



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUISTA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico

Thaís Porto Barbosa

Março - 2020

Thaís Porto Barbosa

**Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades
mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química do Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia (Biotecnologia Aplicada à Saúde).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karen Cristiane Martinez de Moraes

Março – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Thaís Porto
B238e Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico / Thaís Porto Barbosa. – Araraquara : [s.n.], 2020
95 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Esteatose hepática. 2. Técnicas de cocultura.
3. Lipídios. 4. Fígado-Doenças. 5. Metabolismo. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecánísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico"

AUTORA: THAIS PORTO BARBOSA

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dr.ª DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 13 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Thaís Porto Barbosa

Nome em citações bibliográficas: PORTO-BARBOSA, T.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Av. Prof. Francisco Degni, 55 – Jardim Quitandinha, Araraquara – SP, 14800-900.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018 – 2020

Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6).

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

Título: Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico.

Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes.

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Grande área: Ciências Biológicas

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

2012 – 2017

Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

Título: Diversidade molecular de invertebrados da região do Norte Fluminense através de *Barcoding* utilizando a região do COI.

Orientador: Prof. Dra. Laura Isabel Weber.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2009 – 2011

Ensino Médio (2º grau).

Escola Técnica do Estado de São Paulo, ETEC, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016 – 2016

Metodologias de Genética Direta e Reversa para avaliar a funcionalidade do Genoma (Carga horária: 3h).

Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil.

2015 – 2015

Filogenia Molecular Básica (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

WEBER, LAURA I.; **PORTO-BARBOSA, T.** ; BERARDINI, N.G. ; SILVA, V. C. . Two-year study of food availability, demographic structure, and genetic diversity of the most common sandhopper in southeastern Brazil. REGIONAL STUDIES IN MARINE SCIENCE **JCR**, v. 32, p. 100876, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

PORTO-BARBOSA, T.; RAMOS, L. F.; Silveira, M. B.; **MORAES, K. C. M.** Functional analysis of the microRNA-1914-5p in lipid metabolism in hepatic cells: pathways to understand non-alcoholic fat liver diseases. In: 65th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

PORTO-BARBOSA, T.; RAMOS, L. F.; **MORAES, K.C.M.** Establishment of a cellular model of hepatic steatosis and mechanistic effects of microRNA 1914-5p in lipid metabolism. In: 65 th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

PEREIRA, L.P.M.; **PORTO-BARBOSA, T.**; RAMOS, L. F.; **MORAES, K. C. M.** Analysis of the effect of the microRNA-1914-5p in the control of lipid droplets and the reactive oxygen metabolism in liver cells submitted to pro-steatotic condition. In: 65 th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

SANELLO, L. C.; **PORTO-BARBOSA, T.**; RAMOS, L. F.; **MORAES, K. C. M.** Steatotic potential effects of the phytosanitary ethiprole and fipronil in the hepatocyte cell line HepG2. In: 65th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

PORTO-BARBOSA, T.; BERARDINI, N.; SILVA, V. C.; WEBER, L. I. Food availability, demographic and genetic structure of the amphipod *A. brasiliensis* at the PARNA Jurubatiba (North of Rio de Janeiro). In: 62º Brazilian-International Congress of Genetics, SBG, 2016.

Apresentações de trabalho e/ou palestra

PORTO-BARBOSA, T.; BERARDINI, N. ; SILVA, V. C. ; ALVES, A. J. ; VARGAS, M.; NERY, L. E. ; BARROS, C. M. ; AZEVEDO, A. ; WEBER, L. I. . O anfípode semiterrestre *A. brasiliensis*: Um estudo ecológico, fenotípico e genético no tempo. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

PORTO-BARBOSA, T.; BERARDINI, N. ; WEBER, L. I. . Parâmetros físico-químicos que determinam a distribuição do anfípode *Q. lutzi* nas lagoas costeiras do Norte Fluminense. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

PORTO-BARBOSA, T.; CLEZAR, C. ; WEBER, L. I. . Diversidade Molecular de Invertebrados da Região Costeira do Norte Fluminense. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

PORTO-BARBOSA, T.; CLEZAR, C.; WEBER, L. I. . Levantamento da diversidade de mexilhões e crustáceos anfípodas através de barcoding utilizando a região do COI. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

65th Brazilian Congress of Genetics. Discovery and characterization of coding small ORFs: an evolutionary approach. 2019. (Congresso).

62º Brazilian-International Congress of Genetics. 2016. (Congresso).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a vida, saúde e a grande oportunidade de realizar o sonho da pós-graduação, e até aqui me guardou e me deu forças para que este projeto deixasse de ser sonho e passasse a ser realidade: muito obrigada, meu Deus.

À minha família, mãe, pai e irmã (Silvana, Valdemar e Daiana), pelo apoio incondicional. Obrigada por sonharem e embarcarem comigo nessa minha aventura acadêmica. Obrigada pelas orações que me acompanharam por onde quer que eu fosse, pelos conselhos e palavras de apoio e incentivo. Eu amo vocês!

À Professora Karen, não somente por ter aberto as portas do laboratório, mas também pela amizade e paciência (principalmente na hora de fazer cálculos de concentrações). Muito obrigada, “Teacher”!!!

Aos meus queridos amigos de laboratório e da vida, Ligia, Lara, Thays, Caio, Priscila, Marina, Victória e Letícia Molica, meu muito obrigada pela companhia e ensinamentos diários. Vocês participaram diretamente e ativamente dessa minha jornada. Obrigada a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a construção desse trabalho.

Às minhas amigas, fiéis escudeiras e pessoas mais inteligentes que já conheci, Letícia Ramos e Camila. Não sei o que seria de mim sem a ajuda de vocês. Agradecer parece pouco diante de tudo o que fizeram por mim. Vocês são incríveis!

Agradeço também ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP de Araraquara, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Instituto de Biociências e Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP de Rio Claro, por ter me “abrigado” nesses dois anos de mestrado e à Professora Marin, pela colaboração.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Professor Malaspina e ao técnico Sebastião Zanão, do Laboratório de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (UNESP), pela parceria e pela troca de conhecimentos durante os experimentos.

À CAPES, pela bolsa de mestrado, e à FAPESP (Processo 2013/21186-5 e Processo 2018/05286-3) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

RESUMO

As doenças hepáticas estão entre as principais causas de morte no mundo todo, afetando aproximadamente 20% da população. A esteatose hepática é uma condição caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos e, embora seja uma condição reversível, pode progredir para quadro de esteatohepatite e carcinoma hepatocelular. A falta de tratamentos específicos para a esteatose é um problema atual, e a caracterização de novas moléculas poderá ajudar no desenvolvimento de terapias. Diversos estudos apontam um papel decisivo de microRNAs (miRNAs) no desenvolvimento de patologias hepáticas. Os miRNA são pequenas moléculas que estão envolvidas na regulação de genes importantes no metabolismo lipídico. Mais especificamente, o miR-1914-5p está intimamente relacionado com a biossíntese de ácidos graxos em células hepáticas estreladas, e buscar entender sua atuação funcional no quadro pró-esteatótico celular é o objetivo central dessa proposta. Para isto, um modelo celular pró-esteatótico foi estabelecido no presente trabalho, utilizando-se linhagens celulares hepáticas, tais como LX-2 e HepG2. Ensaio bioquímicos para mensuração de lipídeos intracelulares e níveis de β -oxidação foram realizados. Em células cocultivadas, onde houve um aumento dos níveis endógenos do miR-1914-5p, observou-se um aumento no conteúdo lipídico intracelular, sugerindo um efeito acentuado deste miRNA na produção e acúmulo de lipídeos. Sob outra perspectiva, células cocultivadas onde o miR-1914-5p foi inibido, houve diminuição nos níveis de lipídeos totais e glicose intracelulares, inferindo que este miRNA estaria diminuindo espécies lipídicas que são alteradas no quadro pró-esteatótico. Análises bioquímicas e de expressão gênica foram realizadas em células LX-2. Em células onde há aumento endógeno do miR-1914-5p, houve aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol, além da modulação dos níveis de expressão de diversos genes correlatos à síntese, armazenamento e hidrólise de lipídeos, sugerindo que as células contendo esta condição estariam tentando encontrar uma homeostase lipídica ao liberar AGs para oxidação. Por outro lado, células onde o miR-1914-5p foi inibido, houve diminuição nos níveis de colesterol intracelulares, além deste miRNA ter mostrado interagir com sítios putativos de genes correlatos à síntese de colesterol. A partir dos resultados, a inibição do miR-1914-5p pareceu ter um efeito mais intenso na síntese de lipídeos, uma vez que genes relacionados à via oxidativa não foram modulados. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o efeito do miR-1914-5p parece variar em linhagens cultivadas isoladamente, tendo a confirmação de que a potencial ação deste miRNA é aparentemente fortalecida quando este é inserido em linhagens cocultivadas.

Palavras-chave: Esteatose hepática; lipídeos; miR-1914-5p; LX-2; HepG2.

ABSTRACT

Liver disease is among the main causes of death worldwide, affecting approximately 20% of the population. Liver steatosis is a condition characterized by the accumulation of fat in hepatocytes and, although it is a reversible condition, it can progress to steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. The lack of specific treatments for steatosis is a current problem, and the characterization of new molecules may help in the development of therapies. Several studies point to a decisive role of microRNAs (miRNAs) in the development of liver pathologies. MiRNA are small molecules that are involved in the regulation of important genes in lipid metabolism. More specifically, miR-1914-5p is closely related to the biosynthesis of fatty acids in hepatic stellate cells, and seeking to understand their functional role in the cellular pro-steatotic setting is the central objective of this proposal. For this, a pro-steatotic cell model was established in the present work, using liver cell lines, such as LX-2 and HepG2. Biochemical tests to measure intracellular lipids and β -oxidation levels were performed. In cocultivated cells where there was an increase in endogenous levels of miR-1914-5p, an increase in intracellular lipid content was observed, suggesting a marked effect of this miRNA on lipid production and accumulation. From another perspective, cocultivated cells where miR-1914-5p was inhibited, there was a decrease in the levels of total lipids and intracellular glucose, inferring that this miRNA would be decreasing lipid species that are altered in the pro-steatotic setting. In addition, biochemical and gene expression analyzes were performed on LX-2 cells. In LX-2 cells where there was an endogenous increase in miR-1914-5p, there was an increase in the levels of triglycerides and cholesterol, in addition to the modulation of the expression levels of several genes related to the synthesis, storage and hydrolysis of lipids, suggesting that the cells containing this condition would be trying to find a lipid homeostasis by releasing AGs for oxidation. On the other hand, LX-2 cells where miR-1914-5p was inhibited, there was a decrease in intracellular cholesterol levels, in addition to this miRNA being shown to interact with putative sites of genes related to cholesterol synthesis. From the results, the inhibition of miR-1914-5p in LX-2 cells seemed to have a more intense effect on lipid synthesis, since genes related to the oxidative pathway were not modulated. The results obtained in this project have shown that the effect of miR-1914-5p seems to vary in cell line grown alone, confirming that the potential action of this miRNA is apparently strengthened when it is inserted into cocultured cell line.

Keywords: Liver steatosis; lipids; miR-1914-5p; LX-2; HepG2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC - Acetil-CoA carboxilase
ACLY – Adenosina trifosfato citrato liase
ACSL – Acil-CoA sintetase de cadeia longa
AGO2 – Argonauta 2
AGPAT – 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase
AGs – Ácidos graxos
ATGL – Lipase de triglicerídeos do tecido adiposo
ATP – Adenosina trifosfato
CD36 – Ácido graxo translocase
cDNA – DNA complementar
CES – Células endoteliais sinusoidais
CHE – Célula hepática estrelada
ChREBP – Proteína de ligação ao elemento responsivo à carboidrato
CIC – Transportador mitocondrial de citrato
CPTs – Carnitinas palmitoiltransferases
CS – Citrato sintase
DAG – Diacilglicerol
DGAT – Diacilglicerol aciltransferase
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMSO – Dimetilsufóxido
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELOVL – Elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FABP – Proteínas ligadoras de ácido graxo
FASN – Ácido graxo sintase
FATP – Proteínas transportadoras de ácido graxo
FT-IR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
GPAT – Glicerol-3-fosfato aciltransferase
HMGCR – HMG-CoA redutase
HMGCS1 – HMG-CoA sintase 1
HSL - Lipase sensível ao hormônio

LDN – Lipogênese *de novo*
LPA – Ácido lisofosfatídico
MAGL - Lipase de monoacilglicerol
miRNA – microRNA
MLYCD - Malonil-CoA descarboxilase
mRNA – RNA mensageiro
mtDNA – DNA mitocondrial
MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio
PA – Ácido fosfatídico
PAP/LPIN – Lipina
PBS – Tampão fosfato salino
PNPLA3 - Fosfolipase patatina-como proteína contendo o domínio 3
PPARs – Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos
qPCR – Reação de polimerase em cadeia quantitativa
RE – Retículo endoplasmático
SBF – Soro bovino fetal
SCD – Estearoil-CoA dessaturase
SREBP – Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol
TGs – Triglicerídeos
TRC – Transporte reverso de colesterol
UPR – Resposta à proteína desnovelada
VLDL – Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Fígado: um biorreator metabólico	14
1.2 Doenças hepáticas e a esteatose	15
1.3 Metabolismo de lipídeos na esteatose hepática	18
1.4 MiRNA como ferramenta biotecnológica	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Culturas de células e ensaios de viabilidade celular (MTT)	27
3.2 Transfecções celulares	28
3.3 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares	29
3.3.1 <i>Mensuração de Triglicerídeos</i>	29
3.3.2 <i>Mensuração de Colesterol</i>	30
3.3.3 <i>Mensuração de Glicose</i>	30
3.4 Análises do metabolismo lipídico	30
3.4.1 <i>Quantificação e identificação de ácidos graxos via Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS)</i>	30
3.4.2 <i>Análises de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	31
3.5 Marcação de AGs por fluorescência: mensuração da β-oxidação	32
3.6 Extração de RNA total, de miRNA e transcrição reversa	33
3.6.1 <i>Extração de RNA total</i>	33
3.6.2 <i>Transcrição reversa do RNA total</i>	33
3.6.3 <i>Extração de miRNA</i>	34
3.6.4 <i>Transcrição de miRNA</i>	35
3.7 Análises de expressão gênica por qPCR	35
3.7.1 <i>qPCR: mRNA</i>	35
3.7.2 <i>qPCR: análise da expressão diferencial e validação do miR-1914-5p</i>	37
3.8 Análises estatísticas	37
CAPÍTULO I: COCULTURA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Ensaio de viabilidade celular em linhagens celulares hepáticas	38
4.2 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares	40
4.2.1 <i>Níveis intracelulares de triglicerídeos nas células cocultivadas</i>	40
4.2.2 <i>Níveis intracelulares de colesterol nas cocultivadas</i>	43

4.3 Ensaio de viabilidade celular em células transfectadas com o miR-1914-5p.....	45
4.4 Análises de metabolismo de lipídeos	46
4.4.1 <i>Quantificação e identificação de ácidos graxos através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS).....</i>	<i>46</i>
4.4.2 <i>Quantificação de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	<i>48</i>
4.5 Marcação de AGs e análise da β-oxidação por fluorescência	50
4.6 Mensuração de glicose intracelular	52
5 CONCLUSÕES	54
CAPÍTULO II: LX-2	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 Ensaio de viabilidade celular em células LX-2	55
6.2 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares.....	56
6.2.1 <i>Níveis intracelulares de triglicerídeos em células LX-2.....</i>	<i>56</i>
6.2.2 <i>Níveis intracelulares de colesterol em células LX-2.....</i>	<i>58</i>
6.3 Mensuração dos níveis de miRNA em células LX-2 transfectadas	60
6.4 Ensaio de viabilidade celular em células LX-2 transfectadas com o miR-1914-5p.....	61
6.5 Análises de metabolismo de lipídeos	62
6.5.1 <i>Quantificação e identificação de ácidos graxos através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS).....</i>	<i>62</i>
6.5.2 <i>Quantificação de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	<i>64</i>
6.6 Análises da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos	65
6.6.1 <i>Fatores de transcrição na regulação de genes hepáticos.....</i>	<i>65</i>
6.6.2 <i>Genes correlatos à síntese de novo de AGs</i>	<i>67</i>
6.6.3 <i>Genes correlatos ao armazenamento de AGs.....</i>	<i>70</i>
6.6.4 <i>Genes correlatos à ativação e dessaturação de AGs.....</i>	<i>72</i>
6.6.5 <i>Genes a via de β-oxidação de AGs</i>	<i>74</i>
6.6.6 <i>Genes correlatos ao metabolismo de colesterol</i>	<i>76</i>
6.7 Mensuração de AGs e análise da β-oxidação por fluorescência.....	79
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS.....	85

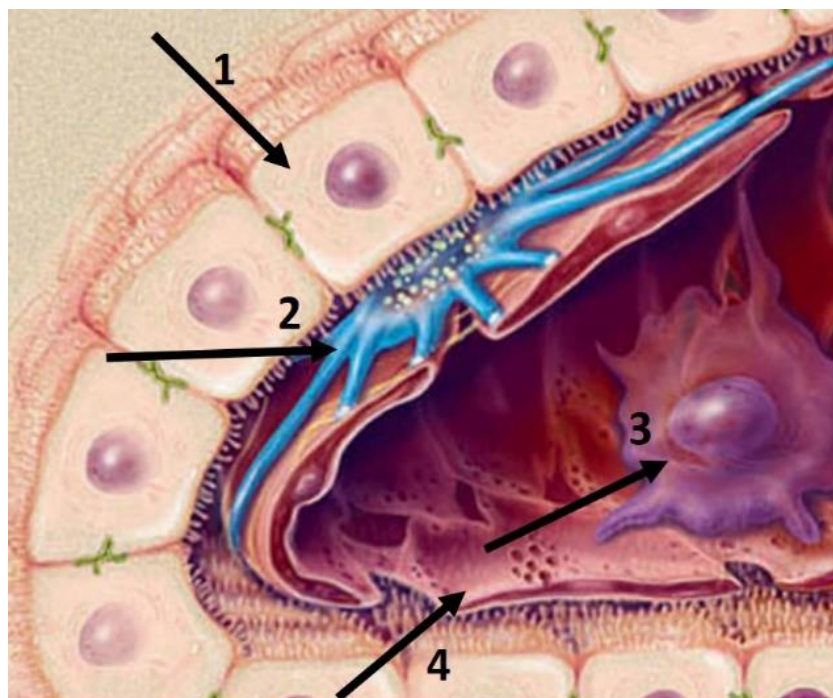
1 INTRODUÇÃO

1.1 Fígado: um biorreator metabólico

O fígado é a maior glândula presente no corpo humano e possui diversas funções metabólicas, sendo o primeiro local de processamento de muitos nutrientes (OZOUGWA; EYO, 2014; PONZIANI *et al.*, 2015). É também local de armazenamento de reservas energéticas, como lipídeos e glicogênio que são oriundos da dieta e disponibilizados quando necessário. Ele também pode metabolizar substâncias tóxicas e as converter em substâncias que possam ser excretadas (CHIANG, 2014). Justamente por desempenhar papéis fundamentais e contribuir significativamente para a homeostase corporal, desequilíbrios fisiológicos podem acarretar uma série de distúrbios na função hepática. Além do mais, por possuir constantes relações e mecanismos de comunicação com outros órgãos endócrinos, a perturbação do equilíbrio hepático pode desencadear alterações metabólicas e resultar no mau funcionamento do órgão (BURRA, 2013).

