico e com o inibidor, resultando em uma diminuição significativa (\*\*p<0,0005) em comparação com as células quiescentes. Por sua vez, *smad3* não apresenta diferença significativa entre os diversos tipos de cultivos celulares. Podemos inferir, a partir dos dados obtidos, que o miRNA-769-3p possa estar agindo na manutenção do ambiente celular, não permitindo que a célula entre em um desequilíbrio pró-fibrosante maior. Porém, a alta expressão de *tgf-β1* não apresenta sincronia com a expressão dos genes *smads 2* e *3*. Esse resultado pode ser explicado pelas diversas modificações pós-traducionais que a proteína pode sofrer, inativando-a alguma vezes, mas que colabora com a homeostasia celular. Cabe ainda uma observação de que na atividade funcional da via mediada pelas proteínas, TGF-β precisa ser ativada por mecanismos proteolíticos ou não, incluindo a atuação de proteases ativadores de plasminogênio tipo uroquinase (PLAU) e plasmina (PLAT) e metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e 9) (SFERRA et al., 2017). Nesse contexto, a investigação do ativador de plasminogênio uroquinase (PLAU), se fez importante, para confirmação da ativação de TGF-β. No gráfico do nível de expressão de *plau* é possível observar que as células ativadas e as células transfectadas com o mímico do miRNA-769-3p não apresentaram diferença significativa com as células quiescentes. Esse resultado sugere que nessas duas condições, outras proteases ativadoras podem estar atuando

na célula. Por sua vez, nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-769-3p é possível observar que houve diferença significativa (\*\* $p < 0,005$ ) em relação com as células quiescentes, evidenciando que nessa condição de cultivo PLAU pode estar atuando como ativadora de TGF- $\beta$ , o que coopera com o processamento da molécula (*tgf- $\beta$* ), cujo nível transcricional é alto.

**Figura 9.** Níveis relativos de expressão gênica de marcadores moleculares do processo fibrosante hepático: *tgf- $\beta$ 1*, *tgf- $\beta$ 2*, *smad2*, *smad3* e *plau*.



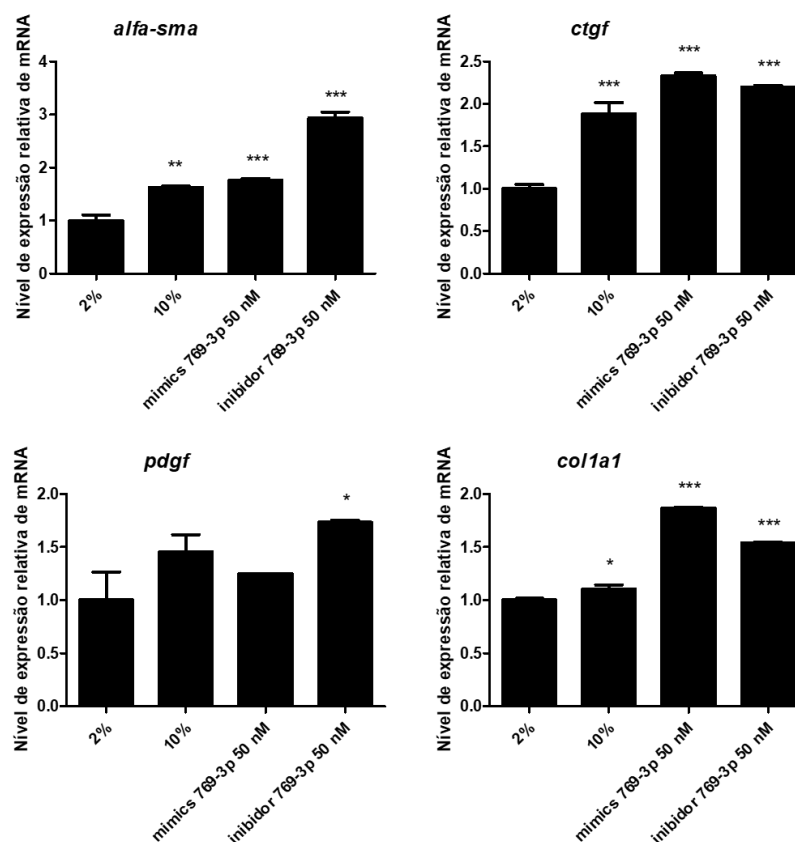
Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

Além dessas importantes moléculas, também foram avaliadas as expressões de outros genes: actina do músculo liso alfa ( *$\alpha$ -sma*), fator de crescimento do tecido conjuntivo (*ctgf*), fator de crescimento derivado de plaquetas (*pdgf*) e colágeno tipo 1 alfa 1 (*colla1*). A Figura 10 apresenta os resultados e são observados altos níveis de expressão dos genes apontados nas células fibrosadas. A figura ainda aponta uma mudança crescente no nível de expressão de  *$\alpha$ -sma* nas células ativadas, transfectadas com o mímico e com o inibidor do miRNA-769-3p em comparação com a célula quiescente. As três condições citadas tiveram um aumento significativo, todavia, o aumento de expressão que se mostra mais significativo é a inibição do miRNA que ocasiona uma grande elevação (\*\* $p < 0,0005$ ) no nível de expressão de  *$\alpha$ -sma*. No fígado lesionado, para transdiferenciação das células estreladas hepáticas em miofibroblastos,

a produção *de novo* de  $\alpha$ -SMA é essencial, pois, está inteiramente relacionada com o aumento de motilidade e contratilidade celular, além desse papel, também desempenha importante função em outros processos na célula como mobilidade celular e divisão celular (ROCKEY; WEYMOUTH; SHI, 2013). Dessa forma, podemos inferir que o miRNA pode ter uma função na manutenção das células ativadas, pois ao inibi-lo se observa um alto aumento de  $\alpha$ -sma, correspondente a alta contratilidade e mobilidade celular e possivelmente a um maior número de células ativadas.

Ainda, as análises demonstram que *ctgf* apresenta um aumento significativo (\*\* $p < 0,0005$ ) entre as três condições ativadas e as células quiescentes e *pdgf* apenas apresenta diferença significativa nas células transfectadas com o inibidor do miRNA (\* $p < 0,05$ ). Ambos os genes são descritos como importantes no desenvolvimento da fibrose hepática na literatura, *ctgf* é expresso em níveis baixos em condições quiescentes, entretanto o aumento da expressão é presente nas culturas crescidas em condições pró-fibrosantes. As vias de atuação do CTGF podem ser diversas como auxílio na proliferação celular, migração, adesão, sobrevivência e produção de matriz extracelular, contribuindo, desta forma, para o quadro fibrogênico. Por sua vez, PDGF possui funções importantes na proliferação e sobrevivência celular, angiogênese, migração celular, reorganização do citoesqueleto e produção de elementos da MEC do tecido conjuntivo (WANG et al., 2011; BORKHAM-KAMPHORST; WEISKIRCHEN, 2016). Entretanto, quando da comparação das células transfectadas com as células ativadas, em ambos os genes, não é possível observar diferença estatisticamente significativa, sugerindo que a alteração no nível de expressão pode ser resultado do cultivo em 10% de SBF e não da regulação pelo miRNA. Outra característica do processo fibroso é a acumulação de colágeno, principalmente o colágeno de tipo I, nesse caso, se observa que ao transfectar a célula com mímico e com o inibidor, houve um aumento significativo (\*\* $p < 0,0005$ ) no nível de expressão de *colla1* em comparação com as células quiescentes, sugerindo que o miRNA possa estar regulando a expressão de colágeno.

**Figura 10.** Níveis relativos de expressão gênica de marcadores moleculares do processo fibrosante hepático: *α-sma*, *ctgf*, *pdgf*, *col1a1*.



Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

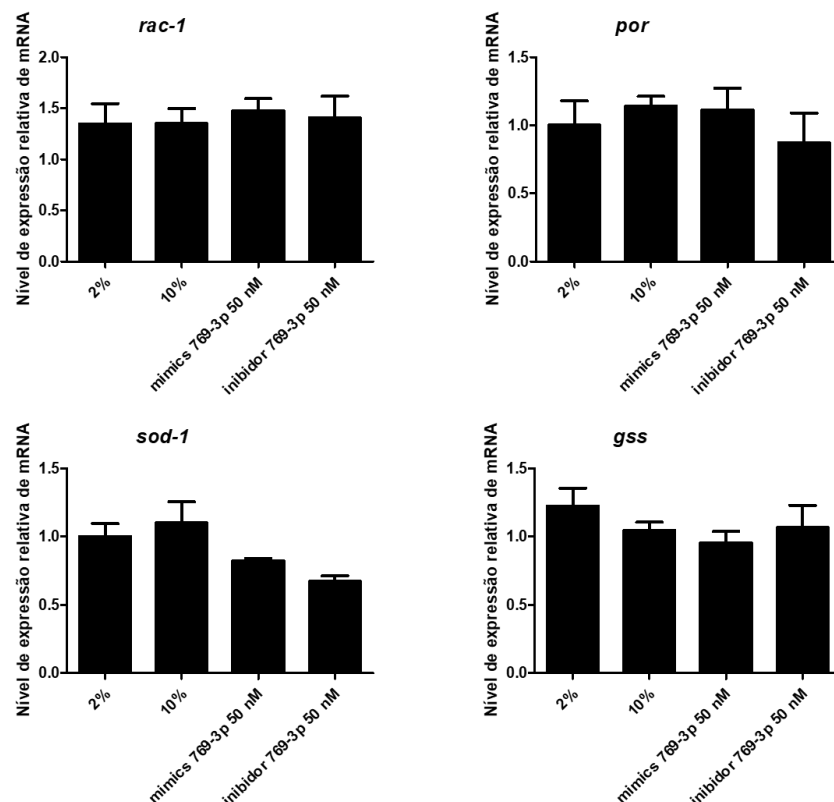
#### 4.3.2. Análises moleculares de genes correlatos ao processo de estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma via importante de ser estudada, considerando-se que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionada a diversos processos patológicos. Além disso, a produção de EROS pode induzir a acumulação de gotículas lipídicas em cultura celular e ativar várias citocinas e fatores de crescimento (TOVMASYAN; REBOUCAS; BENOVA, 2014; LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015; RICHTER; KIETZMANN, 2016). A formação de EROS pode acontecer em resposta a diversas situações como níveis insuficientes de antioxidantes, radiação ionizante e produtos químicos tóxicos, além de poder ser produzido mais facilmente por enzimas das famílias do citocromo P450, xantina oxidoreductase, lipoxigenase e NADPH oxidase (LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015; RICHTER; KIETZMANN, 2016). Nesse contexto, foram escolhidos alguns genes importantes no estresse oxidativo. Ras-related C3 botulinum toxin substrate (*rac-1*), que pertence a família Rho de pequenas GTPases, que além de estar envolvida na produção

de EROs, também apresenta função na migração celular, perda de adesão e invasão celular (LIU et al., 2017); citocromo P450 oxidoreductase (*por*) se caracteriza como um doador de elétrons obrigatório para os citocromos P450, o qual se caracteriza como uma importante fonte de EROs (PORTER et al., 2011; DONG et al., 2013). Entretanto, os resultados obtidos com a investigação do nível de expressão destes genes não demonstraram diferença significativa entre as quatro condições estudadas, indicando que possivelmente a célula não está em estresse oxidativo e o miRNA não atua sobre esses genes (Figura 11).