O lobo hepático é composto por alguns tipos celulares, constituído basicamente por hepatócitos, células de *Kupffer*, células hepáticas estreladas (CHE) e células endoteliais sinusoidais (CES) (OZOUGWU, 2017) (Figura 1).

Figura 1. Tipos de células hepáticas. (1) hepatócitos; (2) CHE; (3) células de *Kupffer*; (4) CES.



Fonte: Adaptado de Friedman, 2008.

Em mamíferos, os hepatócitos compõem aproximadamente 70-85% do volume total do fígado (KMIEC, 2001) e a capacidade de síntese e de metabolismo do fígado se dá, em maioria, por eles (ALLEN, 2002). Justamente por esta capacidade, os hepatócitos são ricos em organelas, como retículo endoplasmático e complexo de golgi, que participam ativamente no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas (OZOUGWU, 2017).

As células de *Kupffer* são macrófagos residentes no fígado, que, após a ativação, podem secretar citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando assim uma resposta inflamatória (KMIEC, 2001).

As CHE são células especializadas em armazenamento, abrigando na forma de gotícula lipídica dispostas no citoplasma, os retinóides (vitamina A) (KNOOK; SEFFELAAR; DE LEEUW, 1982), e sob condições de homeostase, as CHE apresentam uma forma quiescente. Entretanto, sob condições de estresse, estas podem se tornar ativadas, passando de um estado quiescente para o estado ativado, perdendo seu armazenamento de retinóides e adquirindo uma morfologia semelhante à miofibroblastos, desempenhando um papel importante na resposta inflamatória (FRIEDMAN, 2008).

As CES são células altamente especializadas que contribuem significativamente para a formação da parede dos sinusoides do fígado, representando a interface entre o fluxo sanguíneo e células hepáticas. Essas células contêm uma arquitetura descontínua em suas membranas que formam fenestras, e por sua vez, criam canais que possibilitam a troca de substâncias entre vasos sanguíneos e hepatócitos (NI *et al.*, 2017; POISSON *et al.*, 2017).

1.2 Doenças hepáticas e a esteatose

Distúrbios no fígado constituem um conjunto de doenças que incluem as hepatites, doenças hepáticas alcoólicas e não alcoólicas, cirrose, carcinoma hepatocelular e hemocromatose, sendo estas as maiores causadoras de mortes no mundo (WANG *et al.*, 2014). A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada um complexo conjunto de doenças não causadas pelo álcool, que varia de esteatose simples, geralmente assintomática, à esteatohepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular (SATTAR; FORREST; PREISS, 2014). Entretanto, a patogênese e os mecanismos moleculares subjacentes à progressão da doença, ainda são pouco compreendidos (FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Em geral, a prevalência global de DHGNA dobrou nos últimos 20 anos (LABRECQUE *et al.*, 2014; PERUMPAIL *et al.*, 2017) e afeta aproximadamente 20% da população mundial (SATTAR; FORREST; PREISS, 2014). O aumento de DHGNA está intimamente associado à obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2, sendo estes, na maioria das vezes, consequências de hábitos alimentares inapropriados e estilo de vida sedentário, características cada vez mais comuns no mundo desenvolvido atual (ANGULO, 2002; SAYINER *et al.*, 2016).

A esteatose hepática, foco do presente trabalho, é uma condição caracterizada pelo acúmulo de gordura (>5% do peso do fígado), principalmente de triglicerídeos, nos hepatócitos (HARDY *et al.*, 2016; KARANJIA *et al.*, 2016; BENEDICT; ZHANG, 2017), sem que haja evidência de lesão hepática (NASSIR *et al.*, 2015; KANWAR; KOWDLEY, 2016). Pode ser diferenciada em esteatose macrovesicular, quando um único e volumoso vacúolo lipídico está presente, ou em esteatose microvesicular, quando há pequenas vesículas lipídicas no citoplasma de hepatócitos (AHMED *et al.*, 2017), sendo esta uma condição rara (YEH; BRUNT, 2014). Além de fatores relacionados à alimentação, a esteatose hepática também pode resultar de fatores secundários, como infecção pelo vírus HCV, perda de peso abrupta e ingestão de drogas (amiodarona, esteroides e terapias anti-retroviral) (KARANJIA *et al.*, 2016).

Apesar de ser uma doença reversível e que não está associada com mortalidade, a esteatose pode evoluir a quadros sintomatológicos piores (esteatohepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular) (AHMED *et al.*, 2017). Em 1998, Day e James postularam a teoria dos dois eventos (*two-hit theory*), com o intuito de explicar a progressão da patogênese. De acordo com esta teoria, o acúmulo de gordura no fígado, decorrente por dieta hiperlipídica, sedentarismo ou obesidade (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016), é considerado o primeiro evento, o que poderia levar à lesão dos hepatócitos, enquanto que, em decorrência disto, fatores secundários como citocinas, disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático caracterizam o segundo evento, ativando processos inflamatórios e progredindo à esteatohepatite (LEVENE; GOLDIN, 2012; PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). Todavia, a compreensão sobre os mecanismos subjacentes à progressão da doença aumentou nos últimos anos, revelando que a complexidade da DHGNA envolve múltiplos fatores que agem coletivamente, contribuindo com o desenvolvimento da doença (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Consequentemente, houve a reformulação da teoria dos dois eventos que passou a

ser denominada teoria dos múltiplos eventos (*multiple-hit theory*), onde, além da possível predisposição genética, a resistência à insulina juntamente com a hiperinsulinemia, ingestão de álcool ou drogas, agem como “estressores” e resultam em aumento da lipogênese *de novo* (RISTIG; DRECHSLER; POWDERLY, 2005). O acúmulo de gordura torna o fígado suscetível à eventos como estresse oxidativo, apoptose e ativação das células hepáticas estreladas (TILG; MOSCHEN, 2010), que atrelados à liberação de citocinas pelas células de *Kupffer*, ocasiona em lesão nos hepatócitos e caracteriza na transição para esteatohepatite e fibrose (YILMAZ, 2012; HARDY *et al.*, 2016).

Por ser uma doença assintomática, na maioria das vezes, os pacientes esteatóticos demoram a descobrir a doença, sendo revelada em exames de rotina (TOLMAN; DALPIAZ, 2007). A demora em descobrir/ diagnosticar a doença, a baixa conscientização dos pacientes que possuem risco de progressão e a falta de diagnósticos precisos e confiáveis, explicam o porquê de a doença só ser identificada em estágios mais avançados (RATZIU *et al.*, 2012), podendo até mesmo potencializar as doenças hepáticas terminais. Resultados de estudos demonstraram que, além da morte relacionada propriamente ao fígado, os pacientes apresentam riscos aumentados de desenvolverem doenças cardiovasculares, o que leva a uma frequência aumentada de mortalidade (AHMED *et al.*, 2017).

Ainda que a compreensão sobre a patofisiologia da DHGNA tenha crescido significativamente nos últimos anos, a falta de tratamentos farmacológicos específicos para esteatose também é uma problemática (AHMED *et al.*, 2017). A heterogeneidade de DHGNA é um fator-chave que dificulta o desenvolvimento de terapias apropriadas (HAAS; FRANCQUE; STAELS, 2016) e a falta de detalhamentos moleculares sobre o desenvolvimento dessa patologia limita as inovações farmacológicas. Os poucos tratamentos satisfatórios disponíveis são indicados para estágios mais avançados de DHGNA, como esteatohepatite e fibrose (AHMED *et al.*, 2017). Como DHGNA está intrinsecamente ligada à obesidade, resistência à insulina e dislipidemia, os tratamentos disponíveis são direcionados para o estresse oxidativo (antioxidantes), anti-inflamatórios, sensibilizadores de insulina e fármacos que induzam a perda de peso (AHMED *et al.*, 2017). No que tange à esteatose hepática, uma opção alternativa para o tratamento pode ser a modificação do estilo de vida. Dieta e exercícios físicos podem auxiliar na perda de peso gradual e conseqüentemente, na diminuição do acúmulo de gordura hepática (BENEDICT; ZHANG, 2017). Todavia, determinar a taxa

de perda de peso é um fator importante, considerando-se que evidências sugerem que o rápido emagrecimento pode até mesmo agravar as doenças do quadro DHGNA (TSAI *et al.*, 2017).

1.3 Metabolismo de lipídeos na esteatose hepática

O fígado apresenta papel fundamental no metabolismo lipídico, atuando no armazenamento, na síntese e na oxidação dos ácidos graxos (AGs) (CHIANG, 2014). Lipídeos são os principais constituintes das membranas celulares, participam de sinalizações intracelulares e desempenham funções importantes como precursores de ligantes de receptores nucleares (CALDER, 2015). Mais especificamente, ácidos graxos e triglicerídeos são as formas de energia mais comuns que podem ser armazenadas e utilizadas quando os níveis de glicose no sangue estão baixos (CALDER, 2015). O volume de gotículas lipídicas armazenadas em hepatócitos é rigorosamente regulado por fatores de transcrição e moléculas celulares, que podem ativar ou inibir no fígado a captação de ácidos graxos, síntese, esterificação, oxidação mitocondrial e exportação dos triglicerídeos (HARDY *et al.*, 2016). Alterações nesses processos como aumento da absorção de ácidos graxos e consequente diminuição na taxa de oxidação/ exportação, pode desencadear o desenvolvimento de esteatose hepática. A redução na síntese de VLDL (*very low density lipoprotein*), lipoproteína responsável pela captação de triglicerídeos circulantes, também pode contribuir para o aumento da absorção desses lipídeos pelo fígado (NASSIR *et al.*, 2015).

Os lipídeos que contribuem para a esteatose hepática são oriundos da lipogênese *de novo* e do tecido adiposo (através da lipólise) (NASSIR *et al.*, 2015). Evidências sugerem que a resistência à insulina é o principal fator no que tange ao aumento da lipólise no tecido adiposo, aumentando proporcionalmente a circulação de ácidos graxos livres no sangue (AHMED *et al.*, 2017). Além do mais, a má alimentação também contribui para a acumulação de lipídeos hepáticos, segundo Donnelly *et al.*, (2005), que demonstraram que aproximadamente 15% dos lipídeos hepáticos no fígado de pacientes com DHGNA são oriundos de lipídeos dietéticos. Logo, a ingestão de lipídeos através da dieta pode desempenhar um papel crucial na acumulação de gordura hepática (SOZIO; LIANGPUNSAKUL; CRABB, 2010).

A acumulação massiva de lipídeos nos hepatócitos pode resultar na disfunção mitocondrial. As ultraestruturas mitocondriais podem sofrer lesões, perda de DNA mitocondrial (mtDNA) e uma diminuição nas atividades dos complexos da cadeia

respiratória (WEI *et al.*, 2008), o que, por sua vez, pode impactar diretamente na transferência de elétrons de intermediários respiratórios anteriores para o oxigênio molecular, aumentando consideravelmente a produção de ERO (HENSLEY *et al.*, 2000; BENEDICT; ZHANG, 2017). Ainda, há regulação positiva de citocinas pró-apoptóticas e pró-inflamatórias (AHMED *et al.*, 2017), levando o hepatócito a apoptose, necroinflamação e fibrose (TOLMAN; DALPIAZ, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) é um importante local para processamento de proteínas recém-sintetizadas, auxiliando na modificação pós-traducional e enovelamento adequados (BODEN *et al.*, 2011; SCHWARZ; BLOWER, 2016). Quando a capacidade de processamento do RE é excedida, a resposta a proteína desnovelada (UPR - *Unfolded Protein Response*) é ativada (BENEDICT; ZHANG, 2017). Estudos mostraram que o excesso de gordura também pode sobrecarregar o RE, promovendo uma sobrecarga de proteínas desnoveladas e estimulando a ativação da UPR (WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006; PINEAU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2014).

Parte dos AGs hepáticos são originados da síntese *de novo*, que tem início com a molécula acetil-CoA e tem como produto um ácido graxo de 16 carbonos, o ácido palmítico, que ainda pode ser insaturado e/ou alongado (DIJKSTRA; HAMILTON; HAMM, 2008; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). A síntese *de novo* ocorre no fígado e implica uma complexa série de reações, sendo estritamente regulada por fatores de transcrição (FERRAMOSCA; ZARA, 2014). Os níveis elevados de insulina, por exemplo, induzem a expressão de genes lipogênicos através da ação da Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol-1c (SREBP-1c), que se caracteriza como um fator de transcrição que colabora com a expressão de genes que favorecem a síntese *de novo* de AGs, aumentando seus níveis intracelulares (DENTIN; GIRARD; POSTIC, 2005; AMEER *et al.*, 2014).

Basicamente, a insulina, hormônio que desempenha papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico, estimula a via glicolítica para produzir o composto orgânico acetil-CoA, que pode ser derivado do metabolismo de carboidratos ou de aminoácidos (NELSON; COX, 2014). Por ser uma molécula mitocondrial, o acetil-CoA precisa ser transportado da matriz mitocondrial para o citosol, de modo a dar início à síntese de ácidos graxos. Assim, o acetil-CoA é condensado ao oxaloacetato, formando uma molécula de citrato. O citrato, por sua vez, é transportado da matriz mitocondrial pelo translocador de citrato (CIC). Já no citosol, o citrato é novamente

convertido em acetil-CoA e oxaloacetato a partir da enzima citrato liase (ACLY), dando início a síntese de AGs (WATSON; LOWESTEIN, 1970; CHIANG, 2014). No citosol, o acetil-CoA é convertido em malonil-CoA a partir de uma carboxilação catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACC). Enquanto a ACC1 é uma enzima citosólica e desempenha função crucial na síntese de AGs, a enzima ACC2 é residente na membrana mitocondrial e tem papel na inibição da degradação de AGs, produzindo altas concentrações de malonil-CoA que podem inibir alostericamente a proteína carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), impedindo, conseqüentemente, a entrada de AGs na matriz mitocondrial para a β -oxidação (GOEDEKE *et al.*, 2018).

Posteriormente, a enzima ácido graxo sintase (FASN), que consiste num complexo proteico que possui múltiplos domínios, vai possibilitar a construção dos ácidos graxos, estendendo sequencialmente a cadeia carbônica do malonil numa seqüência de reações de condensação, redução, desidratação e redução, respectivamente (NELSON; COX, 2014), até finalmente formar o ácido palmítico (FERRAMOSCA; ZARA, 2014). O ácido palmítico pode sofrer modificações das elongases (ELOVL) e dessaturases (SCD), que por sua vez, poderão adicionar mais carbonos e duplas ligações para formar ácidos graxos de cadeias maiores, mono e poli-insaturados (CHIANG, 2014).

Após esse processo, os ácidos graxos sintetizados podem ser armazenados na forma de TGs. Na via de síntese de TGs, a enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) adiciona acil-CoA ao glicerol-3-fosfato (intermediário do metabolismo de carboidratos), formando o ácido lisofosfatídico (LPA). Posteriormente, a 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) condensa mais uma molécula de acil-CoA para produzir o ácido fosfatídico (PA), que é desfosforilado pela lipina 1 (ou PAP), formando 1,2-diacilglicerol (DAG) (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). Por fim, a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) converte diacilglicerol em TGs, que podem ser armazenados como gotículas lipídicas, exportados pela corrente sanguínea através das lipoproteínas, atuar como combustível energético e componentes estruturais nas membranas celulares (CHIANG, 2014).

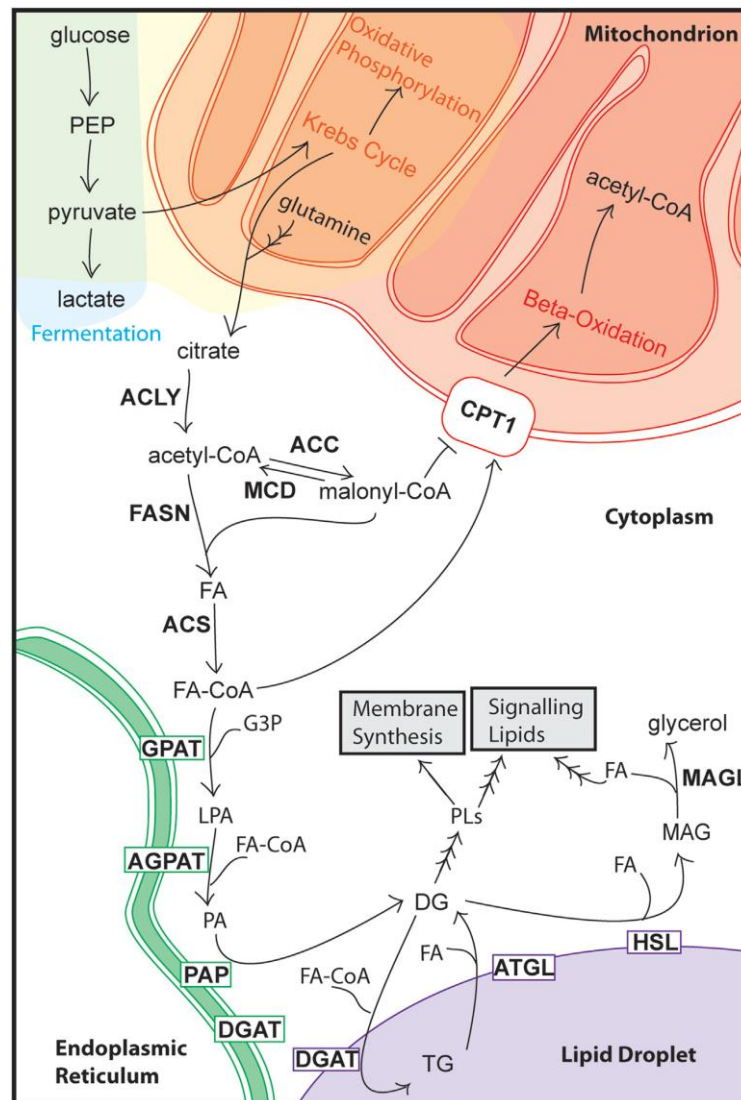
Os AGs livres podem ser derivados da síntese *de novo*, lipólise do tecido adiposo ou mesmo da dieta (LOU-BONAFONTE; ARNAL; OSADA, 2011) e entram nos hepatócitos através das proteínas de membrana, como as Proteínas de Transporte de Ácidos Graxos (FATPs), Translocases de Ácidos Graxos (CD36) (NASSIR *et al.*, 2015) e as Proteínas de Ligação de Ácidos Graxos (FABP) (SOZIO;

LIANGPUNSAKUL; CRABB, 2010). Estudos já mostraram, inclusive, que a superexpressão de um determinado tipo de FATP, a FATP5, aumenta a absorção de ácidos graxos (DOEGE *et al.*, 2006), e que a expressão de CD36 está diretamente relacionada com o acúmulo de lipídeos hepáticos (NASSIR *et al.*, 2015).

Quando os níveis de glucagon estão altos, a enzima ACC1 é inibida reduzindo a síntese de ácidos graxos. Concomitantemente, os AGs são ativados pela acil-CoA sintetase que os liga à acetil-CoA, formando acil-CoA graxo, que é transportado para o interior das mitocôndrias através da carnitina-palmitoil transferase I (CPTI) e II (CPT II), onde as reações de β -oxidação ocorrem (NELSON; COX, 2014), gerando novamente moléculas de acetil-CoA e ATP (CHIANG, 2014). A Figura 2 esquematiza a via de síntese *de novo*, armazenamento e oxidação dos AGs.

É evidente que o metabolismo lipídico é extremamente coordenado e complexo, o que torna claro que a desregulação desse metabolismo pode comprometer a função hepática e levar ao desenvolvimento de esteatose hepática. Portanto, compreender os mecanismos do metabolismo lipídico certamente contribuirá com a elucidação de detalhes da DHGNA e com a caracterização de novas moléculas potencialmente terapêuticas.

Figura 2. Vias de síntese *de novo* e oxidação de ácidos graxos.



Fonte: Currie *et al.*, 2013.

1.4 MiRNA como ferramenta biotecnológica

Desde que foi caracterizado por Lee e colegas, em 1993, diversos estudos apontam a atuação funcional de microRNAs (miRNAs) no equilíbrio celular e em patologias, incluindo DHGNA, o que o torna um elemento potencial como alvo terapêutico (GERHARD; DISTEFANO, 2015). Estudos humanos encontraram miRNAs específicos regulados positivamente em doenças hepáticas, como o miR-122. Por estar envolvido na expressão de diversos genes relacionados no colesterol hepático e metabolismo lipídico (SZABO; BALA, 2013), este miRNA mostrou ser regulado positivamente em pacientes com DHGNA, quando comparado à níveis séricos de pacientes saudáveis (HAYES; CHAYAMA, 2016).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples (com aproximadamente 18-25 nucleotídeos) que podem regular a expressão gênica pós-transcricional através do bloqueio da tradução ou clivagem de alvos específicos (JIN *et al.*, 2012) pela sua interação com regiões 3' não traduzidas (UTR) de mRNAs alvos, afetando os níveis proteicos da célula (KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018).

MiRNAs são transcritos pela polimerase Pol II ou III a partir de vias canônicas ou não-canônicas (LI; RANA, 2014). Os miRNAs canônicos são transcritos como miRNA primário (pri-miRNA), que possuem muitos nucleotídeos de comprimento (centenas a milhares) (SZABO; BALA, 2013; HAYES; CHAYAMA, 2016). Essa molécula primária é, em seguida, processada pelo complexo proteico RNase III composto pelas enzimas Drosha e Di George syndrome critical region 8 (DGCR8) (LI; RANA, 2014; WANG; CHEN; SEN, 2016), em pré-miRNA, um produto com aproximadamente 70 nucleotídeos, cuja estrutura se parecia formando estruturas tipo grampo (*hairpin*) (HAN *et al.*, 2006). Esse pré-miRNA é, então, transportado pela exportina-5 até o citoplasma, quando uma de suas fitas é clivada pela Dicer juntamente com TRBP, tornando-se um miRNA maduro de fita dupla (KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018). Posteriormente, uma das fitas do miRNA maduro (normalmente a fita menos estável) é degradada por helicases, enquanto a outra fita é incorporada ao Complexo Indutor de Silenciamento (RISC), composto pelas proteínas Argonauta 2 (Ago2) e GW182, tornando-se apto para reconhecer seu mRNA alvo através da complementaridade de Watson-Crick (extremidade 5' do miRNA com a extremidade 3' de seu mRNA-alvo) (HAYES; CHAYAMA, 2016; KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018). O grau de complementaridade da região é quem vai determinar o destino do RNA mensageiro-alvo: ativação, clivagem ou repressão traducional (KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018) (Figura 3).

MiRNAs transcritos a partir da via não-canônica diferem da biogênese da via anterior por não terem a digestão mediada pelo complexo Drosha-DGCR8. Desta forma, os pre-miRNAs são gerados através da maquinaria de *splicing* (LI; RANA, 2014).

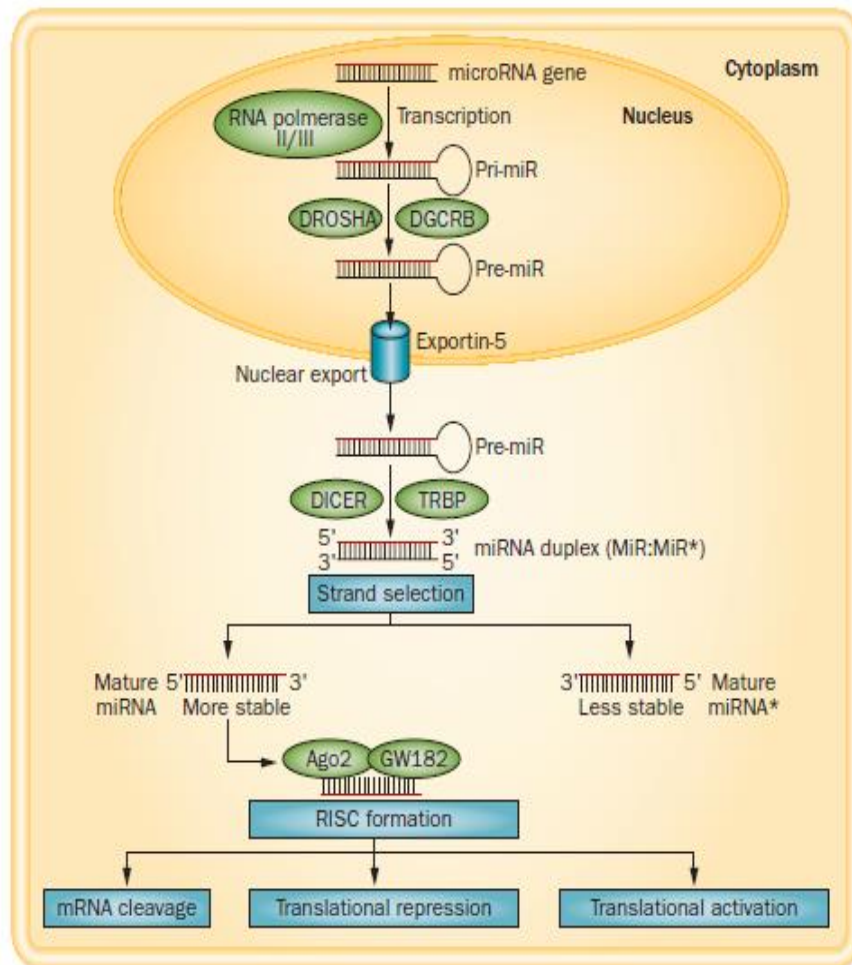
Estudos já demonstraram diversos miRNAs regulando genes envolvidos no metabolismo lipídico, confirmando sua importância na homeostase hepática (SZABO; BALA, 2013). Esses miRNAs podem ter como alvo enzimas cruciais do metabolismo lipídico, como a FASN, enzima responsável pela síntese de ácidos graxos (BHATIA; VERMA; DATTA, 2014), as carnitina palmitoil transferases (CPT) I e II, envolvidas no

processo de transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria (ILIOPOULOS *et al.*, 2010), e a SIRT1 hepática, enzima envolvida no aumento da beta-oxidação (LEE *et al.*, 2010) entre outras.

O microRNA-1914-5p possui 22 nucleotídeos, onde se localiza no cromossomo 20 (20q13.33) humano. O miR-1914 foi identificado por Li *et al.* (2015), em estudo analisando a expressão de diversos miRNAs relacionados com o câncer gástrico. Outros estudos também relacionaram a expressão do miR-1914 em outros cânceres, como o câncer colorretal (HU *et al.*, 2016) e linfoma de células T (LIN *et al.*, 2017). No que tange ao metabolismo lipídico, De Oliveira da Silva e colaboradores (2018) postularam, recentemente, a participação do miR-1914-5p na modulação do metabolismo lipídico em linhagens humanas de células estreladas hepáticas. Seus resultados mostraram que este miRNA está intimamente relacionado com a biossíntese de ácidos graxos, além de alterar o ambiente celular e contribuir para o controle da fibrogênese hepática.

Abordagens destinadas a traçar as redes de interações e atuação do miRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e, conseqüente a sua correlação com o processo de esteatose hepática, irão melhorar nossa compreensão sobre o seu efeito mecanístico nas doenças hepáticas.

Figura 3. Via canônica da biogênese do miRNA.



Fonte: Szabo; Bala, 2013.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estabelecer um modelo celular de cocultura em quadro pró-esteatótico e avaliar o papel funcional do miRNA-1914-5p no metabolismo lipídico.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar condições de cocultivo celular e indução de esteatose celular;
- Padronizar a transfecção das coculturas com o miR-1914-5p para se avaliar o efeito sistêmico do mesmo no metabolismo lipídico e no equilíbrio celular;
- Realizar análises de microscopia de fluorescência para avaliar o acúmulo de gotículas de lipídeos intracelulares;
- Realizar ensaios bioquímicos para mensuração de triglicerídeos, colesterol e lipídeos totais nas culturas celulares;
- Realizar ensaio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS) para quantificação de ácidos graxos relevantes;
- Avaliar o efeito sistêmico do miR-1914-5p na modulação transcricional de genes correlatos ao metabolismo lipídico, buscando inferir rotas metabólicas centrais moduladas pelo miRNA em estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Culturas de células e ensaios de viabilidade celular (MTT)

Para padronização das concentrações de ácidos graxos a serem utilizadas, células hepáticas estreladas (CHE), LX-2 (XU *et al.*, 2005), e células de carcinoma hepatocelular, HepG2 (ATCC® HB-8065™), foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibiótico Gibco™ *Antibiotic-Antimycotic* (Thermo Fisher Scientific). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂ até atingirem 90% de confluência para a realização dos ensaios, que foram realizados com as linhagens isoladas e/ ou utilizando-se cocultura de CHE e hepatócito, seguindo metodologia descrita em De Oliveira da Silva *et al.* (2018).

Para início das análises, ensaios de viabilidade celular (MTT) foram realizados adaptando-se o protocolo descrito em Mosmann (1983). Nesses ensaios foram avaliadas diferentes concentrações de uma mistura de ácidos graxos (AGs) oleico e palmítico (Sigma-Aldrich) na proporção de 2:1. Diferentes concentrações do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionadas às culturas celulares de maneira equivalente ao volume de solvente presente na mistura de AG (v/v).

Para os ensaios de padronização, e considerando-se o tempo de duplicação celular das culturas independentes ou em cocultivo, células foram adicionadas em placas de 96 poços. Para essas análises, em cada um dos poços das microplacas foram cultivadas 5 x 10³ células LX-2 isoladamente, ou 1 x 10⁴ células HepG2 isoladamente, ou 1 x 10⁴ células combinadas em cocultura (CHE e HepG2, na proporção de 7 hepatócitos : 3 CHE; DE OLIVEIRA DA SILVA *et al.*, 2018). Após 24 h de cultivo iniciais, foram adicionadas diferentes concentrações dos AGs ou DMSO (v/v) às culturas, que foram novamente incubadas a 37° C a 5% de CO₂ por um intervalo subsequente de mais 24 h.

Após os intervalos de incubação com os AGs ou DMSO, o reagente Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adicionado na concentração de 0,2 µg/ µL por poço e incubado durante a noite em temperatura de 37° C a 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado DMSO para a solubilização dos cristais de formazan, para viabilizar a leitura. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram avaliados em leitor de microplaca EZ Read 400 Microplate Reader (Biochrom) em absorvância de $\lambda = 570$ nm.

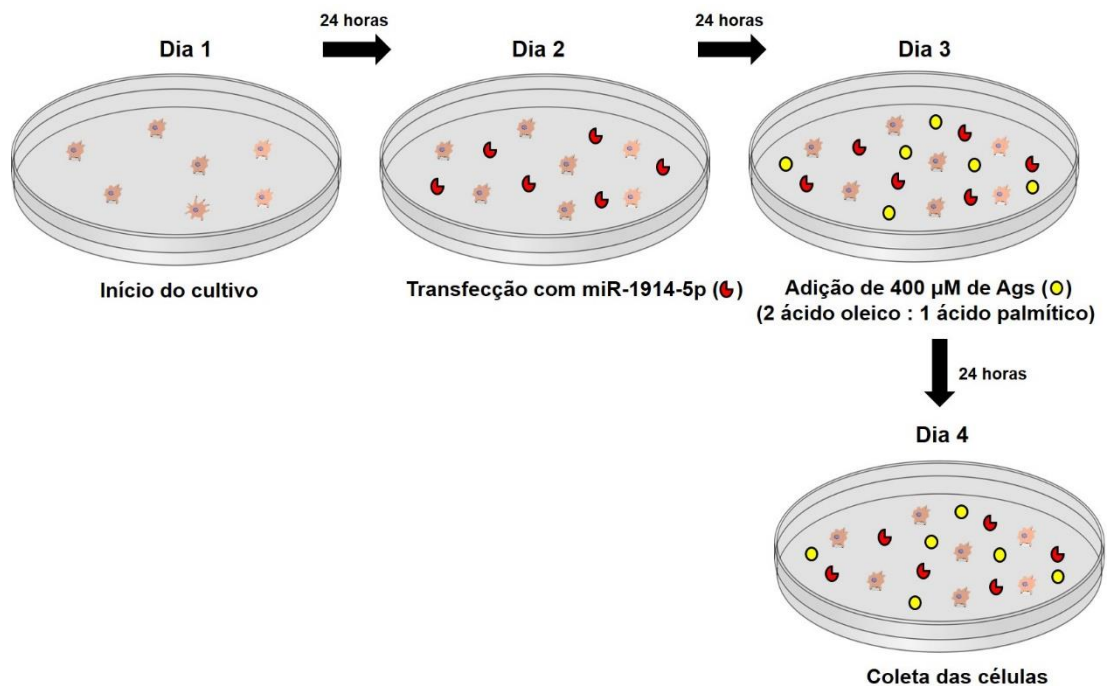
3.2 Transfecções celulares

Para realização dos ensaios que envolveram transfecções celulares do miR-1914-5p (*Ambion*[®], Thermo Fisher Scientific), as células foram cultivadas durante 24 horas em meio DMEM contendo 10% de SBF em garrafas de 25 cm², ou placas de 6 poços ou placas de 24 poços apropriadas para cultura celular. Posteriormente, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM fresco e, em seguida, as células foram transfectadas com diferentes concentrações de mímico (moléculas que mimetizam o miRNA, aumentando seus níveis intracelulares) e inibidor (moléculas complementares que se pareiam nas fitas do miRNA e conseqüentemente inibem sua expressão) do miR-1914-5p, visando determinar as melhores condições de transfecção para as análises funcionais do miR-1914-5p.