Além de genes envolvidos com a produção de EROs, também foram investigados genes conhecidos por antioxidantes, como superóxido dismutase (*sod-1*) e glutathione sintetase (*gss*). SOD-1 é uma enzima conhecida por catalisar a reação de formação de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, impedindo a formação de outras EROs (SMYTH et al., 2008; MILLER, 2011). GSS é conhecida pela síntese de glutathione que protege as células do estresse oxidativo, além de atuar na desintoxificação de xenobióticos (USHIDA et al., 2009). Assim como os resultados acima, esses dois genes não apresentaram diferença significativa entre as condições, corroborando com a hipótese de que a célula não está em estresse oxidativo (Figura 11).

**Figura 11.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com o estresse oxidativo: *rac1*, *por*, *sod-1* e *gss*.



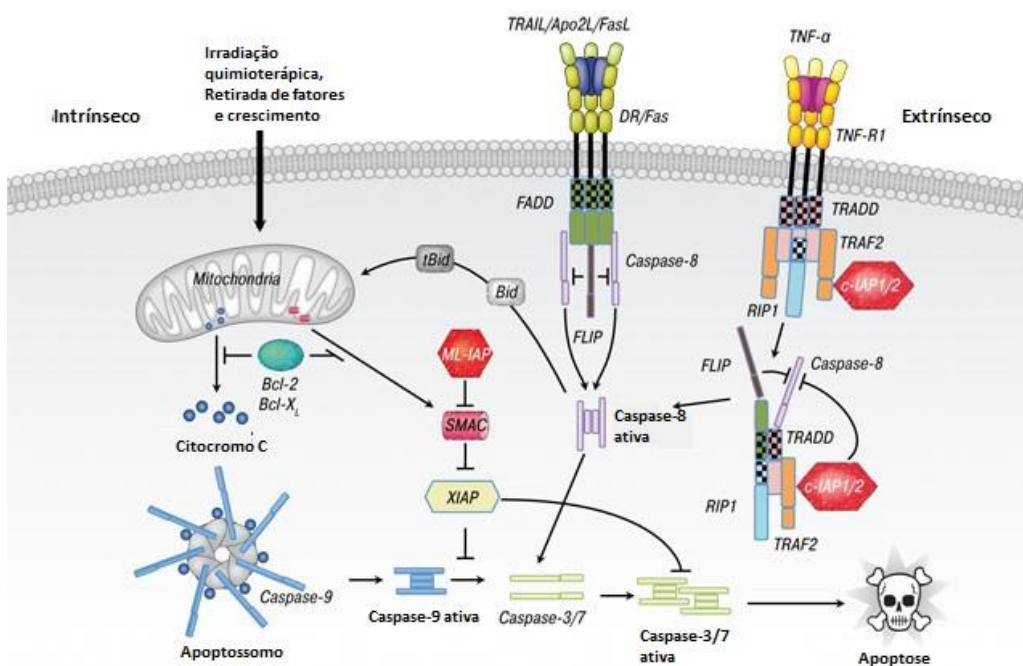
Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.3.3. Análise da expressão de genes correlatos ao processo apoptótico

Injúrias provenientes de insultos tóxicos ou inflamatórios podem levar a ativação da morte celular programada, também nomeada apoptose. Assim, investigar os efeitos do miRNA-769-3p na expressão desses genes é importante. Além disso, segundo Luo et al. (2014), a superexpressão do miRNA-769-3p possui uma função relevante na inibição de proliferação celular e na indução de apoptose em células de câncer de mama; assim, a verificação desta função no fígado se fez pertinente. A apoptose pode ocorrer através de ativação via extrínseca (receptores de morte) ou através da via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca envolve a ativação de um receptor de morte, como o receptor de morte de superfície celular Fas (FAS), por um ligante, resultando na formação do complexo de sinalização indutora de morte (DISC). DISC cliva procaspase-8, ativando-a em caspase-8, que, por sua vez, ativará as caspases efetoras 3 e 7 iniciando o processo apoptótico (Figura 12) (FEUTH et al., 2014). A via intrínseca é ativada em resposta a estressores intracelulares, como diminuição nos fatores de crescimento

ou danos no DNA. Esses estressores desencadeiam uma permeabilização na membrana mitocondrial, que facilita a liberação de fatores pró-apoptóticos como citocromo c e BCL2 associado X, regulador de apoptose (BAX). Tais fatores pró-apoptóticos estimulam a formação do apoptossomo, o qual recruta caspase-9 e inicia assim a cascata proteolítica que leva ao processo apoptótico (WU; BRATTON, 2013).

**Figura 12.** Esquema das vias intrínseca e extrínseca do processo apoptótico.



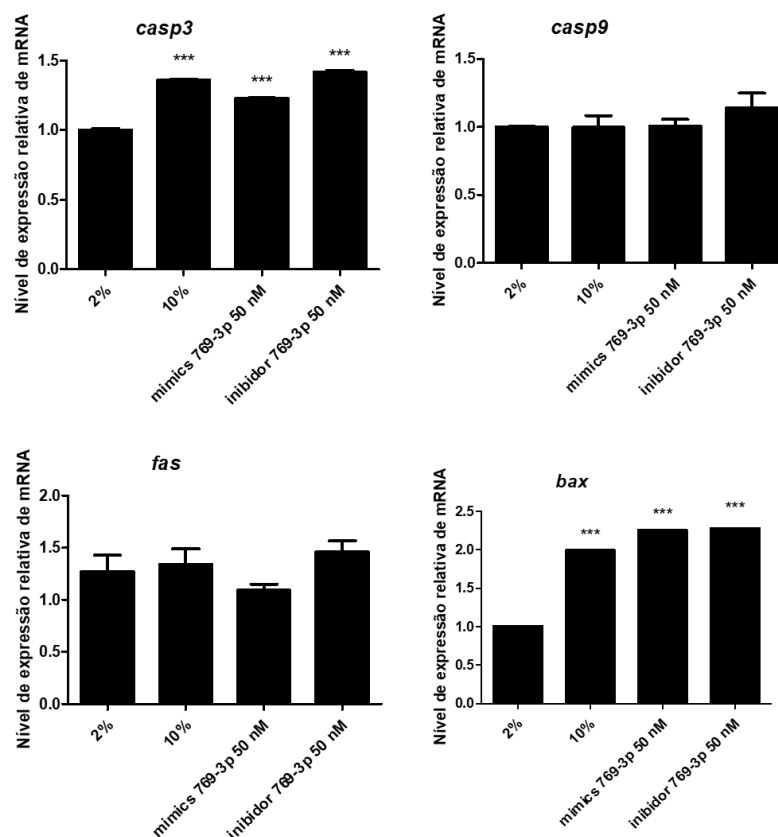
Adaptado de Almagro e Vucic (2012).

Dessa forma, genes relacionados com o processo apoptótico foram selecionados (*caspase3*, *caspase9*, *fas* e *bax*) e os resultados são mostrados na Figura 13. *Caspase-3* mostrou um aumento significativo (\*\* $p < 0,0005$ ) nas células ativadas e nas transfectadas com o mímico e com o inibidor do miRNA. Entretanto, em comparação com as células ativadas, as células transfectadas com o mímico apresentaram um leve decaimento no nível de expressão. Por sua vez, o nível de expressão de *caspase-9* não mostrou diferença estatística significativa entre as quatro condições de cultivo. As caspases são proteases conhecidas pela função específica na apoptose e podem ser divididas em dois grupos: as caspases iniciais, como a -2,-8,-9 e -10 e as caspases efetoras como -3 e -7 (KIM; SRIVASTAVA; KIM, 2014). A caspase-3 é considerada um importante fator de ativação da apoptose, sendo muito utilizada para a verificação da existência de mecanismos de morte celular programada. Por sua vez, essa caspase-3 pode ser regulada por diversas modificações pós-traducionais, tanto de forma positiva quanto negativa.



Uma das modificações pós-traducionais conhecida é a ação da proteína quinase C, delta (PKC $\delta$ ) na fosforilação da caspase-3 e consequentemente no aumento de sua atividade (PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013; WU et al., 2016). Desta forma, é possível sugerir que o alto nível de expressão deste gene, pode estar envolvido com outras vias ou com modificações pós-traducionais, pois os níveis de *caspase-9* não demonstram um processo apoptótico ativo. Os outros genes investigados foram *fas* e *bax*. O primeiro, receptor de morte atuante na via apoptótica extrínseca, não demonstrou resultados significativos entre as quatro condições do estudo. Enquanto *bax*, gene da proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2, apresenta um aumento significativo (\*\*p<0,0005) entre as células ativadas, as transfectadas com o mímico e as com o inibidor em comparação com a célula quiescente. Esse resultado demonstra que o miRNA possa estar atuando na ativação desta proteína, porém, a ativação da caspase-9 para início da apoptose oriunda de BAX depende da razão entre BAX e BCL-2 – proteína anti-apoptótica. Nesse caso, o aumento de BAX e a diminuição de BCL-2 estimula a liberação de citocromo c e ativa caspase-9 (WU et al., 2016), dessa forma, não é possível inferir se o aumento em *bax* estaria relacionado com o início do processo apoptótico.

**Figura 13.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com o processo apoptótico: *casp3*, *casp9*, *fas* e *bax*.