As transfecções foram realizadas seguindo as instruções do fornecedor do reagente Lipofectamine™ RNAiMAX *Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific). Para isto, as moléculas de mímico ou inibidor foram diluídas em Opti-MEM[®] *Medium* (Thermo Fisher Scientific), meio de cultura que contém baixas concentrações de soro. Essas misturas foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Concomitantemente, o agente de transfecção foi aliqüotado em outro tubo e diluído em Opti-MEM[®] *Medium*, e também incubado pelo mesmo intervalo. Em seguida, as moléculas sintéticas do miRNA foram misturadas ao agente de transfecção, seguido de nova incubação por 10 minutos, que permitiu uma complexa interação entre eles e formação de lipossomas utilizadas na transfecção. Posteriormente, essa mistura foi adicionada às culturas celulares.

Em seguida, as células foram incubadas com a mistura de AGs padronizada nos ensaios de MTT (item 3.1) e mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂ por mais 24 h e, em seguida, utilizadas em diferentes análises (Figura 4).

Figura 4. Modelo celular experimental com transfecção de moléculas mimetizadoras ou inibidoras do miR-1914-5p, seguida da incubação com AGs para indução de esteatose.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

3.3 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares

3.3.1 Mensuração de Triglicerídeos

Para se mensurar os níveis de triglicerídeos intracelulares, $2,5 \times 10^5$ células LX-2 ou 5×10^5 cocultivo de células HepG2 e LX-2 foram semeadas em garrafas de 25 cm² e cultivadas como descrito anteriormente. Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM fresco. Posteriormente, as células foram incubadas com a mistura de 400 µM de AGs por mais 24 h e então coletadas para análises.

Para as análises funcionais do miR-1914-5p na produção de triglicerídeos (TGs), as células foram transfectadas com diferentes concentrações do miRNA, como descrito no item 3.2.

Após os intervalos de crescimento, incubação com AG e/ ou transfecções, as células foram coletadas e lavadas com 5 mL de tampão fosfato (PBS) contendo 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM, mais 0,68 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Em seguida, as células foram centrifugadas à 3000 rpm por um intervalo de 4 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso com 100 µL de PBS-EDTA e colocado em tubos de 1,5 mL previamente tratados com NaOH 2%, para remoção de contaminantes derivados de

AGs exógenos ao ensaio. Os triglicerídeos das células coletadas foram analisados com reagentes comerciais (Triglicérides Liquiform, LabTest), seguindo as recomendações dos fabricantes. As mensurações dos resultados foram realizadas posteriormente no espectrofotômetro Thermo Biomate 3 UV-Vis (Thermo Fischer Scientific) em absorvância de $\lambda = 505$ nm.

3.3.2 Mensuração de Colesterol

Para se avaliar as possíveis alterações nos níveis de colesterol em nosso modelo de estudo, estes foram mensurados de forma semelhante aos triglicerídeos, exceto pela lavagem das garrafas, que foi feita utilizando 5 mL de PBS 1 X e as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS 1 X, seguindo as recomendações do fornecedor do reagente.

A coleta das células cultivadas nas garrafas foi realizada após 24 h de incubação com os AGs. O colesterol intracelular coletado foi analisado com reagentes comerciais (Colesterol Liquiform, da LabTest), seguindo as recomendações dos fabricantes. A mensuração dos resultados foi realizada posteriormente no espectrofotômetro Thermo Biomate 3 UV-Vis (Thermo Fischer Scientific) em absorvância de $\lambda = 500$ nm.

Em seguida, como descrito acima, as transfecções foram realizadas e as células foram incubadas com a mistura de AGs e novas análises de mensuração de colesterol foram realizadas.

3.3.3 Mensuração de Glicose

Para mensuração dos níveis de glicose, células LX-2 e HepG2 foram cultivadas, coletadas e mensuradas conforme descrito no item 3.3.2.

A glicose intracelular coletada foi analisada com reagentes comerciais (Glicose Liquiform, da LabTest), seguindo as recomendações dos fabricantes.

3.4 Análises de metabolismo lipídico

3.4.1 Quantificação e identificação de ácidos graxos via Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS)

Para quantificar os AGs presentes nas células, $1,2 \times 10^5$ células LX-2 e $2,2 \times 10^5$ do cocultivo das células HepG2 e LX-2 (7:3) foram crescidas em placas de 6 poços, incubadas com AGs e transfectadas, conforme mencionado anteriormente no

item 3.2. Os extratos celulares obtidos foram lavados duas vezes com PBS 1 X e armazenados em tubos previamente tratados com NaOH 2%, para remoção de contaminantes derivados de AGs exógenos ao ensaio. Posteriormente, os extratos foram submetidos ao processo de esterificação, descrito por Fischer (Fischer & Speier, 1895), que permite uma maior movimentação dos ésteres de AGs na coluna cromatográfica. Para isso, os extratos foram ressuspensos com metanol e a posterior remoção dos ácidos graxos foi utilizando reações de saponificação com hidróxido de potássio (NaOH). Ácido sulfúrico foi adicionado para a metilação dos AGs, contribuindo para o aumento da volatilidade e melhora da estabilidade das amostras na coluna cromatográfica. As amostras foram eluídas com hexano para análise em CG/MS, utilizando um cromatógrafo GC-210 (Shimadzu Scientific Instruments, Japão). O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização de elétrons a 70 eV com detecção de 40 a 500 mZ. Os padrões utilizados nas curvas de calibração incluíram ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido mirístico (C14:0), ácido araquidônico (C20:4), ácido esteárico (C18:0) e ácido erúico (C22:1) para identificação dos AGs amostrais.

3.4.2 Análises de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para essas análises, $2,2 \times 10^5$ de células HepG2 cocultivadas com células LX-2 (7:3) e $1,2 \times 10^5$ de células LX-2 cultivadas individualmente foram semeadas em placas de 6 poços, transfectadas e incubadas com AGs. Ao final do ensaio, os extratos celulares foram coletados e ressuspensos em 100 μ L de PBS 1 X, depositados sobre lâminas de vidro e levados para secagem em estufa à 37° por 2 dias. As lâminas foram analisadas em aparelho Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) utilizando luz infravermelha com 32 *scans*, cujos espectros foram obtidos em absorbância. O pico da amida II (1560-1530 cm^{-1}) juntamente com mais 4 picos correspondentes aos lipídeos (2956, 2920, 2870, 2850 cm^{-1}) foram utilizados para análises, seguindo metodologia de Stuart (2004) e Sakane *et al.* (2013). Para obtenção dos resultados, a soma da área dos 4 picos referentes aos lipídeos foi feita, e então dividida pelo valor da área do pico da amida II.

3.5 Marcação de AGs por fluorescência: mensuração da β -oxidação

Para inferir os mecanismos oxidativos e a modulação do miR-1914-5p no cenário pró-esteatótico, gotículas de lipídeos intracelulares foram avaliadas. Para isso, $3,5 \times 10^4$ de células HepG2 cocultivadas com células LX-2 (7:3) e $3,5 \times 10^4$ de células LX-2 isoladas foram semeadas em lamínulas circulares contidas em placas de 24 poços e transfectadas. Após 24 horas da transfecção, foram adicionados 400 μ M da mistura de AGs ou, no caso da condição controle, adicionado meio de cultura normal. Às culturas também foi adicionado o BODIPY™ 558/568 C12 (4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid) (Thermo Fisher Scientific) na concentração de 1 μ M. O BODIPY™ 558/568 C12 é um análogo de ácido graxo saturado composto de 12 carbonos. Decorrido 16 horas da adição de C12, os meios de cultivo foram trocados por meio de cultura novo e incubados por 1 hora e 8 horas sob condições regulares de cultivo. Alguns grupos celulares foram fixados após 1 hora e outros após 8 horas de incubação.

Essa metodologia permite a realização da metodologia *pulse-chase* dos AGs C12 nas células. Como controle negativo da beta-oxidação, foi utilizado o Etomoxir (Merck), um inibidor de CPT1. O Etomoxir foi adicionado 1 hora após a troca dos meios das culturas somente na condição controle, já previamente incubadas por 16 horas com o BODIPY™ 558/568 C12, e incubado por 8 horas subsequentes e, em seguida, também fixadas. A fixação se deu em solução de paraformaldeído a 1,41% por 5 minutos e então lavadas com solução salina (PBS 0,5 X) em três séries de 5 minutos. Para a marcação do núcleo, foi utilizado DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato) na concentração de 3,33 ng/ mL por 3 minutos e então lavadas três vezes com PBS 0,5 X por 7 minutos.

A fim de determinar se os AGs C12 foram incorporados e metabolizados, os lipídeos neutros foram marcados com BODIPY™ 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (Thermo Fisher Scientific), um fluoróforo de 18 carbonos que é incorporado aos lipídeos neutros armazenados nas células. O BODIPY™ 493/503 foi usado na concentração de 0,5 μ g/ mL diluído em tampão salino-fosfato (PBS) e incubado nas lamínulas durante 20 minutos sob agitação. Posteriormente as lamínulas foram lavadas com PBS 0,5 X em três séries de 5 minutos. As lamínulas foram colocadas sob lâminas contendo N-propilgalato e analisadas com o microscópio de fluorescência BX 51 OLYMPUS.

As imagens foram analisadas e quantificadas utilizando o programa ImageJ e, juntamente com o “JACoP” plugin, foi possível determinar a localização de sobreposição da marcação do da marcação do BODIPY™ 558/568 C12 e do BODIPY™ 493/503.

3.6 Extração de RNA total, de miRNA e transcrição reversa

3.6.1 Extração de RNA total

Células LX-2 nas condições controle, incubadas apenas com AGs e/ ou transfectadas com moléculas mimetizadoras ou inibidoras do miR-1914-5p foram semeadas em placas de 6 poços, como descrito anteriormente. Os extratos celulares foram coletados e o RNA total das amostras foi extraído utilizando-se TRIZOL® Reagent (Thermo Fisher Scientific), seguindo recomendações fornecidas pelo fabricante. Para isto, as células foram ressuspensas em TRIZOL®, incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas à 12.000 g durante 5 minutos, e posteriormente foram transferidas para um tubo novo. Em cada amostra, foi adicionado 100 µL de clorofórmio (Merck) e os tubos foram agitados até a junção das fases e posterior incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas à 12.000 g por 15 minutos a 4 °C, resultando numa mistura trifásica, da qual o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. No sobrenadante, foi adicionado 250 µL de álcool isopropílico (100%), seguido de incubação em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas à 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 80%. Os tubos foram centrifugados à 7.600 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados de RNA foram colocados para secarem. Posteriormente, o RNA foi ressuspensado em 30 µL de água livre de RNase e quantificados em aparelho espectrofotômetro *NanoVue™ Plus (GE Healthcare)*, utilizando-se a razão A260/A280 (260 nm - absorvância de DNA / 280 nm – absorvância de proteína) e A260/A230 (230 nm – absorvância de contaminantes, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) para se avaliar a qualidade do RNA extraído.

3.6.2 Transcrição reversa do RNA total

Para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total obtido das diferentes condições de cultivo de células LX-2, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific). As reações de transcrição

reversa foram realizadas com 200 ng do RNA extraído, 10 μ M de oligonucleotídeos (10 X RT Random Primers), 8 mM de dNTPs [25 X dNTP Mix (100 mM)] e 1,25 U de transcriptase reversa (MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*). As reações foram colocadas em termociclador Mastercycler pro S® (Eppendorf) e incubadas a 25 °C por 10 minutos, seguido de 120 minutos de incubação a 37 °C e inativação enzimática a 85 °C por 5 minutos, seguindo as orientações do fabricante. As amostras de cDNA obtidas foram diluídas (1:10) para posterior utilização em qPCR.

3.6.3 Extração de miRNA

Para análise da expressão de miRNAs das diferentes condições de cultivo das células LX-2, as células foram cultivadas em placas de 6 poços, conforme já descrito, e os miRNAs foram extraídos utilizando-se o kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para isto, o extrato celular obtido foi ressuspendido em 700 μ L de QIAzol *Lysis Reagent* e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 140 μ L de clorofórmio, e a mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 3 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 g, por 15 minutos à 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos tubos, onde foram adicionados 1,5 x V/V de etanol 100%. Posteriormente, as amostras foram transferidas para as minis colunas (RNeasy® *Mini Column* - Qiagen®) e centrifugadas à 8.000 g por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e foram adicionados 700 μ L de tampão RWT (Qiagen®) em cada uma das colunas, seguido de nova centrifugação à 8.000 g, por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram novamente descartados e 500 μ L de tampão RPE (Qiagen®) foram adicionados as colunas, com posterior centrifugação à 8.000 g por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e adicionou-se 500 μ L de tampão RPE em cada coluna, seguido de centrifugação à 8.000 g por 2 minutos em temperatura ambiente. As colunas foram colocadas em novos tubos e 40 μ L de água livre de RNase foram adicionados sobre as membranas das colunas, seguido de centrifugação à temperatura ambiente por 1 minuto à 8.000 g para a obtenção do filtrado final contendo o miRNA total de cada amostra. O miRNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare) a 260 nm, utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 para avaliar-se a qualidade do miRNA extraído.

3.6.4 Transcrição de miRNA

O cDNA obtido foi transcrito utilizando-se o miScript II RT Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para isto, foram utilizadas 500 ng de miRNAs totais, 20 mM de tampão (5 x miScript HiSpec Buffer), 10 mM de oligonucleotídeos (10 x miScript Nucleics Mix), 10 mM da enzima transcriptase reversa (miScript Reverse Transcriptase Mix) e água livre de RNases até que se completasse o volume final de 20 µL. As reações foram feitas utilizando-se o termociclador Mastercycler pro S® (Eppendorf), com incubação à 25 °C por 10 minutos, seguido de 120 minutos a 37 °C e 85 °C por 5 minutos, para inativação da transcriptase reversa.

3.7 Análises de expressão gênica por qPCR

3.7.1 qPCR: mRNA

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o reagente SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems® - ThermoFisher Scientific) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reacion Plate – Applied Biosystems), e seladas com adesivo óptico (Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific™). Cada reação foi processada em volume final de 5 µL, contendo 0,75 µM de oligonucleotídeos, 1 µL de cDNA (1:10) e 2,5 µL de SYBR® *Green PCR Master Mix*. Os ensaios foram realizados em triplicata técnicas para todos os genes avaliados, com o controle endógeno (β -actina) presente em todas as placas. As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica (ΔC_T), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras. Os níveis dos genes alvos foram normalizados pelos níveis do controle endógeno. Os resultados foram lançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo normalizado ($\Delta\Delta C_T$). As reações de qRT-PCR foram conduzidas em aparelho AB *Applied Biosystems Step One Plus Real time PCR System*. Genes específicos e correlatos ao metabolismo de lipídeos foram desenhados com auxílio do programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e verificados em BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sequências do oligonucleotídeos utilizados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (3'-5')	Amplicon (pb)
<i>β-actina</i>	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	87
<i>SREBP1_c</i>	AATCCGCCGCGCCTTGACAG	AAGTGCAATCCATGGCTCC	107
<i>SREBP2</i>	AAGTCCAAAGCCTGGTGACA	ATTGGCCGTTTGTGTCAGCA	101
<i>ChREBP</i>	TGCAAACAGCTCTTCTCCAG	CGGACAAAAAGCAATTGAGG	100
<i>HMGCS1</i>	AGCAGGGAAGAGAATTGGAG	CCGGTGTAGCATCTTGTGTG	90
<i>HMGCR</i>	TGGTGACACAGGAACCTGAA	CCTTTCTCTGCATTCCCAAG	89
<i>ACC1</i>	TGTAAGAGCTCATTTTGGAGG A	GAATCGAGAGTGCTGGTTCAG	82
<i>ACC2</i>	GCAGCTGATGACCAACTTCA	TCCGGGTAGACTCACGAGAT	92
<i>MLYCD</i>	GACATCTCCAGCAACATCCA	CTGGGTCAAGCTGATGGAAT	108
<i>FASN</i>	TCCTGCTGACCAAGAAGTCC	CTTGCTCCTTGAAGCCATCT	87
<i>SCD1</i>	GGACGATATCTCTAGCTCCT	TCGTCTCCAACCTTATCTCCT	92
<i>ACSL4</i>	ATGGATGATTGCAGCACAGA	CTGCTTCTTTGCCAAGTGTG	80
<i>ACSL5</i>	GAGCCCACTCCTGATGATGT	GGCTCCACAGCTGTACACAA	93
<i>PPAR-γ</i>	GGCTTCATGACAAGGGAGTTT C	AACTCAAACCTTGGGCTCCATAAA G	74
<i>PPAR-α</i>	GGCCTCAGGCTATCATTACG	ACCAGCTTGAGTCGAATCGT	81
<i>Lipina 1</i>	ATGAATTACGTGGGGCAGTT	ATGATGTCAATGCACCCTGA	101
<i>Lipina 2</i>	TGAGCTCCGATGATGACAAG	TGATCCCCAGAATGGAAGAG	106
<i>Lipina 3</i>	TTCAGCCTGACACAGAGGAT	GAGCTCTGAGTCTTGCTTTCT	82
<i>DGAT1</i>	GCCTTCTTCCACGAGTACCT	AGTGGGATCTGAGCCATCA	86
<i>DGAT2</i>	TGAGTCTCTGAGCTCCATGC	AACCAGGTCAGCTCCATGAC	97
<i>ATGL</i>	GGTGGCATTTCAGACAACCT	GATGTTGGTGGAGCTGTCT	92
<i>HSL</i>	TTTGAGATGCCACTGACTGC	GAGATGAGCCTGACGAGGAC	98
<i>MAGL</i>	GATCGCCTATGTGACAGCAA	GCTCCTTGTGGAGAACATGG	87
<i>CPT1a</i>	GCTCATGGTGAACAGCAACT	TAAAGCAGGATGGCATGGAT	105
<i>CPT2</i>	CCAGCCAGCTACCACTGACT	TTAGCAGCTGTGATGCCAGT	90

3.7.2 qPCR: análise da expressão diferencial e validação do miR-1914-5p

As amostras de cDNA obtidas dos miRNAs foram utilizadas para reações de qPCR utilizando o miScript SYBR® *Green* PCR Kit (Qiagen®) para se identificar a expressão diferencial do miR-1914-5p nas diferentes condições de cultivo das células LX-2. Desta forma, cada reação foi processada em um volume final de 5 µL utilizando-se placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reacion Plate – Applied Biosystems) seladas com o adesivo óptico (Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific™). Os ensaios foram realizados em triplicadas técnicas, utilizando o controle do U6 como normalizador. As reações ocorreram em equipamento AB *Applied Biosystems Step one Plus Real time PCR System* onde as condições de ciclo possuíam uma etapa de ativação inicial de 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (desnaturação: 94 °C – 15 segundos; anelamento: 55 °C – 30 segundos; e extensão: 70 °C – 30 segundos). As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ($\Delta\Delta C_T$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras.