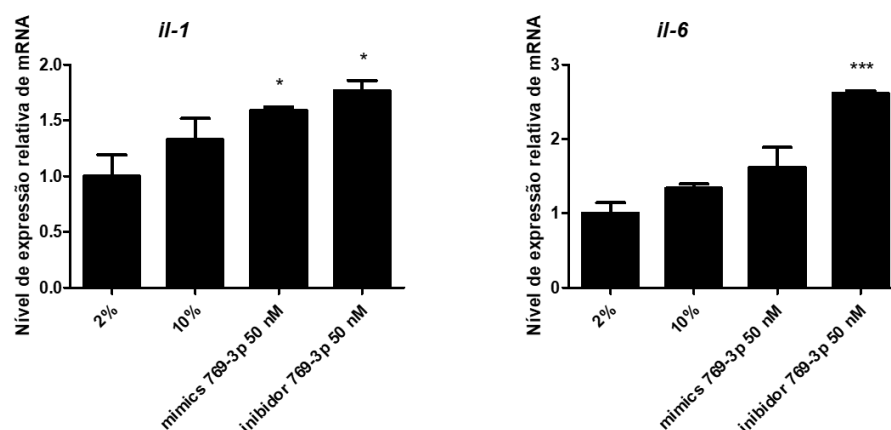
Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.3.4. Análise da expressão de genes correlatos ao processo pró-inflamatório

Como descrito anteriormente, todo processo fibrosante é precedido por um mecanismo inflamatório. Assim, para se averiguar a conexão desses mecanismos em nosso modelo celular, alguns genes de inflamação foram selecionados como: interleucina-1 (*il-1*), interleucina-6 (*il-6*), ciclooxigenase-2 (*cox-2*), fosfatase homóloga à tensina (*pten*), serina-treonina quinase 1 (*akt1*), fator nuclear kappa B (*nf-Kb*) e forkhead box O1 (*foxo1*). Os resultados obtidos para *il-1* e *il-6* estão presentes na Figura 14. Interleucina-1 (IL-1) é conhecida por seu papel central em várias doenças auto-inflamatórias e pelo controle das reações pró-inflamatórias em resposta à injúrias teciduais (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010). Estudos realizados por Gieling, Wallace e Han, (2009) e por Weber, Wasiliew e Kracht, (2010) indicam seu papel na indução de múltiplas metaloproteinases, na possível provocação da ativação de células esteladas hepáticas ao induzir a produção de fibronectina e na ativação de genes como *nf-κB* e *cox-2*. É

possível observar na Fig. 14 que houve um aumento significativo ( $*p < 0,005$ ) entre as células transfectadas com o mímico e com as transfectadas com o inibidor do miRNA em comparação com a célula quiescente. Porém, ao comparar ambas com as células ativadas, não é observada diferença significativa, indicando que as diferenças apresentadas podem ser ocasionadas pela condição de cultivo a que essas células estão inseridas, dessa forma é possível inferir que o miRNA não está atuando no nível de expressão de *il-1*. Ao verificarmos interleucina-6 (*il-6*), uma importante citocina pró-inflamatória que possui diversas funções como a regulação da fase aguda da inflamação, resposta imune, hematopoiese e crescimento celular (ATAIE-KACHOIE et al., 2014), verificamos que a mesma apresenta um aumento significativo ( $***p < 0,0005$ ) quando ocorre a inibição do miRNA em relação ao grupo quiescente. Segundo Ataie-kachoie et al. (2014), a citocina IL-6 está envolvida na manutenção da inflamação, mantendo a produção de vários mediadores inflamatórios, como outras citocinas, prostaglandinas e EROs, além disso, níveis elevados de IL-6 são distinguíveis como um indicador de neoplasias malignas, ocorrendo principalmente pelas vias de sinalização JAK/STAT3, Ras/MAPK e PI3K/AKT (ATAIE-KACHOIE et al., 2014).

**Figura 14.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com processo pró-inflamatório: *il-1* e *il-6*.



Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ .

Cheng et al. (2013), demonstraram em seu estudo com esteatose hepática não-alcoólica que a alta expressão de IL-6 pode coincidir com uma indução de COX-2 para produção de prostaglandinas. Para se corroborar essas análises, a expressão do gene da proteína COX-2 (também conhecido como *ptgs2*) foi investigada demonstrando um resultado interessante. É observado na Figura 15, um aumento exacerbado ( $***p < 0,0005$ ) de *cox-2* nas células

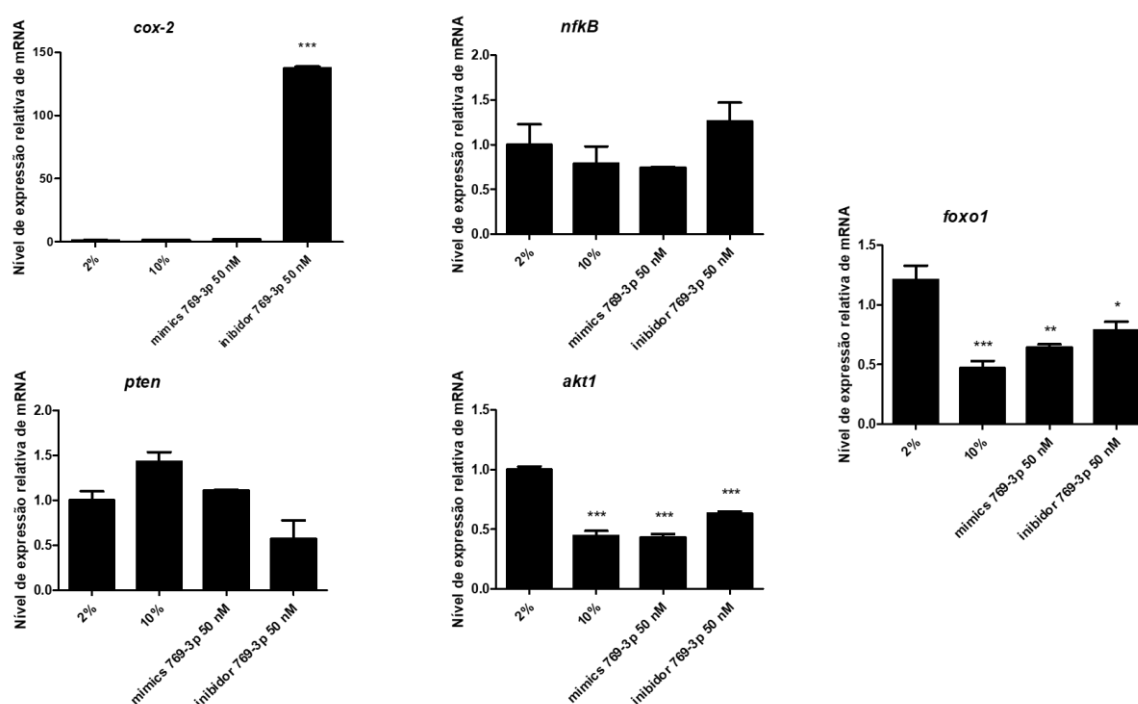
transfectadas com o inibidor do miRNA-769-3p, sugerindo uma alta regulação do mesmo no processo pró-inflamatório. Ao continuar a investigação das vias correlatas aos mecanismo pró-inflamatórios, foram investigados os genes do fator nuclear kappa B (*nf-κB*), que se caracteriza como um fator de transcrição envolvido no controle da resposta ao estresse, na regulação do ciclo celular, no controle da apoptose e na resposta inflamação (WANG et al., 2011), fosfatase homóloga à tensina (*pten*) – uma fosfatase lipídica e proteica que controla a ativação de AKT, aparecendo frequentemente em câncer de fígado com baixa expressão por causa de mutações (MORRIS et al., 2014) e serina-treonina quinase 1 (*akt1*), responsável pela regulação de diversas funções celulares como sobrevivência e proliferação celular, diferenciação e pelo metabolismo intermediário (ARRANZ et al., 2012). A análise dos genes *nf-κB* e *pten* não demonstra aumento estatístico significativo entre as quatro condições de estudo, sugerindo que os mesmos não estão participando dos mecanismos de transativação das células LX-2 e na formação de um ambiente pró-inflamatório. Por sua vez, *akt1* apresenta uma diminuição em seu nível de expressão nas células ativadas e transfectadas, indicando que o microRNA-769-3p não ativa *cox-2* através desta via.

Outra proteína importante no processo pró-inflamatório é FOXO1, o qual desempenha funções em diversos processos celulares como proliferação, apoptose, autofagia, metabolismo, resistência ao estresse e inflamação (WANG; ZHOU; GRAVES, 2014). Na análise de sua expressão gênica é observado uma diminuição significativa (\*\*p<0,0005) na expressão gênica da condição ativada, (\*\*p<0,005) da condição transfectada com mimico e (\*p<0,05) com inibidor do miRNA em comparação com a condição quiescente. Todavia, ao se comparar as células transfectadas com a condição ativada, não ocorre diferença significativa entre elas, indicando que a diferença na expressão gênica pode estar ocorrendo por influência da quantidade de soro (10%) utilizada no cultivo, que transdiferencia a célula.

Estudos apontam que a alta expressão de COX-2 corrobora com um alto processo inflamatório (QIU, 2002; CHENG et al., 2013). Frequentemente é observado que COX-2 se encontra superexpresso nos estágios iniciais de hepatocarcinoma, cirrose ou hepatite crônica. Os dados obtidos na análise demonstram que nas células ativadas e nas transfectadas com o mimico não são observados níveis elevados de *cox-2*, o que sugere um controle de mecanismos pró-inflamatórios, o que reforça a hipótese de atuação do miRNA na regulação do processo pró-inflamatório. Em tecidos hepáticos de ratos com esteatose, Cheng et al. (2013) demonstraram que o aumento da proteína COX-2 estava relacionado com o local onde houve aumento de formação das gotículas lipídicas. Além disso, também demonstraram a possibilidade de indução de COX-2 através de IL-6, que pode atuar como regulador ou co-regulador da proteína

(CHENG et al., 2013). A partir destes dados, é possível sugerir que a regulação de *cox-2* no presente trabalho possa estar ocorrendo através de *il-6*, além de estar extremamente relacionada com a quantidade lipídica presente. Os mesmos autores ainda apontam um importante papel regulador do miRNA-769-3p no controle do processo pró-inflamatório. Porém, mais estudos ainda são necessários para se detalhar a ativação da regulação de *cox-2* na transdiferenciação das células LX-2 e o papel do miRNA-769-3p nessa modulação.

**Figura 15.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com processo pró-inflamatório: *cox-2*, *nf-κB*, *pten*, *akt1* e *foxo1*.



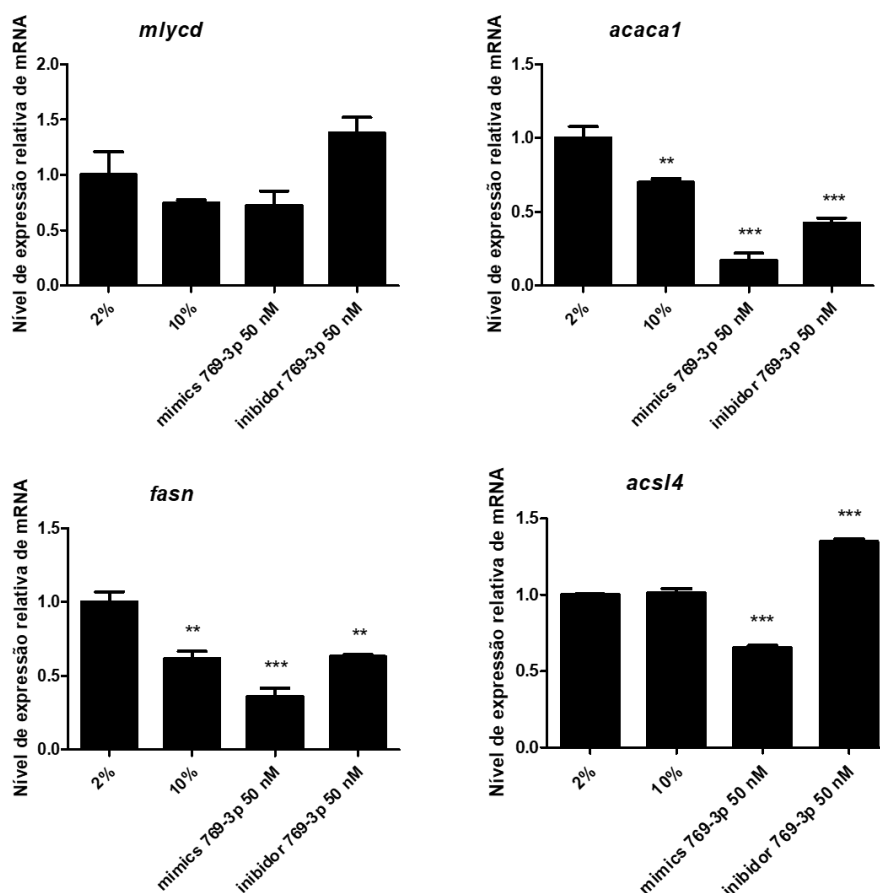
Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.3.5. Análise da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos

As gotículas lipídicas são locais de armazenamento de lipídeos neutros na célula, como triacilgliceróis, estéril ester e retinilester. A síntese de lipídeos é regulada por diversas enzimas tais como acil-CoA sintetase de cadeia longa 4 (ACSL4), malonil-CoA descarboxilase (MLYCD), acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA1) e ácido graxo sintase (FASN) (CURRIE et al., 2013; WELTE, 2015). Um importante fator para a síntese de lipídeos é a presença de acetil-CoA livre, a qual pode ser oriunda do citrato citoplasmático através da enzima ATP citrato liase (ACLY) ou pode ser originada também pela conversão de malonil-CoA para acetil-CoA pela

enzima MLYCD. Esta última reação ocorre em via dupla, ou seja, a concentração de ACACA1 também é importante na célula, pois a mesma catalisa a reação de acetil-CoA para malonil-CoA (CURRIE et al., 2013) (Fig. 4). Com uma quantidade suficiente de acetil-CoA no ambiente celular, favorece-se a síntese de ácidos graxos com o auxílio da enzima FASN, que catalisa a síntese de ácido graxo proveniente de malonil-CoA (CURRIE et al., 2013; LONG et al., 2014). Ao observar o nível de expressão de *mlycd* e *acaca1* na Figura 16 é possível identificar que não houve diferença significativa na expressão de *mlycd*, enquanto *acaca1* teve em geral uma diminuição significativa (\*\* $p < 0,005$  para as células ativadas e \*\*\* $p < 0,0005$  para as células transfectadas), em comparação com a célula quiescente. Essa diminuição correlaciona-se com o aumento de gorduras presentes no soro, inibindo a ativação de *fasn* (WANG, 2010), independentemente da presença ou ausência das moléculas mimetizadoras e/ ou inibidoras. Seguindo ainda a via lipídica, a enzima ACSL4 é importante na ativação dos ácidos graxos através da adição de um grupamento acil-CoA, para que os mesmos possam ser reaproveitados em reações de  $\beta$ -oxidação e/ ou para síntese de novas moléculas. Nas análises realizadas, o nível de expressão de *acsl4*, diminui nas culturas transfectadas com o miRNA-mímico e aumentam nas culturas transfectadas com o inibidor (\*\*\* $p < 0,0005$ ). Esse resultado pode ser explicado de maneira interconectada com a observação dos resultados das análises correlatas a presença do estímulo pró-inflamatório, responsável pela liberação de ácidos graxos livres como o ácido araquidônico. Kan et al. (2014) descrevem em seu estudo que o metabolismo de ACSL4 possui afinidade pelo ácido araquidônico, que por sua vez caracteriza-se como um elemento central na via do metabolismo pró-inflamatório (HARDWICK et al., 2013). Assim, baseado no conjunto dos resultados pode-se sugerir que o miRNA-769-3p possa estar atuando na célula como um fator controlador dos processos pró-inflamatórios, impedindo à piora do quadro pró-inflamatório da patologia.

**Figura 16.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com metabolismo de lipídeos: *mlycd*, *acaca1*, *fasn*, *acsl4*.



Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

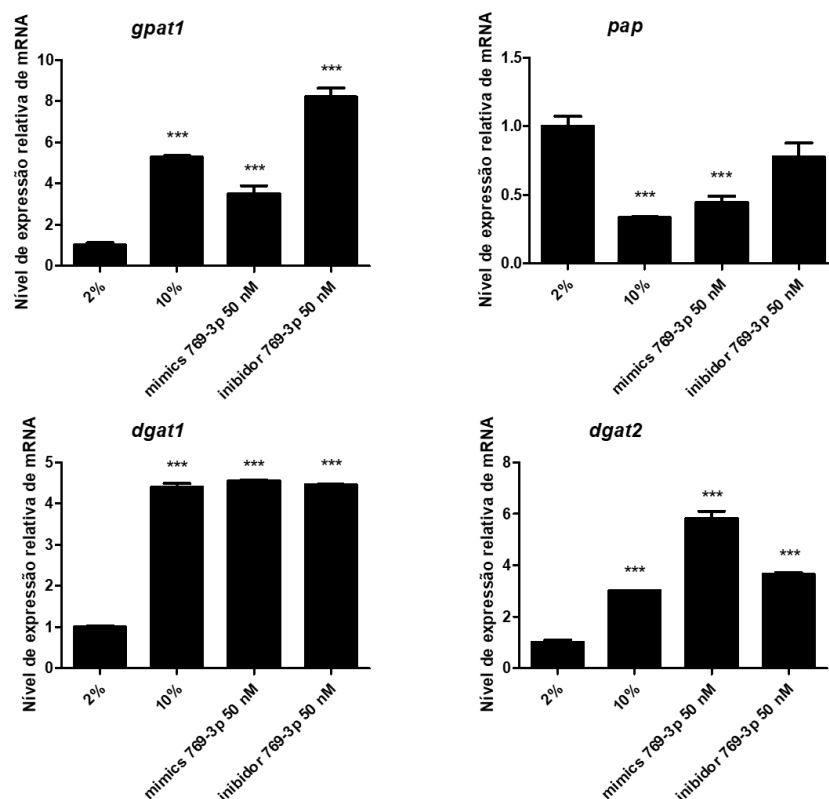
Após a síntese de lipídeos, eles podem ser convertidos em moléculas sinalizadoras, utilizados para a construção da membrana lipídica, além de serem armazenados ou degradados para a obtenção de energia (CURRIE et al., 2013). A enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT1) é a primeira na via de armazenamento através do retículo endoplasmático e a responsável pela esterificação de acil-CoA graxo de cadeia longa em uma cadeia de glicerol-3-fosfato (WENDEL et al., 2013). Ao observar na Figura 17, o padrão do nível de expressão de *gpat1* nas células é possível reconhecer que houve um aumento significativo (\*\* $p < 0.0005$ ) entre as células quiescentes e as células crescidas a 10% de SBF e este aumento se demonstra mais significativo ainda nas células transfectadas com o inibidor do miRNA. O alto nível de expressão de *gpat1* nesta condição de cultivo pode ter ocorrido pelo alto nível de *acsl4* nesta condição, pois, neste caso, um aumento em acil-CoA graxo de cadeia longa proveniente de ACSL4 resulta em uma maior quantidade de glicerol-3-fosfato. Em seguida, a enzima lipina (PAP) catalisa a conversão de diacilglicerol (DAG) oriundo de ácido fosfatídico (PA). Porém,

o nível de expressão de *pap* diminuiu nas células ativadas e transfectadas com o cómiico (\*\**p*<0,0005) e teve um leve aumento nas células transfectadas com o inibidor, demonstrando que ao inibir o miRNA o nível de expressão desta enzima equivale ao da célula quiescente.

As enzimas diacil-glicerol aciltransferase (DGAT) são responsáveis pela esterificação de diacilglicerol e acil-CoA graxo para a formação de triacilgliceróis (TGs). Nos mamíferos é possível encontrar duas enzimas diacil-glicerol aciltransferase 1 (DGAT1) e diacil-glicerol aciltransferase 2 (DGAT2) (WELTE, 2015). O nível de expressão de *dgat1* demonstrado na Figura 17 aumenta significativamente (\*\**p*<0,0005) entre o grupo quiescente e os demais grupos. Todavia, ao compararmos as células ativadas com as células transfectadas com o cómiico e o inibidor, não há diferença estatística, sugerindo que a alta expressão gênica é proveniente do meio em que a célula está inserida, que contém 10% de soro. Por sua vez, o nível de expressão de *dgat2* demonstra um aumento significativo (\*\**p*<0,0005) das células ativadas, transfectadas com o cómiico e com o inibidor em comparação com o grupo de células quiescentes. Em *dgat2*, ao comparar as células transfectadas com o inibidor e as células ativadas não há diferença significativa no nível de expressão, porém, as células transfectadas com o cómiico apresentam um aumento significativo no seu nível de expressão em comparação com as células ativadas. Esse resultado pode ser explicado pela diminuição de *gpat1* na mesma condição celular, o que ocasiona uma menor conversão de acil-CoA graxo em glicerol-3-fosfato, possibilitando que o acil-CoA graxo siga livremente para a via de esterificação para formação de TAG catalisada pela DGAT2.



**Figura 17.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com metabolismo de lipídeos: *gpat1*, *pap*, *dgat1* e *dgat2*.



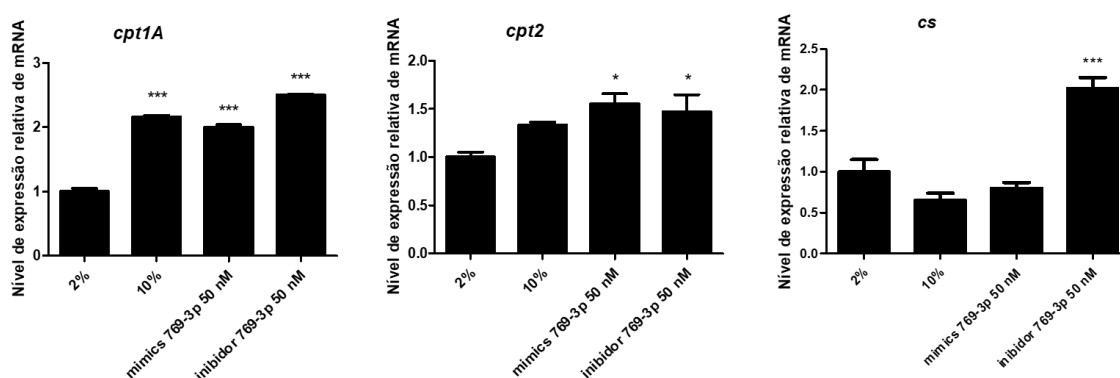
Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

Além das vias de síntese dos lipídeos, outras moléculas se correlacionam com a degradação desses metabólitos visando a liberação de energia para a manutenção dos processos fisiológicos celulares e para tal o metabolismo mitocondrial é relevante. Dentro desse contexto, a expressão de alguns outros genes foram investigados. As enzimas carnitinapalmitoil-transferases (CPTs) são responsáveis pelo transporte de ácidos graxos para a mitocôndria, onde ocorrerá a oxidação dos mesmos (CURRIE et al., 2013). Os resultados obtidos demonstram que apesar de carnitinapalmitoil-transferase 2 (*cpt2*) apresentar pequena diferença estatística significativa (\* $p < 0,05$ ) entre o grupo de células quiescentes e os grupos transfectados com o mímico e com o inibidor, o mesmo não ocorre com o grupo de células ativadas, indicando que o aumento presente neste caso é pelo ambiente em que a célula se insere. Por sua vez, carnitinapalmitoil-transferase 1 (*cpt1A*) apresenta um resultado interessante, demonstrando um aumento significativo (\*\*\*) entre o grupo quiescente e os grupos celulares cultivados na presença de 10% de SBF. Nenhuma observação relevante foi observada entre as células ativadas e as transfectadas com o mímico. Nas células transfectadas com o inibidor houve um

aumento significativo na expressão do gene *cpt1A*, tanto em relação a cultura quiescente, como em relação a cultura ativada. Esse resultado sugere a facilitação de um maior metabolismo oxidativo, que pode estar conectado a processos de estresse celular nas culturas ativadas transfectadas ou não.