3.8 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad versão 5.0 (Prism Inc.), onde a média e desvio padrão foram obtidos. Foram utilizadas análises de One Way ANOVA, seguindo de *post-hoc* Dunnett ou Tukey para determinar as diferenças estatísticas entre condições de controle (células não incubadas com AGs e não transfectadas) e tratamento (incubadas com AGs e transfectadas). Valores de $p < 0,05$ foram determinados para serem estatisticamente significantes.

CAPÍTULO I: COCULTURA

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento do presente projeto foi necessário o estabelecimento de um modelo celular que respondesse ao acúmulo de lipídeos e que fosse apto a transfecções celulares. Diante do proposto, analisou-se o comportamento de cada umas das linhagens celulares utilizadas no estudo de maneira individual e em cocultura. Inicialmente foram testadas 3 linhagens de hepatócitos: HepG2 (ATCC® HB-8065™), Huh-7 (NAKABAYASHI *et al.*, 1982) e HepG2/C3A (ATCC® CRL-10741™). A partir dos resultados preliminares obtidos para cada cultura (resultados não apresentados no corpo dessa Dissertação), além das particularidades metabólicas destas linhagens, o modelo celular utilizando-se células HepG2 foi selecionado para se prosseguir com as análises.

A seguir são apresentados os resultados de maneira contextualizada e separados em grupos celulares; Capítulo I – Cocultura; Capítulo II – Linhagem LX-2. Os resultados são limitados a análise desses grupos, considerando-se que o projeto de mestrado em desenvolvimento faz parte do projeto geral da professora orientadora, que envolve, portanto, outros alunos.

4.1 Ensaio de viabilidade celular em linhagens celulares hepáticas

Análises de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) permitem mensurar a viabilidade celular, perante a incubação de células e substâncias potencialmente tóxicas. Este ensaio detecta células vivas a partir da formação de grânulos de formazan de cor púrpura nas mitocôndrias das células vivas. Esse processo ocorre quando as enzimas redutase mitocondriais estão ativas e, logo, esta conversão está diretamente relacionada ao número de células vivas (MOSMANN, 1983). O ensaio de MTT permitiu indicar concentrações de AGs que viabilizassem a sobrevivência de pelo menos 70% das células.

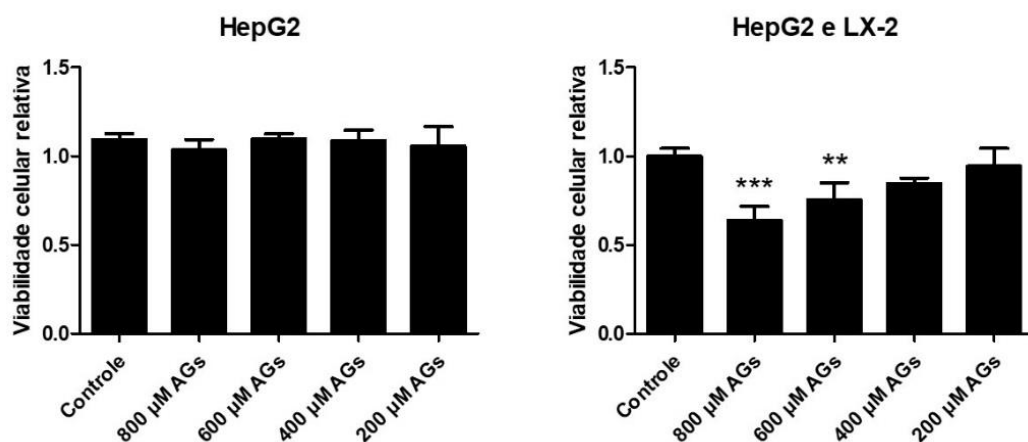
No que tange à indução de esteatose, a proporção de uso de AGs na indução de quadros celulares pró-esteatóticos está bem consolidada na literatura. Estudos mostraram que o ácido oleico induz a síntese de triglicerídeos e, conseqüente, indução de esteatose mais eficientemente que o ácido palmítico (MORAVCOVA *et al.*, 2015). Por outro lado, o ácido palmítico demonstra ser um agente citotóxico mais agressivo que o ácido oleico, pois leva à formação de espécies reativas de oxigênio (RICCHI *et al.*, 2009; MORAVCOVA *et al.*, 2015). Portanto, a escolha da combinação

entre esses dois AGs atua de maneira mais eficaz na indução do modelo esteatótico celular e é respaldada pela literatura (RICCHI *et al.*, 2009).

As incubações com as misturas de AGs foram processadas por 24 horas. Os resultados são apresentados na Figura 5 e apresentam o perfil da sobrevivência/proliferação celular quando incubadas com misturas de AGs com as diferentes linhagens utilizadas. Foi importante padronizar uma concentração de AGs que induzisse o quadro pró-esteatótico e não afetasse a viabilidade celular tanto em células cultivadas isoladamente quanto em células cocultivadas. A análise dos resultados demonstra que a incubação com diferentes concentrações da mistura de AGs nas células HepG2 não alterou sua viabilidade, enquanto que em células cocultivadas, a viabilidade celular foi alterada em concentrações maiores do que 400 μM . Assim, a concentração de 400 μM foi determinante para indução do quadro pró-esteatótico em cocultura e, portanto, a concentração escolhida para prosseguirmos com os ensaios.

As diferentes concentrações de DMSO, solvente utilizado para diluição dos AGs, não alteraram a viabilidade celular das culturas, mostrando que este solvente não foi citotóxico para as células nas diferentes concentrações utilizadas para a solubilização dos AGs (dados não mostrados).

Figura 5. Ensaio de viabilidade celular (MTT). Células hepáticas HepG2 e cocultivo de HepG2 + LX-2, incubadas com crescentes concentrações de AGs (200 μM a 800 μM - 2:1 ácidos oleico e palmítico) no período de 24 horas. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



4.2 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares

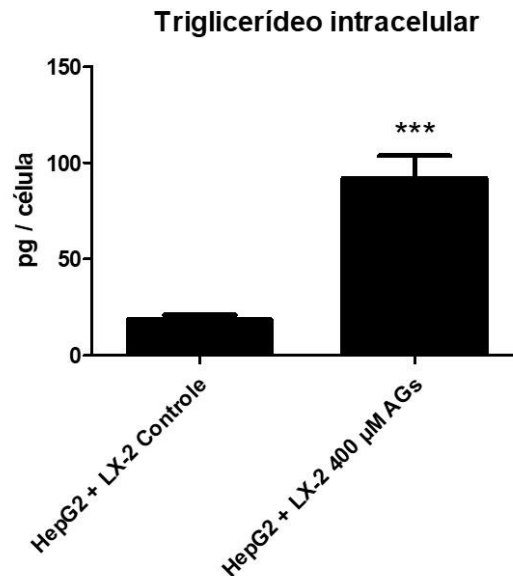
4.2.1 Níveis intracelulares de triglicerídeos nas células cocultivadas

A característica proeminente da esteatose hepática é a acumulação de triglicerídeos (TGs) no citoplasma de hepatócitos, decorrente do desequilíbrio entre aquisição lipídica e oxidação dos mesmos (TOLMAN; DALPIAZ, 2007; GUNN *et al.*, 2017). Logo, torna-se necessário mensurar os níveis de triglicerídeos nas culturas estabelecidas, na tentativa de se estabelecer o melhor modelo para a análise funcional do miR-1914-5p.

Células HepG2 carregam a mutação pontual na variante transcricional I148M do gene PNPLA3, que se baseia em taxas menores de gordura hepática derivada da lipogênese *de novo* (LDN), além de secretar menos TGs (PIRAZZI *et al.*, 2012; GUNN *et al.*, 2017). A proteína codificada pelo gene PNPLA3 age como uma lipase (HE *et al.*, 2010), cuja função é a de hidrolisar TGs armazenados, recrutando-os para a ApoB, que será secretada na forma de VLDL (PIRAZZI *et al.*, 2012; SEVASTIANOVA *et al.*, 2012). Todavia, a mutação pontual neste gene pode acarretar na incapacidade da proteína de hidrolisar TGs (HE *et al.*, 2010), levando à redução do recrutamento de AGs pela VLDL e aumento no conteúdo intracelular hepático (ROMEO *et al.*, 2008; PIRAZZI *et al.*, 2012). Consequentemente, a célula contendo alto nível de conteúdo de TG intracelular levará à diminuição da produção de novos TGs a partir da LDN.

Analisando os resultados apresentados na Figura 6, é possível visualizar um maior acúmulo de triglicerídeos na cocultura incubada com 400 μ M de AGs. Estudos realizados por diferentes autores, com células HepG2 e LX-2 cultivadas de forma isoladas, mostraram que os ácidos palmítico e/ ou oleico foram capazes de induzir acumulação lipídica após incubação (RICCHI *et al.*, 2009; EL TAGHDOUINI *et al.*, 2015).

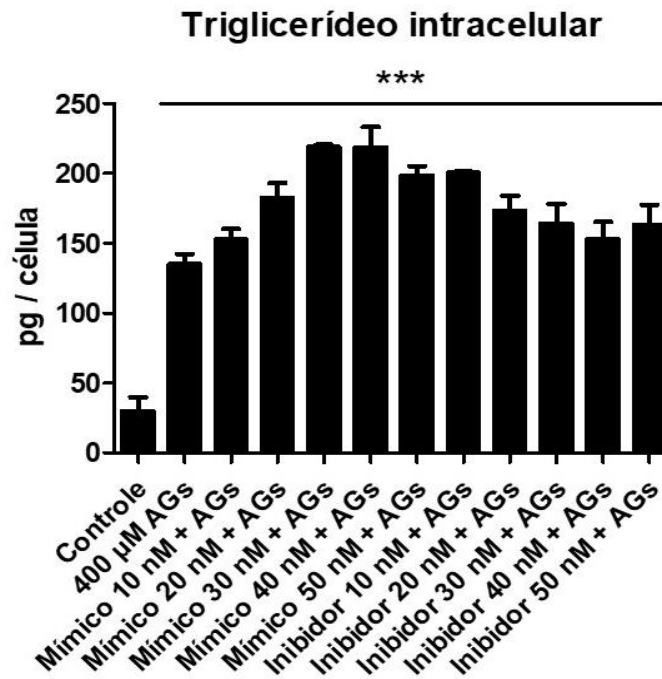
Figura 6. Mensuração dos níveis de triglicerídeos intracelulares. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3) em meio contendo 400 μM AGs – ácido oleico e palmítico (2:1) por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Posteriormente, diferentes concentrações de moléculas mimetizadoras ou inibidoras do miR-1914-5p foram utilizadas para escolha da melhor concentração a ser utilizada nas análises funcionais e que conduzissem alterações celulares e moleculares nos ensaios. A partir das transfecções com diferentes concentrações de moléculas de mímico ou inibidor do miR-1914-5p, novas análises de TGs foram realizadas.

É possível observar na Figura 7 que dentre as diversas concentrações testadas, todas apresentaram um aumento significativo no acúmulo de TGs quando comparadas à condição controle (células incubadas sem AGs). Entretanto, comparando-se as diferentes concentrações com as células incubadas apenas com AGs (400 μM) (*post-test* Tukey), as concentrações de 10 nM da condição do mímico e 30 nM, 40 nM e 50 nM da condição do inibidor não apresentaram diferença estatística, de modo a manter níveis semelhantes de acúmulo de TGs em células incubadas com AGs e não transfectadas. Ainda em comparação à condição de 400 μM , as demais concentrações, tanto de mímico quanto de inibidor, aumentaram a quantidade lipídica.

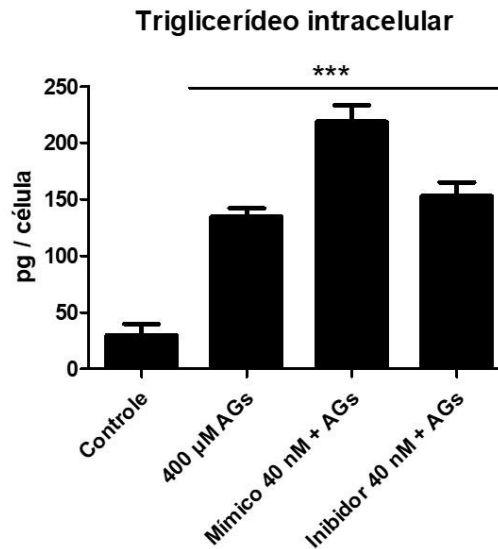
Figura 7. Mensuração dos níveis de triglicerídeos intracelulares. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (10 nM a 50 nM) ou inibidor (10 nM a 50 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Entretanto, como no presente laboratório já havia se trabalhado com a concentração de 40 nM de moléculas mimetizadoras e inibidoras do miR-1914-5p em outro modelo experimental (DA SILVEIRA, 2019), decidimos manter esta concentração nas demais análises.

Numa análise mais detalhada da Figura 7, a Figura 8 sugere que a concentração de 40 nM de moléculas mimetizadoras e inibidoras são potencialmente interessantes em seus efeitos sistêmicos. As culturas transfectadas com mímico ou inibidor do miR-1914-5p aumentaram os níveis de TGs intracelulares quando comparadas à condição controle. Entretanto, comparando-se estas duas condições às células incubadas apenas com AGs (*post-test* Tukey), a inibição do miR-1914-5p manteve seus níveis semelhantes àqueles encontrados na condição de 400 μ M, sugerindo o efeito sistêmico desse miRNA no controle do metabolismo lipídico, como esperado, considerando-se o considerável número de potenciais moléculas mensageiras reguladas pelo miR-1914-5p via mecanismos de RNA de interferência (RNAi).

Figura 8. Mensuração dos níveis de triglicerídeos intracelulares. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

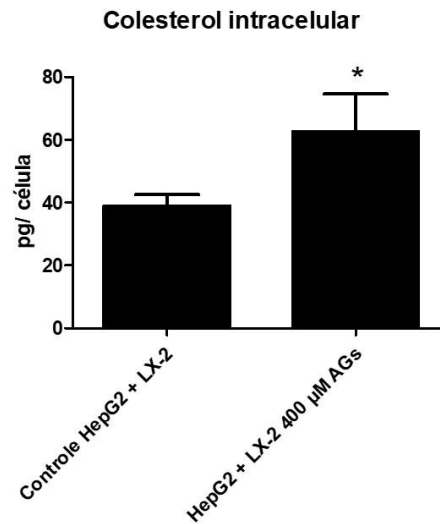


4.2.2 Níveis intracelulares de colesterol nas células cocultivadas

No quadro esteatótico, além do acúmulo de TGs em células hepáticas, o aumento dos níveis de colesterol também pode influenciar na patologia (MIN *et al.*, 2012). Sabe-se que enquanto ésteres de colesterol não são alterados, os níveis de colesterol livre tendem a ser aumentados na doença do fígado gorduroso, contribuindo, inclusive, na lipotoxicidade e progressão da esteatose à esteatohepatite (PURI *et al.*, 2007)

Os resultados obtidos (Figura 9) sugerem que o modelo celular baseado na cocultura de hepatócitos e células estreladas hepáticas estão respondendo ao estímulo realizado pela incubação com AGs e ocorre aumento nos níveis de colesterol.