A enzima citrato sintase (CS) conhecida por ser uma das primeiras enzimas do ciclo do ácido cítrico e catalisar a conversão de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato e coenzima A (CoA) (ALEKSANDROV; ZVEREVA; FIELD, 2014) tem sua investigação importante neste estudo como um indicativo do metabolismo aeróbico. A formação de citrato ocorre na membrana mitocondrial, quando seus níveis estão muito altos, o mesmo é encontrado também no citoplasma, se tornando substrato de ACLY e seguindo para o metabolismo lipídico (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Os resultados corroboram com o esperado, pois há um aumento significativo de *cs* ( $***p < 0,0005$ ) entre as células transfectadas com o inibidor e o grupo de células quiescentes. O resultado indica que a inibição do miRNA parece originar um alto metabolismo celular aeróbio e o aumento no nível de expressão de *cs* sugeriria uma alta concentração de citrato a nível celular que poderia ser encaminhado para o metabolismo lipídico. Todavia, para afirmar sobre a concentração celular de citrato, seriam necessários mais ensaios específicos.

**Figura 18.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com metabolismo oxidativo de lipídeos: *cpt1A*, *cpt2* e *cs*.

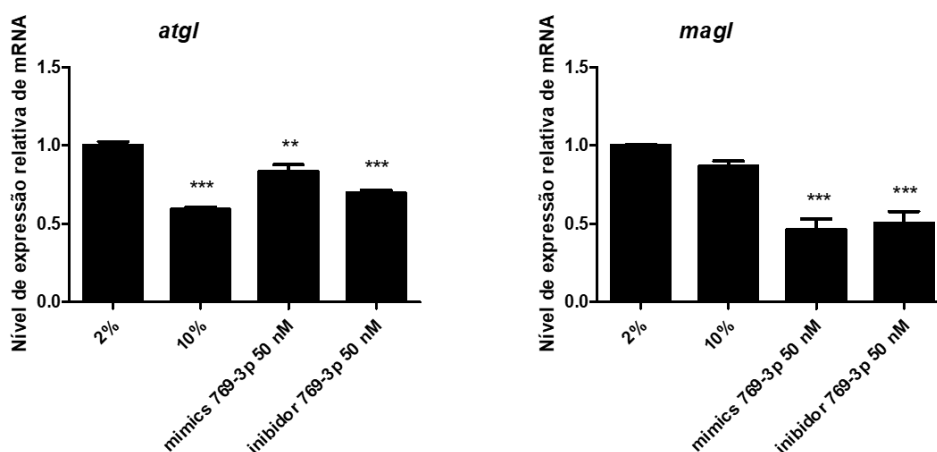


Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ .

Em momentos de escassez, o organismo pode lisar as gotículas lipídicas para utilização através de lipólise, resultando assim em lipídeos importantes na sinalização celular. Entre as enzimas responsáveis por esse processo estão a lipase de triglicerídeos de tecido adiposo (ATGL) e a lipase de monoacilgliceróis (MAGL). ATGL é conhecida como a principal lipase

hepática, pois catalisa o passo inicial da degradação lipídica. Segundo Currie et al. (2013), seus níveis de expressão se apresentam elevados em caquexia, por sua vez, MAGL catalisa a etapa final, hidrolisando o monoacilglicerol em cadeia de glicerol, além de estar relacionado em casos de câncer com o aumento de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), relacionada com o aumento de invasão e migração tumoral (MALOBERTI et al., 2010; CURRIE et al., 2013; MASHEK et al., 2015). Na Figura 19, os níveis de expressão de ambas as lipases apresentam uma diminuição entre as células transfectadas com o cópico e com o inibidor em comparação com o grupo de células quiescentes. Este resultado é interessante, pois um aumento no nível de *cox-2* pode ocasionar um aumento no nível de PGE<sub>2</sub>, entretanto, é observado que o nível de *magl* diminui quando ocorre a inibição do microRNA, sugerindo que o miRNA não atua nesta via de degradação lipídica.

**Figura 19.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com metabolismo de lipídeos: *atgl* e *magl*.



Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

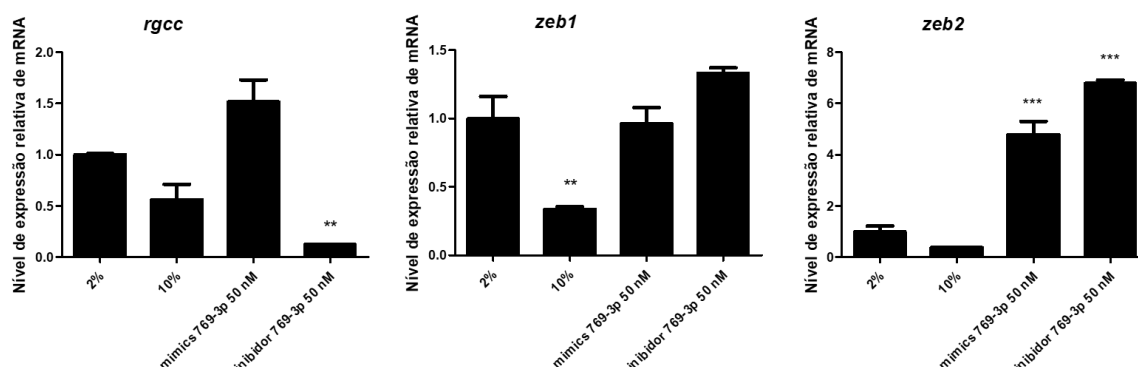
Segundo Xu, Zhang e Liu (2017), existem diversas vias de crescimento de gotículas lipídicas, sendo a principal oriunda de biogênese no retículo endoplasmático a partir de TAG, porém, estudos com fibroblastos de ratos demonstraram o crescimento das gotículas de lipídeos de maneira independente da síntese de TAG. Estes resultados sugerem que a presença de gotículas lipídicas nas células transfectadas com o cópico e com o inibidor do miRNA possa ser proveniente de uma via independente de TAG.

#### 4.3.6. Análise da expressão de genes correlatos ao ciclo celular e à transição epitélio-mesenquimal

A indicação de que vários genes investigados podem ocasionar um quadro cancerígeno em um alto nível de expressão, mostrou a necessidade de investigação de genes relacionados com alta proliferação celular como o regulador do ciclo celular (*rgcc*) e genes relacionados com a transição epitélio-mesenquimal como zinc finger E-box binding homeobox 1 e 2 (*zeb1* e *zeb2*). O regulador do ciclo celular (RGCC) é conhecido pela sua atuação na ativação do ciclo celular (XU et al., 2014). Na Figura 20, o nível de expressão deste gene não apresenta diferença significativa entre células ativadas e transfectadas com o mímico e as células quiescentes. Entretanto, há uma diminuição significativa (\*\* $p < 0,005$ ) no nível de expressão de *rgcc* nas células transfectadas com o inibidor, indicando que há menos células em divisão celular e consequentemente uma possível regulação indireta do miRNA sobre esta via.

A transição epitélio-mesenquimal é associada em estudos com a progressão de fibrose e câncer em vários órgãos (GONZALEZ; MEDICI, 2014). ZEB1 e ZEB2 são pertencentes à família de fatores de transcrição Zinc finger E-box binding homeobox (ZEB), sendo ambas conhecidas por promover invasão tumoral e metástase com a indução da transição epitélio-mesenquimal. Na Figura 20, é possível ver que o nível de expressão de *zeb1* decai nas células ativadas, porém não apresenta diferença significativa entre as células quiescentes e os outros grupos celulares. Por sua vez, *zeb2*, como descrito por Yang et al. (2015), quando é expresso em altas concentrações pode ser um importante mediador da formação de microvasos em cânceres agressivos como hepatocarcinoma. O interessante é que o nível de expressão de *zeb2* demonstra uma alta diferença significativa (\*\* $p < 0,0005$ ) entre as células transfectadas com o mímico e com inibidor em comparação com o grupo de células quiescentes. Esse resultado, em conjunto com o obtido de *cox-2* e *acsl4*, sugere que o ambiente celular desfavorável ocasionado pela inibição do microRNA pode estar sendo regulado de forma a propiciar um possível desenvolvimento de carcinoma.

**Figura 20.** Níveis de expressão relativa de genes envolvidos com ciclo celular e transição epitélio-mesenquimal: *rgcc*, *zeb1* e *zeb2*.

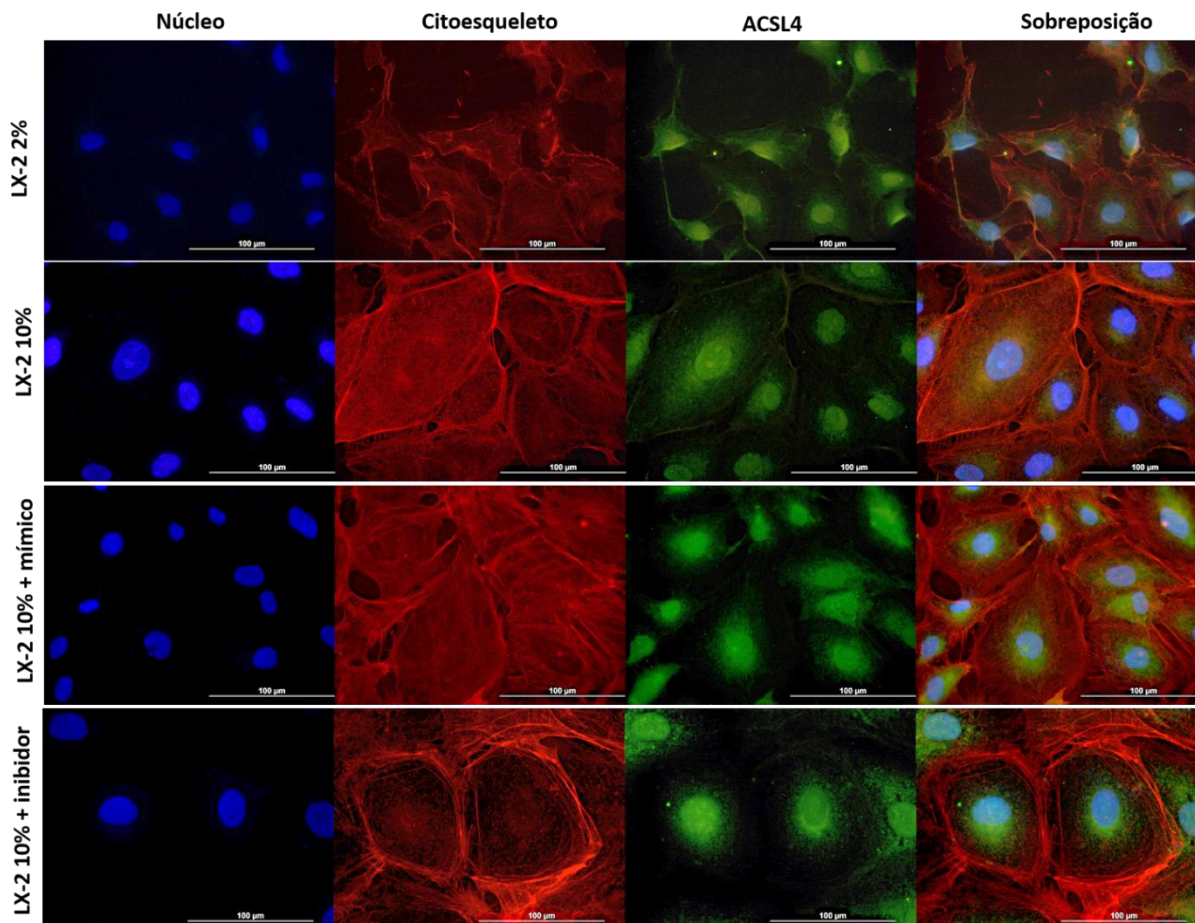


Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.4. Imunofluorescência de ACSL4 e COX-2

Como descrito acima, o fígado possui importante função no controle do metabolismo lipídico de todo o organismo. Para que ocorra ativação dos ácidos graxos, à fim de servirem de substratos a diferentes reações metabólicas de síntese e/ ou degradação (CURRIE et al., 2013) ocorre participação das enzimas ACSLs. Considerando-se o foco de nossas investigações a isoforma ACSL4 é relevante, considerando-se a sua preferência pelo ácido araquidônico, que é interconvertido a eucosanoides mediados pela atuação da enzima COX-2 (KAN et al., 2014). Para se avaliar a expressão da enzimas ACSL4 e COX-2 nas diferentes condições de cultivo, foram realizadas microscopias de fluorescência das mesmas, utilizando-se anticorpos específicos. A Figura 21 apresenta a proteína ACSL4 preferencialmente distribuída nos núcleos celulares, com um aumento de sua distribuição citoplasmática nas células crescidas na presença de 10% de SBF. Entretanto, a transfecção com o inibidor do miRNA-769-3p acarreta na aglomeração de ACSL4 em pequenos grânulos ao redor do núcleo, que sugerem a sua distribuição nas gotículas lipídicas, assim como observado em Tuohetahuntla et al. (2015).

**Figura 21.** Microscopia de fluorescência de ACSL4 nas células LX-2 cultivadas com 2% de SBF, 10% de SBF, 10% de SBF + mímico do miRNA-769-3p e 10% de SBF + inibidor do miRNA-769-3p.

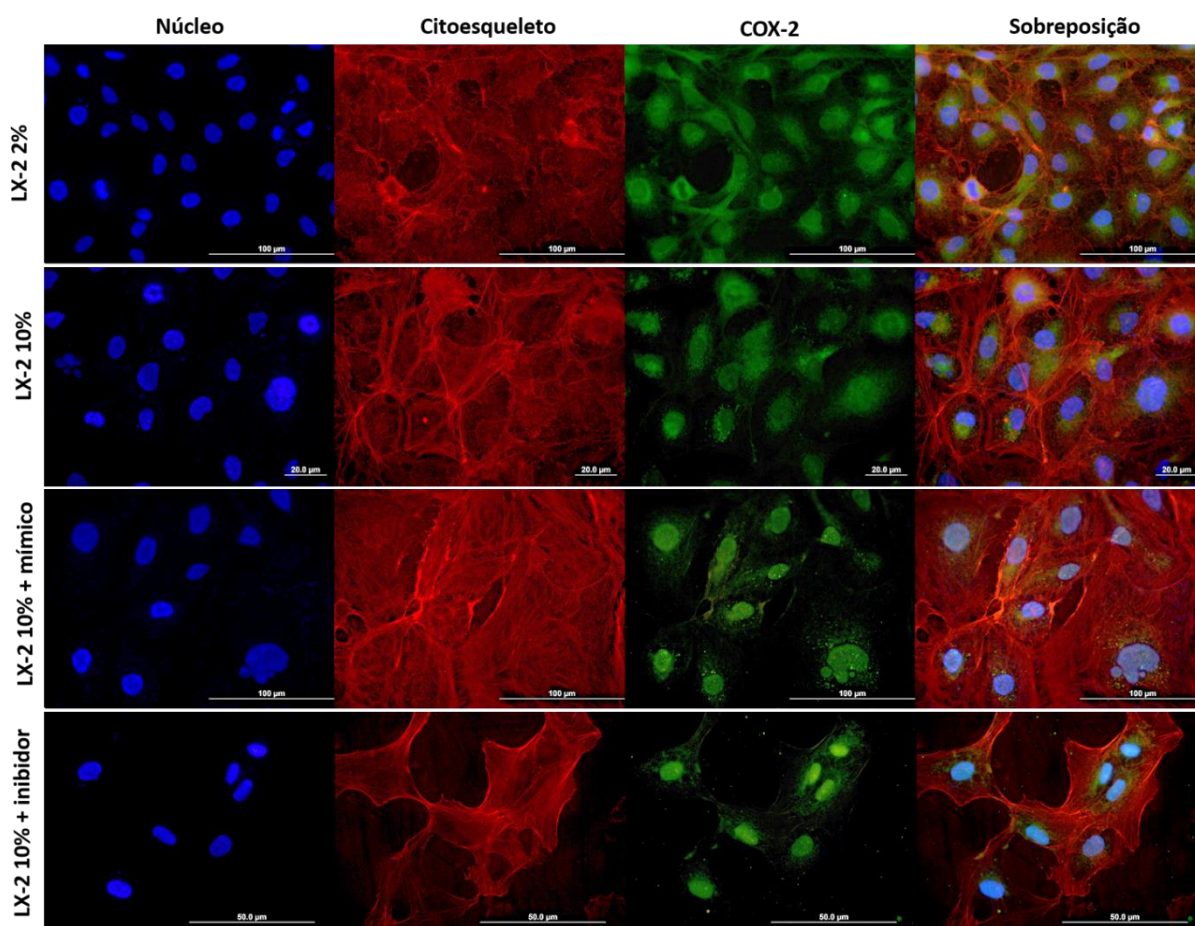


Marcação nuclear realizada com DAPI, em azul. Marcação dos filamentos de actina realizada com faloidina-TRITC, em vermelho e marcação de ACSL4 com FITC, em verde. Sobreposição das três figuras.

Segundo Tuohetahuntilla et al. (2015), ACSL4 é uma enzima chave no aumento de espécies de triacilglicerol contendo ácidos graxos poli-insaturados (TAG-PUFAs) em células estreladas ativadas de rato, favorecendo o acúmulo de gotículas lipídicas observada em nossos ensaios (Fig 8.). Relacionado a isso, a enzima ACSL4 preferencialmente esterifica ácidos araquidônicos (AA) em acil-CoA. Segundo Tuohetahuntilla et al. (2015), em células tumorais, esses TAG-PUFAs transativam a produção de COX-2. Baseado nessas observações, os níveis de expressão e localização celular da enzima COX-2 também foram avaliadas em ensaios de imunofluorescência (Figura 22). Os resultados demonstram uma localização preferencial de COX-2 nas regiões nucleares em todas as condições avaliadas. Uma observação a ser realizada é a marcação pontuada de COX-2 nas células transfectadas com o mímico do miRNA,

sugerindo a presença de grânulos de estresse (SG), que se estabelece frente a situações de estresse celular (ANDERSON; KEDERSHA; IVANOV, 2015). Entretanto, baseado nesses ensaios, a quantificação da enzima se torna inviável, mas o que se pode observar é uma reduzida ou mesmo ausente presença de SG nas células transfectadas com o inibidor, sugerindo a ocorrência de modificações pós-transcricionais, que controlam uma tradução exacerbada e provavelmente deletéria de COX-2, considerando-se os altos níveis transcricionais da molécula (Fig. 15).

**Figura 22.** Microscopia de fluorescência de COX-2 nas células LX-2 cultivadas com 2% de SBF, 10% de SBF, 10% de SBF + mímico do miRNA-769-3p e 10% de SBF + inibidor do miRNA-769-3p.

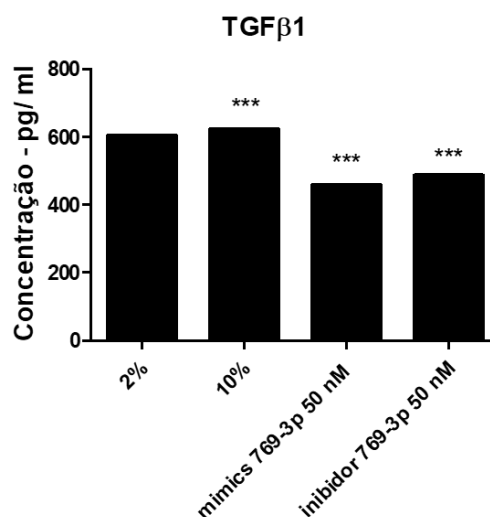


Marcação nuclear realizada com DAPI, em azul. Marcação dos filamentos de actina realizada com faloidina-TRITC, em vermelho e marcação de COX-2 com FITC, em verde. Sobreposição das três figuras.