Figura 9. Mensuração dos níveis de colesterol intracelulares. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3) em meio contendo 400 μ M AGs – ácido oleico e palmítico (2:1) por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



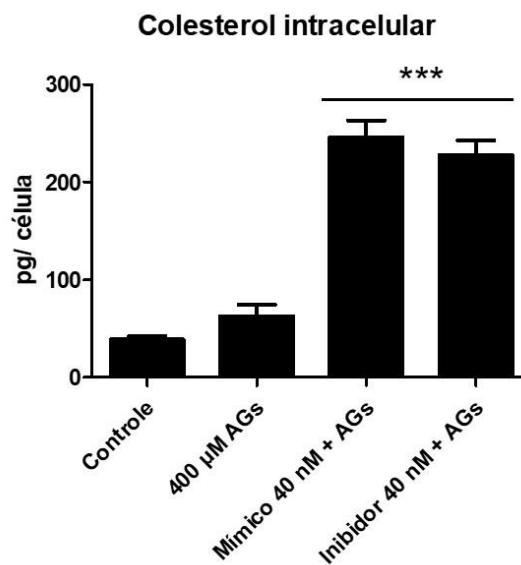
A síntese *de novo* de colesterol ocorre a partir de acetil-CoA, substrato que pode ser derivado do metabolismo da glicose, AGs e aminoácidos (SHI; TU, 2015). Na condição de esteatose, a célula capta muitos AGs do meio, de modo que destina a maior parte dos mesmos para armazenamento ao invés da oxidação, justamente pelo desequilíbrio entre acumulação e oxidação lipídica. A diminuição da oxidação, conseqüentemente, poderia diminuir a formação do substrato acetil-CoA, de modo a afetar diretamente a produção de colesterol a partir da síntese *de novo*, o que poderia explicar o aumento moderado nas concentrações intracelulares de colesterol nas células hepáticas. Recentemente, Carroll *et al.* (2018) sugeriram que a FASN pode regular a síntese de colesterol, onde a inibição da FASN reduziu os níveis de colesterol intracelular. Além do mais, o tempo de cultivo de células incubadas em AGs (24 horas) também poderia influenciar nos níveis de colesterol. É provável que em células incubadas com AGs em períodos maiores, os níveis de colesterol aumentem.

Uma vez que foi obtido os níveis de colesterol intracelulares de células incubadas com meio contendo AGs no período de 24 h, as células transfectadas tiveram seus níveis de colesterol analisados.

A partir da Figura 10, observa-se um aumento nos níveis de colesterol de células transfectadas com mímico ou inibidor do miR-1914-5p, quando comparadas às condições controle e células apenas incubadas com AGs (μ M). Entretanto, quando

as condições de mímico e inibidor são comparadas entre si (*post-test* Tukey), não há diferença nos níveis de colesterol, sugerindo que o aumento ou inibição do miR-1914-5p não afeta diretamente o metabolismo de colesterol.

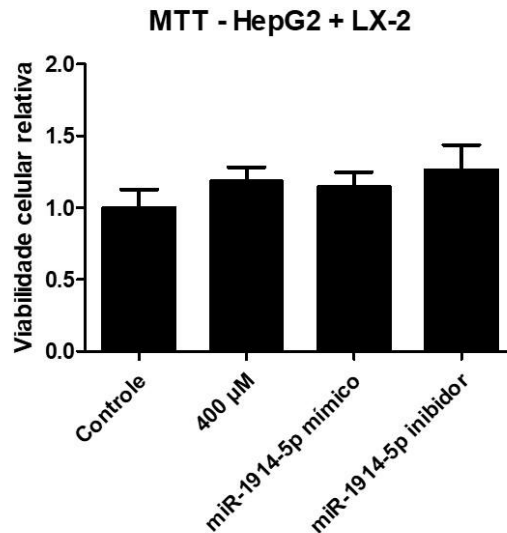
Figura 10. Mensuração dos níveis de colesterol intracelulares. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácido oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



4.3 Ensaio de viabilidade celular em coculturas transfectadas com o miR-1914-5p

Análises de viabilidade celular utilizando MTT foram feitas em células incubadas com AGs e transfectadas com mímico ou inibidor do miR-1914-5p. Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que as transfecções celulares de mímico ou inibidor não interferiram na viabilidade celular, mantendo seus níveis de viabilidade semelhantes à condição controle.

Figura 11. Ensaio de viabilidade celular (MTT). Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

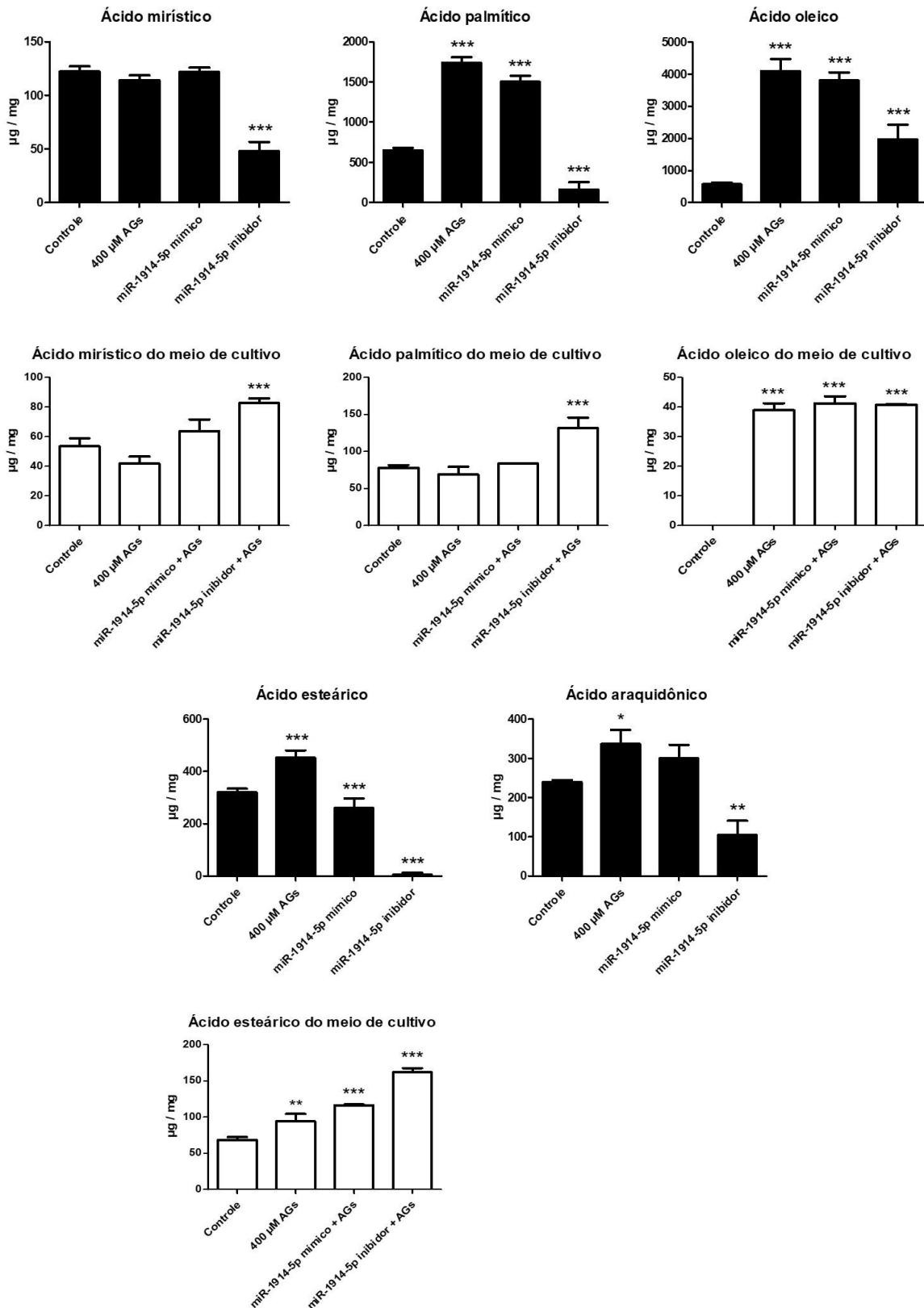


4.4 Análises de metabolismo de lipídeos

4.4.1 Quantificação e identificação de ácidos graxos através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS)

Os ensaios de cromatografia permitiram identificar os principais ácidos graxos presentes tanto intracelularmente quanto no meio celular. Na Figura 12, no que se refere à cocultura, os ácidos graxos identificados foram os ácidos mirístico, palmítico, oleico, esteárico e araquidônico, sendo os ácidos oleico e palmítico os mais abundantes na cultura celular, o que é explicado pela incubação das células com ácidos oleico e palmítico (2:1) para indução de esteatose.

Figura 12. Análise de GC-MS. Quantidade em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de AGs em células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μM AGs – ácido oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



O ácido mirístico é um AG de 14 carbonos não sintetizado pela FASN hepática, uma vez que esta enzima sintetiza AGs a partir de 16 carbonos. Análises do meio DMEM utilizado no cultivo celular foram realizadas (DA SILVEIRA, 2019), e mostraram que o meio de cultura forneceu o ácido mirístico. Isto poderia indicar que as células obtiveram esse AG através do transporte.

Ainda na Figura 12 é possível observar que, ao contrário do observado no aumento do miR-1914-5p, a inibição deste miRNA diminuiu consideravelmente todos os ácidos graxos identificados. Analisando os gráficos referentes ao meio celular, notou-se que, a inibição do miR-1914-5p aumentou a quantidade de AGs dispostos no meio celular, sugerindo que a célula estaria exportando os AGs para o meio.

Existem várias proteínas que estão envolvidas no transporte de AGs através da membrana, podendo até mesmo trabalhar simultaneamente para facilitar a absorção dos mesmos (THOMPSON; LOBO; BERNLOHR, 2010). É provável que, após a hidrólise de TGs, os AGs resultantes se liguem às proteínas de ligação ao ácido graxo (FABP) e sejam, posteriormente, transportados para o citoplasma através dos transportadores de AGs (CD36), resultando no efluxo de AGs (DUTTARROY, 2003; MARTIUS *et al.*, 2014). A captação e o transporte de AGs são estritamente regulados no fígado (MASHEK, 2013), inclusive por fatores de transcrição que podem induzir a expressão de várias dessas proteínas envolvidas na captação dos AGs (MANDARD; MÜLLER; KERSTEN, 2004).

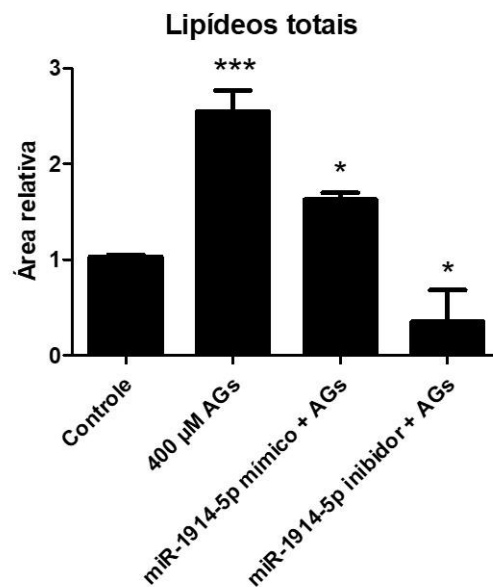
A família PPAR constitui fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes relacionados à captação de AGs. O PPAR- α , por exemplo, pode regular positivamente transportadores de AGs, como FAT/CD36. De Oliveira da Silva *et al.* (2018) mostraram a relação indireta do miR-1914-5p e a expressão de PPAR- α no modelo celular de células estreladas hepáticas. Segundo POPEIJUS e colaboradores (2014), o ácido mirístico também pode modular levemente a atividade deste receptor nuclear, ativando, conseqüentemente, genes relacionados à via de oxidação lipídica.

4.4.2 Quantificação de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As células de mamíferos podem expressar muitas espécies lipídicas diferentes (MURO; ATILLA-GOKCUMEN; EGGERT, 2014) e sabe-se que na condição de DHGNA, essas moléculas são alteradas. Um estudo publicado em 2007 identificou alterações na homeostase lipídica que podem ser importantes na fisiopatologia de

DHGNA, mostrando um aumento na composição de DGs, TGs, colesterol livre e fosfolípídeos, corroborando, inclusive, na evidência existente de que o acúmulo de TGs é um fator-chave do fígado gorduroso (PURI *et al.*, 2007). A mensuração da quantidade total de lipídeos contidos nas células cocultivadas foi realizada através do ensaio de FT-IR e os resultados são apresentados na Figura 13.

Figura 13. Análise de lipídeos totais por FT-IR. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



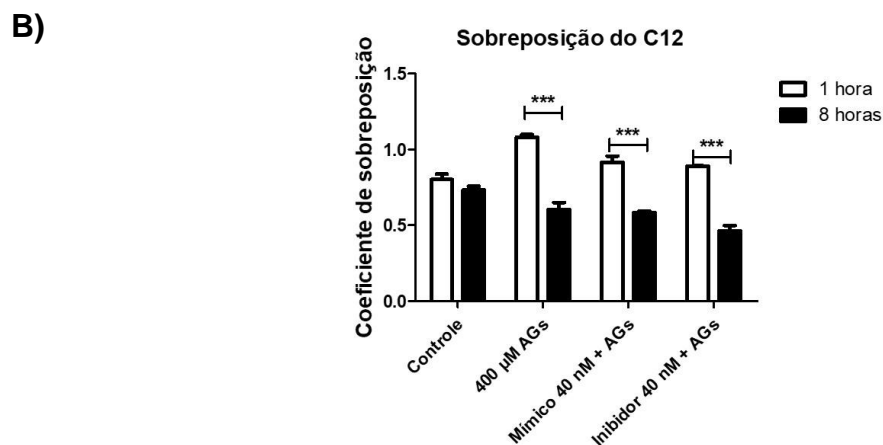
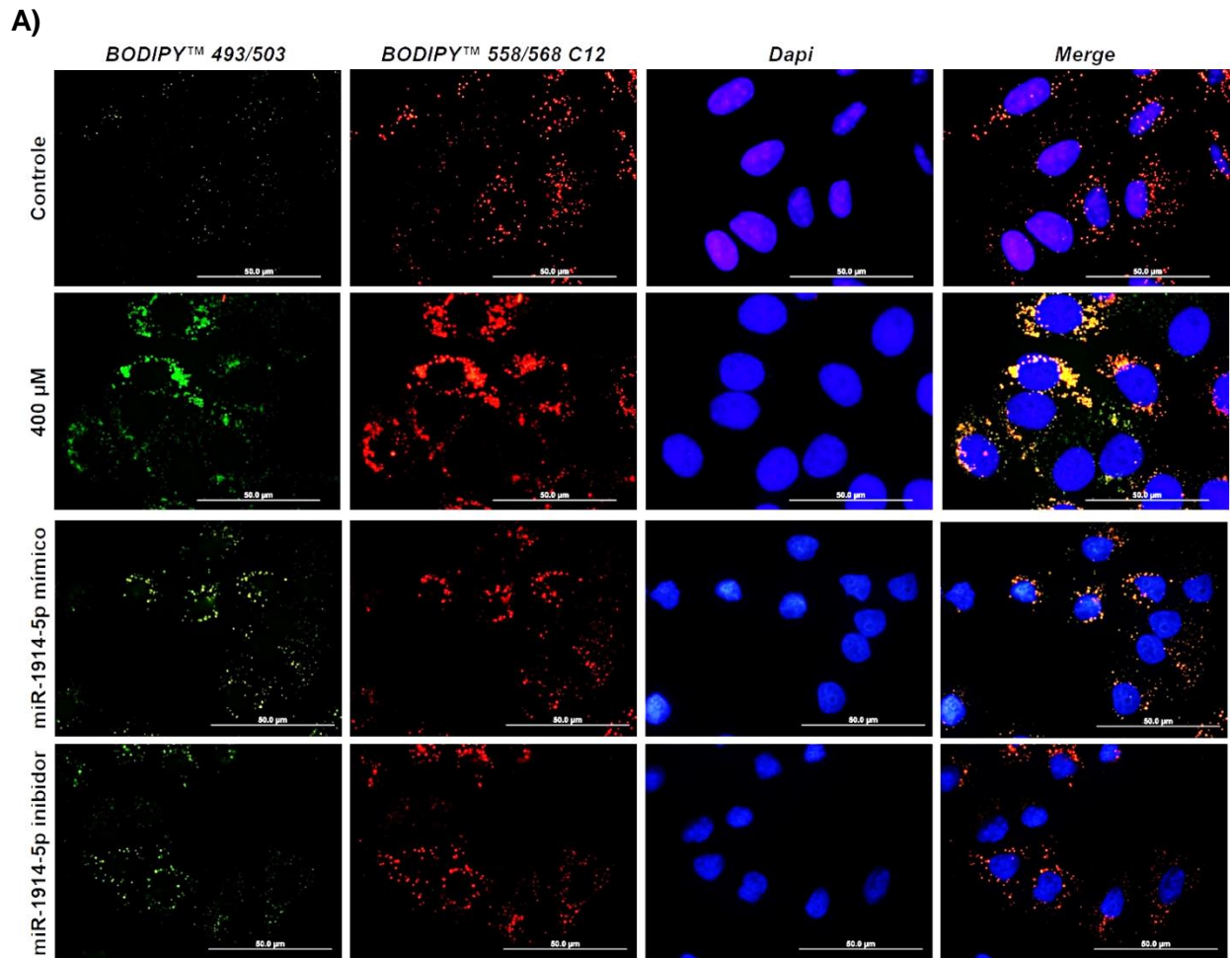
Observa-se que células incubadas apenas com AGs tiveram um aumento significativo de espécies lipídicas quando em comparação das células não cultivadas com AGs (grupo controle). Análises estatísticas mostraram que células incubadas com AGs e transfectadas com moléculas mímicas tiveram um aumento de * $P < 0,05$ e células transfectadas com o inibidor tiveram uma diminuição * $P < 0,05$, ambas em relação ao grupo controle.