#### 4.5. Mensuração de TGFβ-1 em ELISA

No quadro fibrogênico, um dos principais reguladores da ativação das células estreladas hepáticas é o TGFβ-1. Dada a sua importância e o padrão de expressão obtido pelo resultado de análises gênicas, a investigação proteica do mesmo se fez importante. Entretanto, os resultados obtidos com a mensuração proteica em leitor de ELISA foram de encontro com os resultados obtidos na expressão gênica. É possível observar na Figura 23 que há uma diminuição significativa ( $***p < 0,0005$ ) entre as células transfectadas com o mímico e com o inibidor em comparação com as células quiescentes. Este resultado pode indicar uma diminuição na ativação de células estreladas hepáticas ou uma possível regulação em nível pós-traducional de TGFβ-1, resultando num alto nível de expressão gênico e em baixo nível proteico. Além disso, uma tentativa de compensação também pode explicá-lo, ou seja, o nível de expressão gênico se mostra elevado para compensar o baixo nível proteico e atingir um nível requerido pela condição cultivada. Segundo Huen, Moeckel e Cantley (2013), os níveis de TGFβ-1 participam da homeostasia celular, podendo haver a diminuição do nível proteico na busca de um controle do processo pró-inflamatório.

**Figura 23.** Concentração proteica de TGFβ-1 mensurado em ELISA.



Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde  $***p \leq 0.0005$ ,  $**p \leq 0.005$  e  $*p \leq 0.05$ .

## 5. CONCLUSÃO

A fibrose hepática é um grande problema de saúde mundial, pois as lesões hepáticas podem ocorrer devido a uma ampla gama de agentes estressores, como a hepatite viral, abuso de álcool,



esteatose, entre outros, que ocasionam a inflamação e iniciam o processo crônico de cicatrização resultando posteriormente em um estágio de cirrose e hepatocarcinoma. Dentro deste contexto, terapias alternativas que objetivam a melhora do quadro clínico do paciente estão sendo visadas, como a utilização de miRNAs para uma terapêutica adequada. Os miRNAs são moléculas importantes, pois conseguem realizar a regulação gênica em nível pós-transcricional. Desta forma, a superexpressão do miRNA-769-3p viabilizou um estudo funcional do mesmo, possibilitando novos conhecimentos sobre a relação entre a fibrose hepática, o metabolismo lipídico e a via pró-inflamatória.

Com os resultados obtidos foi possível verificar o envolvimento do miRNA-769-3p no metabolismo lipídico, onde sua inibição desencadeia modificações na morfologia e na fisiologia celular com o aumento nas gotículas lipídicas. Entretanto, não foi possível esclarecer a via de formação de gotículas lipídicas regulada pelo miRNA-769-3p, pois enquanto alguns genes se apresentam super-regulados, outros não sofrem modificações significativas, sendo provavelmente uma via não dependente do retículo endoplasmático que se encarrega do reaparecimento das gotículas lipídicas. Foi possível concluir que o miRNA-769-3p não transativa vias de estresse oxidativo e processo apoptótico, porém, genes muito relacionados com a via do ácido araquidônico se mostraram superexpressos na ausência do miRNA no ambiente celular, sugerindo a regulação desta via pelo mesmo. Através dos resultados obtidos com as análises moleculares da via pró-inflamatória, foi possível sugerir que o miRNA-769-3p tem papel importante na regulação do processo pró-inflamatório, principalmente no seu controle, não permitindo uma piora do quadro pró-fibrosante. Além disso, alguns genes descritos como envolvidos na iniciação ou manutenção de um quadro clínico mais grave (*cox-2*, *acs14* e *zeb2*), como o desenvolvimento de hepatocarcinoma apresentam uma altíssima expressão na inibição do miRNA-769-3p. Ademais, a superexpressão de *cox-2* concomitantemente com *il-6* sugere um papel regulatório por parte da *il-6*, sendo possivelmente por esta via a ocorrência da ativação de COX-2.

É possível observar um aumento metabólico nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-769-3p, onde há aumento nas gotículas lipídicas e um aumento do metabolismo mitocondrial oxidativo, inferindo que embora o mesmo não esteja relacionado com o processo de reversão da fibrose hepática, seu estudo é muito importante no impedimento da piora no quadro patológico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A MOHAMMED, N. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 57, n. 4, p. 350-4, 2004.
- ALEGRE, F.; PELEGRIN, P.; FELDSTEIN, A. Inflammasomes in Liver Fibrosis. **Seminars In Liver Disease**, v. 37, n. 02, p. 119-127, 2017.
- ALEKSANDROV, A.; ZVEREVA, E.; FIELD, M. The Mechanism of Citryl-Coenzyme A Formation Catalyzed by Citrate Synthase. **The Journal Of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 17, p. 4505-13, 2014.
- ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. **Experimental Oncology**, v. 3, n. 34, p.200-211, 2012.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N.; IVANOV, P. Stress granules, P-bodies and cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 7, p.861-870, 2015.
- ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, 2010.
- ARRANZ, A. et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 24, p.9517-9522, 2012.
- ASKARI, B. et al. Rosiglitazone Inhibits Acyl-CoA Synthetase Activity and Fatty Acid Partitioning to Diacylglycerol and Triacylglycerol via a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- -Independent Mechanism in Human Arterial Smooth Muscle Cells and Macrophages. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1143-52, 2007.
- ATAIE-KACHOIE, P. et al. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). **Journal Of Clinical Pathology**, v. 67, n. 11, p. 932-7, 2014.
- AUSUBEL, F. M. et al. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. **Inc. New York**, v. 4, 1995.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. I.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: W H Freeman, 2002.
- BHARDWAJ, A. et al. In situ click chemistry generation of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.
- BISSELL, D. Inflammation and Hepatic Fibrosis. **Seminars In Liver Disease**, v. 30, n. 03, p. 211-4, 2010.

BOARU, S. G. et al. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. **Journal Of Inflammation**, v. 9, n. 1, 2012.

BORKHAM-KAMPHORST, E.; WEISKIRCHEN, R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 28, p. 53-61, 2016.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids (plefa)**, v. 82, n. 4-6, p. 243-50, 2010.

BRENNER, C. et al. Decoding cell death signals in liver inflammation. **Journal Of Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 583-94, 2013.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to Fatty Acids and Lipids. **World Review Of Nutrition And Dietetics**, v. 112, p. 1-16, 2014.

CASTILHO-FERNANDES, A. et al. Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 91, n. 3, p. 664-72, 2011.

CHEN, X. et al. Comparative Proteomic Study of Fatty Acid-treated Myoblasts Reveals Role of Cox-2 in Palmitate-induced Insulin Resistance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016a.

CHEN, Y. et al. MicroRNA-146a-5p Negatively Regulates Pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Cell Activation in Lipopolysaccharide Stimulated Human Hepatic Stellate Cells through Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathways. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, 2016b.

CHEN, H. et al. Hepatic cyclooxygenase-2 overexpression induced spontaneous hepatocellular carcinoma formation in mice. **Oncogene**, v. 36, n. 31, p. 4415-4426, 2017.

CHENG, Q. et al. Cyclooxygenase-2 Promotes Hepatocellular Apoptosis by Interacting with TNF- $\alpha$  and IL-6 in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats. **Digestive Diseases And Sciences**, v. 58, n. 10, p. 2895-902, 2013.

CURRIE, E. et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153-61, 2013.

DONG, X, et al. MiR-214 Promotes the Alcohol-Induced Oxidative Stress via Down-Regulation of Glutathione Reductase and Cytochrome P450 Oxidoreductase in Liver Cells. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 1, p. 68-77, 2013.

ELPEK, G. O. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, 2014.

FEUTH, T. et al. Activation of extrinsic apoptosis pathway in HCV monoinfected and HIV-HCV coinfecting patients, irrespective of liver disease severity. **Apoptosis**, v. 19, n. 7, p. 7260-76, 2014.

GAO, B.; BATALLER, R. Liver Fibrosis in Alcoholic Liver Disease. **Seminars In Liver Disease**, v. 35, n. 02, p. 146-56, 2015.

GIELING, R. G.; WALLACE, K.; HAN, Y. P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. **Ajp: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 6, p. 1324-31, 2009.

GILROY, D. W.; SAUNDERS, M. A.; WU, K. K. COX-2 expression and cell cycle progression in human fibroblasts. **American Journal Of Physiology - Cell Physiology**, v. 281, n. 1, p. 188-94, 2001.

GONZALEZ, D. M.; MEDICI, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. **Science Signaling**, v. 7, n. 344, 2014.

HARDWICK, J. P. et al. Eicosanoids in Metabolic Syndrome. **Advances In Pharmacology**, v. 66, p. 157-266, 2013.

HAY, M. et al. Cognitive impairment in heart failure: A protective role for angiotensin-(1-7). **Behavioral Neuroscience**, v. 131, n. 1, p. 99-114, 2017.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 6, n. 1, p. 425-56, 2011.

HERSCHMAN, H. R. Regulation and Function of Prostaglandin Synthase-2/ Cyclooxygenase II. In: CURTIS-PRIOR, Peter. **The Eicosanoids**. West Sussex: Wiley, 2004. Cap. 4, p. 43-52.

HOROWITZ, J. M. et al. Evaluation of hepatic fibrosis: a review from the society of abdominal radiology disease focus panel. **Abdominal Radiology**, v. 42, n. 8, p. 2037-2053, 2017.

HOSSAIN, M. et al. The Role of Prostaglandins in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 23, p. 2935-51, 2006.

HUEN, S. C.; MOECKEL, G. W.; CANTLEY, L. G. Macrophage-specific deletion of transforming growth factor- 1 does not prevent renal fibrosis after severe ischemia-reperfusion or obstructive injury. **Ajp: Renal Physiology**, v. 305, n. 4, p. 477-84, 2013.

IKURA Y.; CALDWELL S. H. Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, p. 8699-708, 2015.

Jl, H. et al. Active Immunization against Transforming Growth Factor-beta1 Prevents Hepatic Fibrosis in a Rat Model of Liver Disease. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 95, n. 6, p. 743-749, 2017.

JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 7, p. 421-33, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: **Histologia básica**. Guanabara Koogan, 2013.

KAN, C. F. K. et al. Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation. **The Journal Of Lipid Research**, v. 55, n. 8, p. 1657-67, 2014.

KIM, B.; SRIVASTAVA, S. K.; KIM, S.-H. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, v. 19, n. 1, p. 113-27, 2014.

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.

LEE, Y. A.; WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. **Gut**, v. 64, n. 5, p. 830-41, 2015.

LI, G. et al. Cyclooxygenase-2 prevents fas-induced liver injury through up-regulation of epidermal growth factor receptor. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 834-43, 2009.

LI, Z.; OU-YANG, P.; HAN, X. Profibrotic effect of miR-33a with Akt activation in hepatic stellate cells. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 1, p. 141-8, 2014.

LIN, H.; LIN-HUI L.; XIANG-HUO, H. Role of microRNAs in inflammation-associated liver cancer. **Cancer Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 407-425, 2016.

LIU, B. et al. High expression of Rac1 is correlated with partial reversed cell polarity and poor prognosis in invasive ductal carcinoma of the breast. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, 2017.

LIU, Y.; WANG, Y.; JIANG, C. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. **Frontiers In Human Neuroscience**, v. 11, 2017.

LONG, Q. et al. Fatty acid synthase (FASN) levels in serum of colorectal cancer patients: correlation with clinical outcomes. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 3855-9, 2014.

LOOSEN, S. H. et al. Role of circulating microRNAs in liver diseases. **World Journal Of Hepatology**, v. 9, n. 12, p. 586-594, 2017.

LU, W. et al. Angiotensin-(1-7) relieved renal injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats by reducing inflammation, oxidative stress and fibrosis. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 50, n. 1, 2017.

LUO, E. et al. MicroRNA-769-3p Down-regulates NDRG1 and Enhances Apoptosis in MCF-7 Cells During Reoxygenation. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, 2014.

MACHADO-SILVA, A. et al. Therapeutic uses for Angiotensin-(1-7). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 26, n. 6, p. 669-78, 2016.

MALOBERTI, P. M. et al. Functional Interaction between Acyl-CoA Synthetase 4, Lipooxygenases and Cyclooxygenase-2 in the Aggressive Phenotype of Breast Cancer Cells. **Plos One**, v. 5, n. 11, 2010.

MASHEK, D. G. et al. Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver. **Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 964-7, 2015.

MAUBACH, G. MiRNA studies in in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 17, n. 22, p. 2748-73, 2011.

MILLER, A. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **Febs Letters**, v. 586, n. 5, p. 585-95, 2011.

MOQADAM, F. A.; PIETERS, R.; BOER, M. L. D. The hunting of targets: challenge in miRNA research. **Leukemia**, v. 27, n. 1, p. 16-23, 2012.

MORRIS, S. M. et al. TGF- $\beta$  signaling alters the pattern of liver tumorigenesis induced by Pten inactivation. **Oncogene**, v. 34, n. 25, p. 3273-82, 2014.

ONAL, G. et al. Lipid Droplets in Health and Disease. **Lipids In Health And Disease**, v. 16, n. 1, 2017.

ORLANDO, U. D. et al. The Functional Interaction between Acyl-CoA Synthetase 4, 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase-2 Controls Tumor Growth: A Novel Therapeutic Target. **Plos One**, v. 7, n. 7, 2012.

PACHAURI, P. et al. Angiotensin (1–7) facilitates cardioprotection of ischemic preconditioning on ischemia–reperfusion-challenged rat heart. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 430, n. 1-2, p.99-113, 2017.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 5, n. 6, 2013.

PENG, L. et al. Substance P promotes hepatic stellate cell proliferation and activation via the TGF- $\beta$ 1/Smad-3 signaling pathway. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 329, p. 293-300, 2017.

PORTER, T. D. et al. Suppression of Cytochrome P450 Reductase (POR) Expression in Hepatoma Cells Replicates the Hepatic Lipidosis Observed in Hepatic POR-Null Mice. **Drug Metabolism And Disposition**, v. 39, n. 6, p. 966-73, 2011.

PUCHE, J. E.; SAIMAN, Y.; FRIEDMAN, S.L. Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 4, p. 1473-92, 2013.

QIU, D. Significance of cyclooxygenase-2 expression in human primary hepatocellular carcinoma. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 8, n. 5, p. 815-7, 2002.

RICHTER, K.; KIETZMANN, T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. **Cell And Tissue Research**, v. 365, n. 3, p. 591-605, 2016.

ROCKEY, D. C.; WEYMOUTH, N.; SHI, Z. Smooth Muscle  $\alpha$  Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

RODRIGUEZ, M. A. R.; KERSTEN, S. Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1862, n. 10, p. 1212-1220, 2017.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 1, p. 177-97, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 2000. 3<sup>a</sup> ed.

SCHIFF, E. R.; MADDREY, W.C.; SORRELL, M. F. **Diseases of the liver**. 11. ed.: Wiley-blackwell, 1185. 2012.

SCODITTI, E. et al. PPAR agonists inhibit angiogenesis by suppressing PKC - and CREB-mediated COX-2 expression in the human endothelium. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 2, p.302-310, 2009.

SEKI, E.; BRENNER, D.A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. **Journal Of Hepato-biliary-pancreatic Sciences**, v. 22, n. 7, p. 512-8, 2015.

SENOO, H. et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative –past, present and future. **Cell. Biol. Int.**, v. 34, n. 12, p. 1247-72, 2010.

SENOO, H. et al. Uptake and storage of vitamin A as lipid droplets in the cytoplasm of cells in the lamina propria mucosae of the rat intestine. **Cell Biology International**, v. 37, n. 11, p. 1171-80, 2013.

SENOO, H.; MEZAKI, Y.; FUJIWARA, M. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). **Anatomical Science International**, v. 92, n. 4, p. 387-455, 2017.

SFERRA, R. et al. Expression of pro-fibrotic and anti-fibrotic molecules in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. **Pathology - Research And Practice**, v. 213, n. 1, p. 58-65, 2017.

SHARVIT, E. et al. Amplified Inhibition of Stellate Cell Activation Pathways by PPAR-Î³, RAR and RXR Agonists. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

SILVA, A. C. S.; TEIXEIRA, M. M. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. **Pharmacological Research**, v. 107, p.154-162, 2016.

SILVA, B. O. et al. MicroRNA Profiling of the Effect of the Heptapeptide Angiotensin-(1-7) in A549 Lung Tumor Cells Reveals a Role for miRNA149-3p in Cellular Migration Processes. **Plos One**, v. 11, n. 9, 2016.

SMYTH, R. et al. Identification of superoxide dismutase as a potential urinary marker of carbon tetrachloride-induced hepatic toxicity. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 2972-83, 2008.

SUN, M.; KISSELEVA, T. Reversibility of liver fibrosis. **Clinics And Research In Hepatology And Gastroenterology**, v. 39, 2015.

TAKAHASHI, R.; MIYAZAKI, H.; OCHIYA, T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. **Frontiers In Genetics**, v. 4, 2014.

TARASENKO, T. N.; MCGUIRE, P. J. The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM). **Molecular Genetics And Metabolism**, v. 121, n. 4, p. 283-288, 2017.

TOVMASYAN, A.; REBOUCAS, J. S.; BENOVA, L. Simple Biological Systems for Assessing the Activity of Superoxide Dismutase Mimics. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 15, p. 2416-36, 2014.

TRAUTWEIN, C. et al. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. **Journal Of Hepatology**, v. 62, n. 1, p. 15-24, 2015.

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 397-411, 2017.

TU, X. et al. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF $\beta$  signalling pathway. **The Journal Of Pathology**, v. 234, n. 1, p.46-59, 2014.

TUOHETAHUNTILA, M. et al. Role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 in formation of polyunsaturated lipid species in hepatic stellate cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1851, n. 2, p. 220-230, 2015.

UCHIDA, M. et al. Alternative RNA splicing in expression of the glutathione synthetase gene in human cells. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2105-9, 2009.

VAN ROOIJ, E. The Art of MicroRNA Research. **Circulation Research**, v. 108, n. 2, p. 219-34, 2011.

VAN ROOIJ, E.; KAUPPINEN, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. **Embo Molecular Medicine**, v. 6, n. 7, p. 851-64, 2014.

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.

WALLACE, M.; MANN, D.; FRIEDMAN, S. Emerging and Disease-Specific Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. **Seminars In Liver Disease**, v. 35, n. 02, p. 107-18, 2015.

WANG, E. **Cancer Systems Biology**. CRC Press, 2010. 456 p

WANG, Q. et al. Cooperative interaction of CTGF and TGF- $\beta$  in animal models of fibrotic disease. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 4, n. 1, 2011a.

WANG, Y. et al. Interactions among oscillatory pathways in NF-kappa B signaling. **Bmc Systems Biology**, v. 5, n. 1, 2011b.

WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D. T. FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. **Biomed Research International**, v. 2014, 2014.



WANG, L. et al. Protective role of ACE2-Ang-(1-7)-Mas in myocardial fibrosis by downregulating KCa3.1 channel via ERK1/2 pathway. **Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology**, v. 468, n. 11-12, p. 2041-2051, 2016.

WATKINS, P. A; ELLIS, J.M. Peroxisomal acyl-CoA synthetases. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, v. 1822, n. 9, p. 1411-20, 2012.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M.. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 105, 2010.

WEISKIRCHEN, R. et al. Genetic Characteristics of the Human Hepatic Stellate Cell Line LX-2. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

WELTE, M. A. Expanding Roles for Lipid Droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. 470-81, 2015.

WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1862, n. 10, p. 1260-1272, 2017.

WENDEL, A. A. et al. Glycerol-3-phosphate Acyltransferase (GPAT)-1, but Not GPAT4, Incorporates Newly Synthesized Fatty Acids into Triacylglycerol and Diminishes Fatty Acid Oxidation. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27299-306, 2013.

WESTRA, I. M. et al. Human precision-cut liver slices as a model to test antifibrotic drugs in the early onset of liver fibrosis. **Toxicology In Vitro**, v. 35, p. 77-85, 2016

WHO, World Health Organization -. **Brazil Health Profile**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>>. Acesso em: fevereiro, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva. **Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015**. 2015. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/en/)>. Acesso em: 18 jul. 2017.

WREE, A. et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 898-910, 2014.

WU, C.; BRATTON, S. B. Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 6, p. 546-58, 2013.

WU, R. et al. MicroRNA-497 Induces Apoptosis and Suppresses Proliferation via the Bcl-2/Bax-Caspase9-Caspase3 Pathway and Cyclin D2 Protein in HUVECs. **Plos One**, v. 11, n. 12, 2016.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 142-51, 2005.

XU, R. et al. Knockdown of response gene to complement 32 (RGC32) induces apoptosis and inhibits cell growth, migration, and invasion in human lung cancer cells. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 394, n. 1-2, p. 109-18, 2014.

XU, S.; ZHANG, X.; LIU, P. Lipid droplet proteins and metabolic diseases. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease**, 2017.

YANG, Z. et al. ZEB2 promotes vasculogenic mimicry by TGF- $\beta$ 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 98, n. 3, p. 352-9, 2015.

YONEDA, A. et al. Vitamin A and insulin are required for the maintenance of hepatic stellate cell quiescence. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 8-17, 2016.

YU, F. et al. The Epigenetically-Regulated microRNA-378a Targets TGF- $\beta$ 2 in TGF- $\beta$ 1-Treated Hepatic Stellate Cells. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 40, n. 1-2, p. 183-194, 2016.

ZHAO, J. et al. Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. **Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 1331-42, 2014.

ZOU, Y. et al. MicroRNA-146a-5p attenuates liver fibrosis by suppressing profibrogenic effects of TGF $\beta$ 1 and lipopolysaccharide. **Cellular Signalling**, v. 39, p. 1-8, 2017.

LETÍCIA FERREIRA RAMOS

ANÁLISE FUNCIONAL DO MICRORNA-769-3P NO PROCESSO  
FIBROSANTE HEPÁTICO E SUA CORRELAÇÃO COM ELEMENTOS  
PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS ESTRELADAS HUMANAS.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karen Cristiane Martinez de Moraes (Orientadora).  
Departamento de Biologia – UNESP – Rio Claro

---

Letícia Ferreira Ramos (Aluna).  
UNESP Rio Claro

Rio Claro, SP \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.