Conjuntamente e em linha com os resultados obtidos anteriormente, a inibição do miR-1914-5p reduziu todos os lipídeos contidos na célula, apresentando níveis lipídicos inferiores às células controles. Ainda, análises estatísticas entre células incubadas com AGs e células contendo o inibidor do miR-1914-5p (*post-test* Tukey), mostraram uma considerável diminuição (** $P < 0,05$), inferindo que a inibição deste miRNA poderia melhorar o quadro pró-esteatótico por reduzir perfis de lipídeos que são alterados na condição de esteatose.

4.5 Marcação de AGs e análise da β -oxidação por fluorescência

Na figura 14 são apresentados os resultados de β -oxidação pelo método de fluorescência.

Figura 14. A) Microscopia de fluorescência. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p, incubadas com 400 μ M de AGs (2:1 ácidos oleico e palmítico), coradas com BODIPY™ 558/568 C12 (lipídeo vermelho), BODIPY™ 493/503 (lipídeo verde), e DAPI (núcleo em azul). **B)** Quantificação da sobreposição do C12 com gotículas de lipídeos verdes pelo Coeficiente de Sobreposição. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Tukey, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Na Figura 14 B é possível observar que a taxa de sobreposição do C12 em gotículas lipídicas neutras (em verde) diminuiu nas células transfectadas com o mímico e o inibidor do miR-1914-5p quando comparadas à condição controle, nos intervalos analisados (1h e 8h). Entretanto, ao realizar o *post-test* de Tukey para comparação entre as condições de mímico e inibidor no intervalo de 8 horas, a diminuição da sobreposição mostra-se estatisticamente acentuada no inibidor (**P<0,05).

Isso demonstra que a localização do C12 não foi totalmente sobreposta em relação às gotículas lipídicas armazenadas e indicadas pelo BODIPY™ 493/503 (lipídeo verde), sugerindo que o C12 foi oxidado, e não somente armazenado. Rambold e colaboradores (2015) mostraram que em células cultivadas em meio ricamente nutritivo, não há a necessidade de oxidação de AGs, justamente pela demanda energética estar sendo suprida pelo meio celular. Entretanto, em meio celular em que há redução de nutrientes, existe uma maior necessidade das células oxidarem AGs para obtenção de energia na forma de ATP (RAMBOLD; COHEN; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2015). Em linha com nossos resultados anteriores, onde a inibição do miR-1914-5p diminui a quantidade de lipídeos intracelulares, é normal que as células precisem oxidar AGs para obter energia, explicando assim o aumento da beta-oxidação quando o miR1914-5p é inibido. Uma outra hipótese, baseando-se nos resultados dos ensaios de GC/MS, é que parte da quantidade de C12 possa também estar sendo exportado para o meio extracelular. Entretanto, cabe uma investigação mais detalhada.

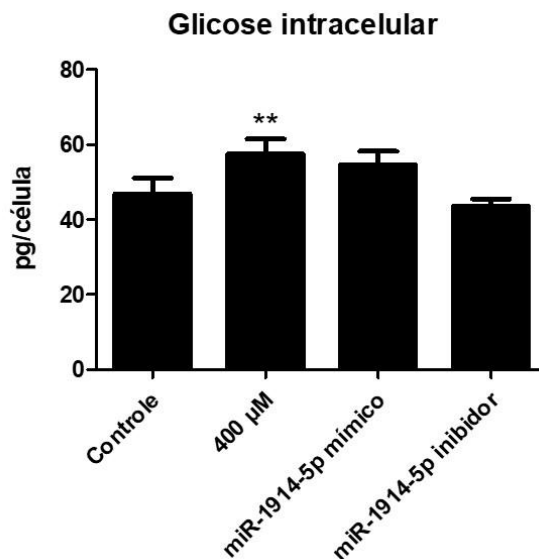
4.6 Mensuração de glicose intracelular

Além dos AGs, os carboidratos também são importantes macromoléculas utilizadas na produção de energia (KIM, 2016). A metabolização da glicose gera piruvato, que por sua vez será oxidado através do ciclo de Krebs na mitocôndria, gerando ATP (RUI, 2011). A partir das análises feitas anteriormente, foi possível constatar que a inibição do miR-1914-5p diminuiu significativamente o perfil de lipídeos celulares, o que tornou interessante mensurar os níveis de glicose intracelular.

De acordo com o observado na Figura 15, a transfecção com mímico ou inibidor do miR-1914-5p não alterou os níveis de glicose intracelular quando comparados à condição controle. Embora as análises realizadas com *post-test* de

Dunnett não tenham apontado diferenças entre as condições de transfecção e o controle experimental, análises com *post-test* de Tukey comparando-se as condições de transfecção mostraram que células contendo o inibidor do miR-1914-5p tiveram valores menores no acúmulo de glicose quando em comparação com células transfectadas com o mímico (** $P < 0.05$). Ainda, comparando-se células transfectadas e células incubadas apenas com AGs, a inibição do miR-1914-5p reduziu os níveis de glicose, de modo a apresentar uma significativa diferença (** $P < 0,05$) em relação à condição de 400 μ M, enquanto que em culturas transfectadas com o mímico, não houve diferença estatística.

Figura 15. Mensuração dos níveis de glicose intracelulares. Células HepG2 + LX-2 cocultivadas (7:3), transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácido oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Desta forma, pode-se supor que, se há uma drástica diminuição nos níveis de lipídeos celulares, é provável que a célula tente obter sua fonte de energia a partir de outro substrato, como a glicose. Logo, se há níveis menores de lipídeos quando o miR-1914-5p é inibido, provavelmente a célula estaria utilizando a glicose para fins energéticos, o que explicaria seus níveis intracelulares reduzidos nesta condição.

Por outro lado, a célula pode sintetizar glicose a partir de substratos não-carboidratos, como lactato, aminoácidos ou glicerol (RUI, 2011). TGs armazenados em gotículas lipídicas são hidrolisados, havendo liberação do esqueleto de glicerol

para produção de glicose, quando suas concentrações intracelulares são baixas. Uma vez que a inibição do miR-1914-5p diminuiu o conteúdo lipídico na célula, é provável que a síntese de glicose a partir do glicerol esteja prejudicada, o que também poderia explicar os baixos níveis de glicose nesta condição (STAEHR *et al.*, 2003).

5 CONCLUSÕES

Conjuntamente, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que, em relação às células da condição controle, as células cocultivadas de HepG2 e LX-2 transfectadas com o mímico do miR-1914-5p:

- Não apresentaram a viabilidade celular prejudicada pela transfecção;
- Apresentaram aumento nos níveis de TGs intracelulares;
- Apresentaram aumento nos níveis de lipídeos totais;
- Apresentaram aumento da β -oxidação.

O aumento nos níveis lipídicos em células transfectadas com o mímico do miR-1914-5p sugere que este miRNA tem efeito acentuado na produção e acúmulo de lipídeos, principalmente TGs, um lipídeo intimamente associado à esteatose hepática.

Por outro lado, em comparação às células da condição controle, células transfectadas com o inibidor do miR-1914-5p:

- Não apresentaram viabilidade celular prejudicada pela transfecção;
- Apresentaram diminuição nos AGs identificados no ensaio de GC/MS;
- Apresentaram considerável diminuição de lipídeos totais;
- Apresentaram aumento acentuado da β -oxidação;
- Apresentaram diminuição nos níveis de glicose em comparação às células incubadas apenas com AGs e células transfectadas com mímico do miR-1914-5p.

Apesar de não haver diminuição nos níveis de TGs ou colesterol, pode-se sugerir que a inibição do miR-1914-5p estaria diminuindo outros tipos de lipídeos que são alterados na esteatose.

CAPÍTULO II: LX-2

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

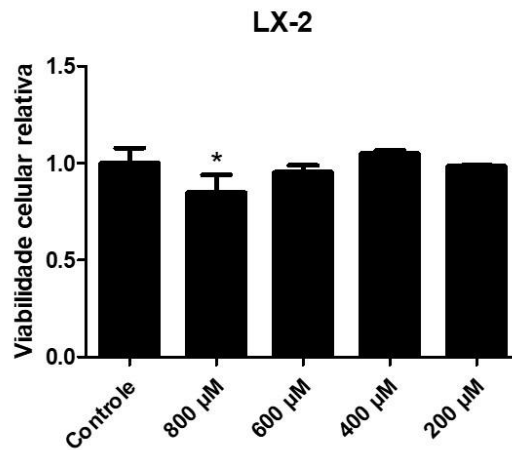
Após definição do estabelecimento do modelo celular, assim como das padronizações das condições de transfecção, realizamos ensaios variados com as culturas de células LX-2 cultivadas isoladamente. As análises anteriores do miR-1914-5p quando inserido em coculturas apontaram um potente efeito no que tange ao controle do ambiente de pró-esteatose hepática quando este miRNA é inibido. Assim, torna-se importante também avaliar os efeitos do miR-1914-5p nas linhagens cultivadas isoladamente. Aqui, analisamos o efeito desse miRNA nas células LX-2. Em estudo paralelo, os efeitos do mesmo também vêm sendo investigados nas células HepG2.

6.1 Ensaio de viabilidade celular em células LX-2

É importante considerar que, embora as células LX-2 possam se transdiferenciar do estado quiescente para o estado ativado sob diferentes concentrações de soro bovino fetal (2% e 10% respectivamente), as análises foram realizadas utilizando culturas de LX-2 cultivadas em meio contendo 10% de SBF, uma vez que as células cultivadas em meio contendo 2% não sobreviveram sob incubação com AGs.

Os resultados das células LX-2 incubadas com diferentes concentrações da mistura de AGs, no período de 24 horas, apontaram que células LX-2 conseguem sobreviver em meio de cultivo contendo altas concentrações de AGs. Uma pequena diminuição nos níveis de viabilidade celular foi observada na concentração de 800 μM quando comparada à condição controle (Figura 16). Um estudo realizado em 2016 mostrou que linhagens de células hepáticas estreladas se mostraram viáveis e proliferativas quando incubadas com altas concentrações da mistura de ácidos palmítico e oleico (na concentração de 1000 μM) no período reduzido de 6 horas (HETHERINGTON *et al.*, 2016), justificando nossas análises. Entretanto, por induzir o quadro pró-esteatótico sem reduzir a viabilidade celular, a concentração de 400 μM foi mantida para se prosseguir com os ensaios.

Figura 16. Ensaio de viabilidade celular (MTT) de células hepáticas estreladas, LX-2, incubadas com concentrações crescentes de AGs (200 μ M a 800 μ M - 2:1 ácidos oleico e palmítico) no período de 24 horas. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

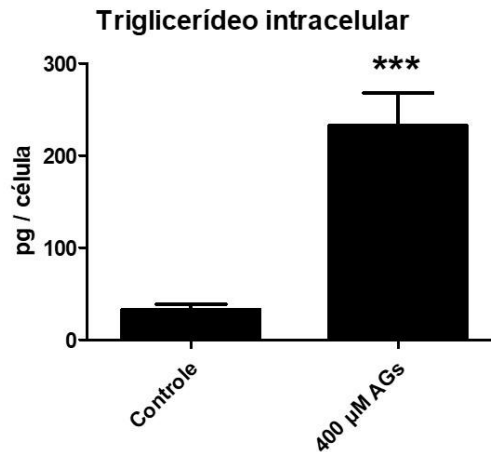


6.2 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares

6.2.1 Níveis intracelulares de triglicerídeos em células LX-2

Os resultados apresentados na Figura 17 apontam um grande acúmulo lipídico nas células LX-2 quando estas são incubadas com AGs no período de 24 horas, confirmando que as células responderam ao estímulo dos AGs. Em um recente estudo, Hong *et al.* (2018) mostraram que células LX-2 tratadas com ácido oleico apresentaram seu conteúdo de TGs aumentado em 1,3 vezes quando comparado com o controle, indicando que o ácido oleico pode induzir o acúmulo de TGs citoplasmáticos, o que estaria em linha com o observado em nosso ensaio.

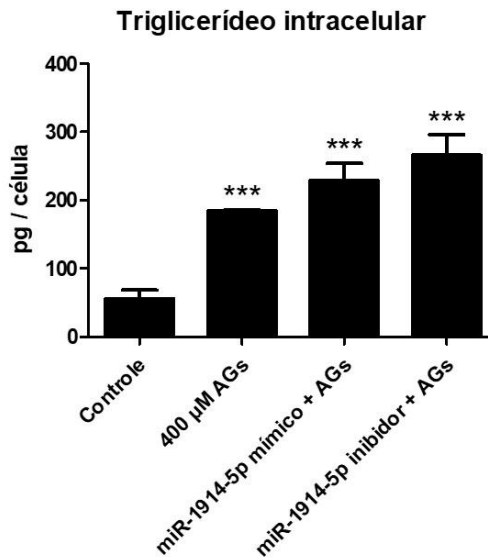
Figura 17. Mensuração dos níveis de triglicerídeos intracelulares. Células hepáticas estreladas, LX-2, em meio contendo 400 μM AGs – ácido oleico e palmítico (2:1) por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Em seguida, foram feitas as análises de TGs das células transfectadas com as moléculas mimetizadoras ou inibidoras do miR-1914-5p na concentração de 40 nM, para se avaliar o efeito do miRNA no acúmulo de lipídeos nesta linhagem celular.

A Figura 18 apresenta os resultados da produção de TGs para as diferentes condições de cultivo. As análises dos resultados para as células transfectadas com mímico ou inibidor mostraram um aumento nos níveis de TGs quando em comparação à condição controle. Entretanto, utilizando-se o *post-test* de Tukey para comparação entre células transfectadas e células incubadas com AGs, células contendo o mímico do miR-1914-5p não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas às células da condição de 400 μM , inferindo que o aumento endógeno deste miRNA não alterou os níveis intracelulares de TGs. Por outro lado, a transfecção com o inibidor do miR-1914-5p aumentou o conteúdo lipídico de TGs nas células LX-2, quando em comparação com as concentrações de TGs encontradas nas culturas incubadas apenas com os AGs. De Oliveira da Silva *et al.* (2018) relacionaram a atividade do miR-1914-5p no metabolismo lipídico na linhagem LX-2, direcionando os efeitos potenciais deste miRNA para a enzima MLYCD. Esta enzima tem um papel importante na síntese de AGs, uma vez que ela catalisa a reação de descarboxilação do malonil-CoA (que por sua vez, inibe a via da β -oxidação através da CPT1) e fornece substrato para a formação de AGs a partir de acetil-CoA (Currie *et al.*, 2013).

Figura 18. Mensuração dos níveis de triglicerídeos intracelulares. Células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mimico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácido oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

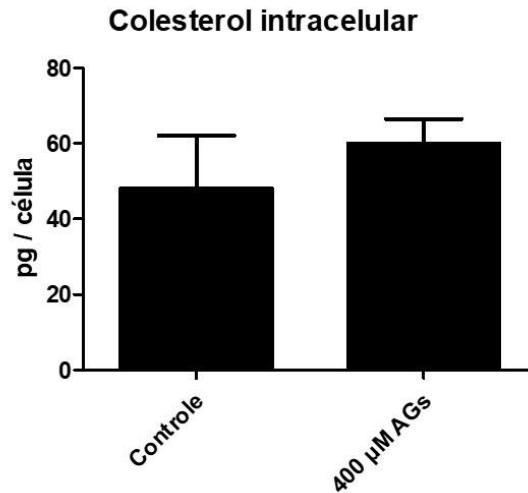


Até aqui, os resultados reforçam que o miR-1914-5p possa estar modulando o metabolismo lipídico quer seja pela interação com a enzima MLYCD, quer seja pelo seu efeito potencial com moléculas envolvidas em outras etapas do metabolismo lipídico. Essa observação é feita considerando-se que esse miRNA possui mais de 100 possíveis alvos de interação com mRNAs de moléculas centrais no metabolismo de lipídios, apontados por análises de bioinformática disponíveis em plataformas online, como TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_72/) e miRDB (<http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>).

6.2.2 Níveis intracelulares de colesterol em células LX-2

Os níveis de colesterol intracelular foram mensurados em células LX-2 e os resultados são apresentados na Figura 19. Após incubação das células em meio contendo AGs, no período de 24 horas, é possível observar que não houve alterações nos níveis de colesterol, mostrando-se estatisticamente iguais em relação às células da condição controle.

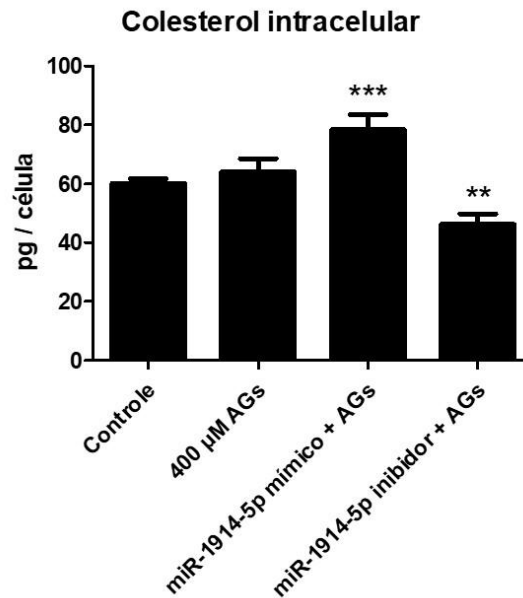
Figura 19. Mensuração dos níveis de colesterol intracelulares. Células hepáticas estreladas, LX-2, em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1) por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Entretanto, células transfectadas com 40 nM de moléculas mimetizadoras ou inibidoras do miR-1914-5p pareceram modular os níveis de colesterol em células pró-esteatóticas, como mostrado na Figura 20, sugerindo uma atuação funcional do miR-1914-5p no metabolismo de colesterol das células LX-2.

A análise dos resultados demonstra que o aumento do miR-1914-5p na célula induziu o acréscimo dos níveis de colesterol, enquanto que a inibição deste miRNA diminuiu consideravelmente os níveis de colesterol. Entretanto, análises da expressão de genes correlatos ao metabolismo de colesterol são necessárias para confirmar esta relação.

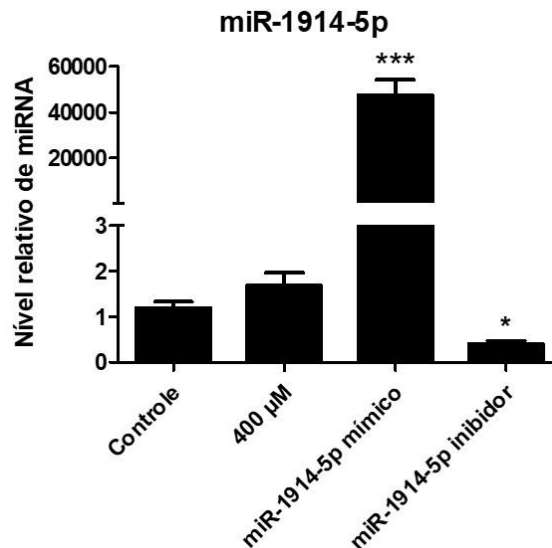
Figura 20. Mensuração dos níveis de colesterol intracelulares. Células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



6.3 Mensuração dos níveis de miRNA em células LX-2 transfectadas

Os níveis do miR-1914-5p foram mensurados para cada condição de cultivo das células LX-2 e a Figura 21 apresenta os resultados. É possível observar que os níveis do miRNA foram alterados frente às transfecções celulares de moléculas mimetizadoras ou inibidoras, onde células cultivadas com o mímico do miR-1914-5p apresentaram níveis elevados de miRNA, enquanto células transfectadas com o inibidor do miR-1914-5p apresentaram níveis inferiores de miRNAs, quando em comparação à condição controle. Assim, após a confirmação da eficiência do aumento ou inibição do miRNA utilizando-se moléculas sintéticas, ensaios posteriores foram realizados.

Figura 21. Níveis relativos da expressão do miR-1914-5p. Células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

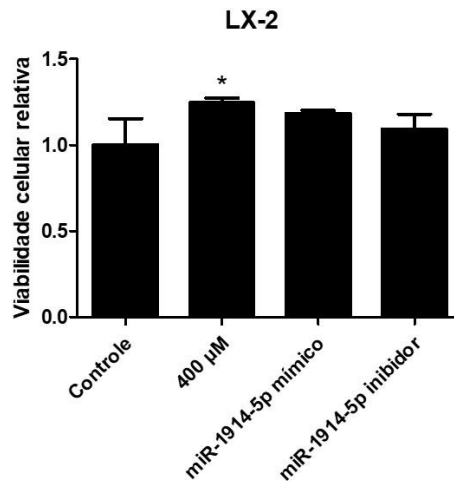


6.4 Ensaio de viabilidade celular em células LX-2 transfectadas com o miR-1914-5p

O ensaio de MTT foi realizado em células LX-2 incubadas com AGs e transfectadas com mímico ou inibidor do miR-1914-5p, com o objetivo de mensurar se a viabilidade celular seria prejudicada com a transfecção celular.

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram que células LX-2 não apresentaram viabilidade celular alterada com a transfecção, mostrando-se proliferativas e mantendo-se iguais as células cultivadas na condição controle.

Figura 22. Ensaio de viabilidade celular (MTT). Células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

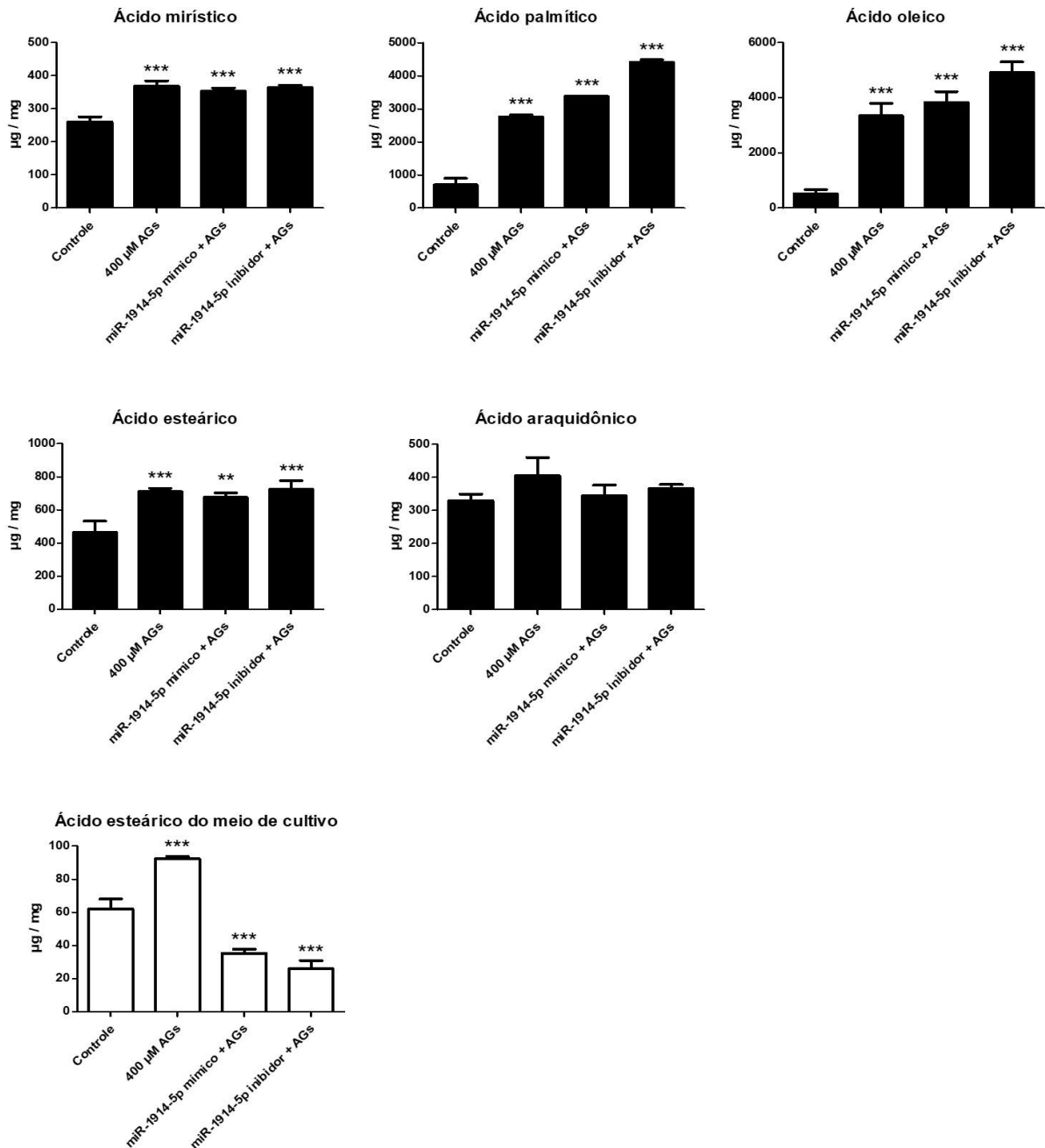


6.5 Análises de metabolismo de lipídeos

6.5.1 Quantificação e identificação de ácidos graxos através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS)

Em células LX-2 cultivadas isoladamente, os ácidos graxos identificados a partir do ensaio de GC/MS foram: mirístico, palmítico, oleico, esteárico e araquidônico. A Figura 23 mostra que os níveis de ácido mirístico aumentaram em todas as condições de cultivo aonde foi adicionada a mistura de AGs, incluindo as culturas transfectadas com mímico ou inibidor do miR-1914-5p. Entretanto, a análise com *post-test* de Tukey (não apresentada na Figura 23) demonstrou não haver diferenças estatísticas entre células incubadas com AGs e células transfectadas, sugerindo que o miRNA em estudo não afeta esse metabolismo.

Figura 23. Análise de GC-MS. Quantidade em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de AGs em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μM AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Em relação ao ácido palmítico, houve um aumento significativo nas células transfectadas com as moléculas mímicas ou inibidoras, em comparação às células da condição controle e as cultivadas apenas com AGs. Quanto aos níveis de ácido oleico, todas as condições de cultivo incubadas com AGs apresentaram aumento de seus níveis, quando em comparação com as culturas da condição controle. Entretanto,

apenas a condição celular transfectada com o inibidor do miR-1914-5p apresentou diferença estatística em relação às células incubadas com AGs.

Considerando-se o conjunto de resultados de GC/MS apresentados até aqui e o fato que para a indução do quadro pró-esteatótico, as células foram incubadas com altas concentrações de ácidos palmítico e oleico, os altos níveis destes AGs no interior das células podem ser explicados pela composição do meio de cultivo.

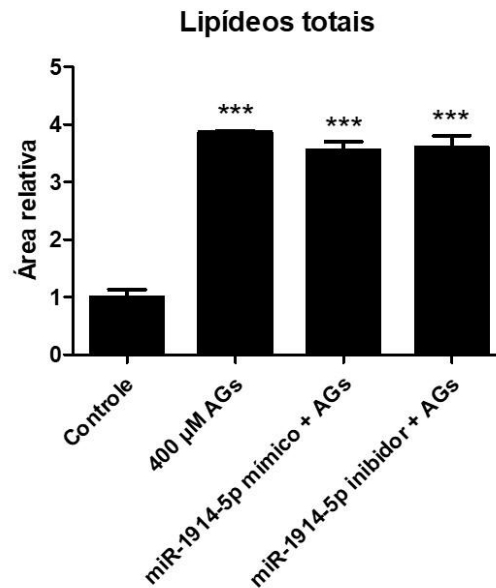
Apesar do ácido esteárico, AG precursor do ácido oleico, ter seus níveis elevados em todas as condições cultivadas com AGs, a comparação entre células incubadas apenas com AGs e células transfectadas com mimico ou inibidor do miR-1914-5p, mostrou não haver diferença estatística. Entretanto, ao observar o gráfico referente à análise do meio de cultivo, os níveis de ácido esteárico se mostraram estatisticamente mais baixos em células transfectadas em comparação às outras condições, sugerindo que essas células estariam utilizando ácido esteárico em outras vias, sem exportar este AG para o meio.

O ácido araquidônico não apresentou diferenças estatísticas, mantendo-se com níveis semelhantes em células controle e células incubadas com AGs.

6.5.2 Quantificação de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A mensuração de lipídeos totais foi realizada em células LX-2 e a Figura 24 apresenta os resultados. A partir dos resultados obtidos, é possível notar que em todas as condições de cultivo incubadas com AGs ocorreu um aumento na quantidade de lipídeos totais, quando comparadas à condição controle. Entretanto, ao se realizarem comparações estatísticas entre as condições de cultivo (*post-test* Tukey), não se observam diferenças estatísticas, inferindo que a miR-1914-5p não atua na modulação dos níveis de lipídeos totais nas células LX-2 cultivadas isoladamente.

Figura 24. Análise de lipídeos totais por FT-IR. Células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



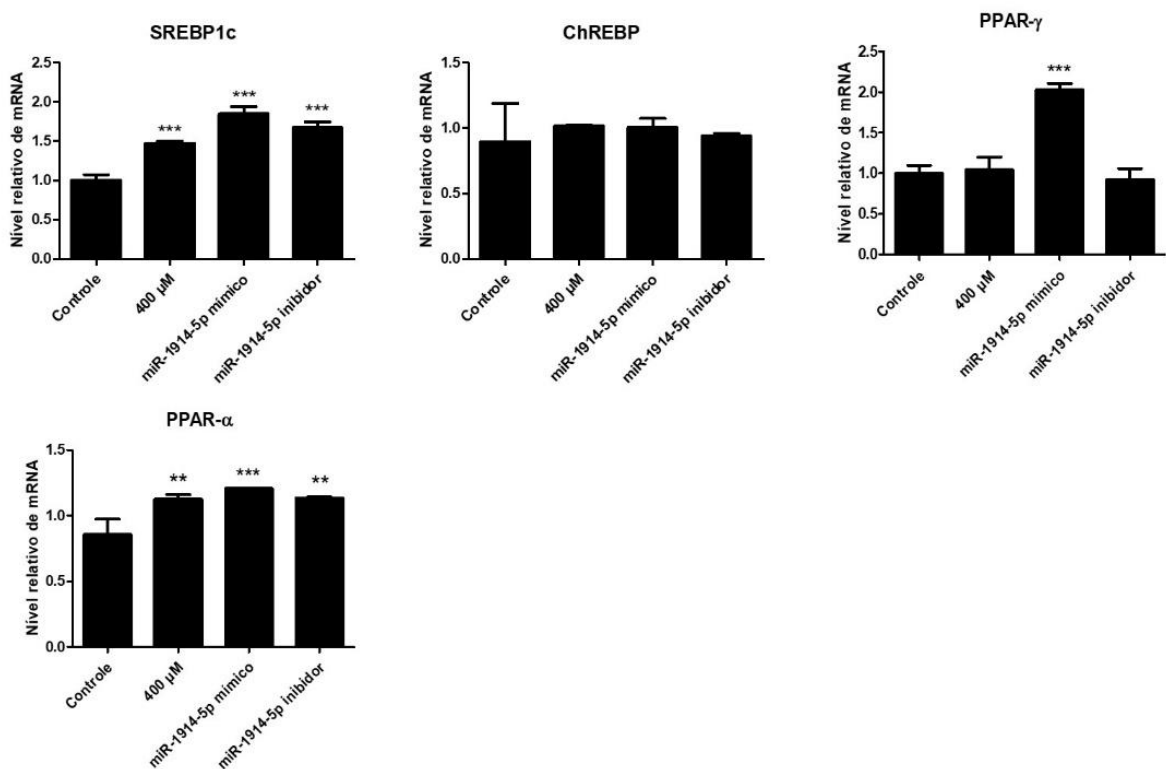
6.6 Análises da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos

6.6.1 Fatores de transcrição na regulação de genes hepáticos

O fígado possui diversos fatores de transcrição que regulam estritamente as vias de síntese, armazenamento e oxidação de AGs. O fator de transcrição SREBP1c desempenha um importante papel na homeostase lipídica, sendo em condições normais ativado pela insulina, e aumentando a expressão de genes lipogênicos, como *ACC*, *MLYCD* e *FASN* (MOSLEHI; HAMIDI-ZAD, 2018). Na Figura 25 é possível observar que houve um aumento nos níveis de expressão deste fator de transcrição em células cultivadas em meio contendo AGs, células transfectadas com moléculas mimetizadoras e inibidoras do miR-1914-5p, quando em relação aos níveis de expressão encontrados nas culturas controle. Entretanto, quando comparados entre si, os resultados obtidos nas condições de células transfectadas com o mímico e o inibidor, não se observam diferenças estatísticas, sugerindo que o aumento dos níveis de *SREBP1c* são ocasionados pela incubação das células com AGs. Estudos mostraram o aumento da expressão de *SREBP1c* em células cultivadas em meio contendo AGs (WANG *et al.*, 2013; QIN; YIN; HUANG, 2016), indicando que o aumento da expressão poderia estar relacionado à incubação com AGs. Além do mais, *SREBP1c* foi mostrado ter regulação positiva em modelos animais de fígado

gorduroso (HIGUCHI, *et al.*, 2008) e em pacientes obesos com DHGNA (PETTINELLI, *et al.*, 2009), uma vez que resulta no aumento da LDN por ativar genes-chaves da síntese de AGs.

Figura 25. Níveis de expressão relativa de mRNAs de *SREBP1c*, *ChREBP*, *PPAR-γ* e *PPAR-α* em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μM AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



A proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (*ChREBP*) atua como mediadora central no metabolismo de carboidratos e mostrou ser determinante na indução de genes lipogênicos em sinergia com *SREBP1c* (DENTIN; GIRARD; POSTIC, 2005). Ainda, o silenciamento de *ChREBP* em células hepáticas reduziu significativamente a síntese lipídica, além de não haver a indução de genes envolvidos nos metabolismos lipídico e de carboidrato, mostrando ser um potencial alvo para o tratamento da esteatose hepática (DENECHAUD *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que independente das condições de cultivo, as células não apresentaram diferenças na expressão de mRNA do fator de transcrição *ChREBP*. Jois e

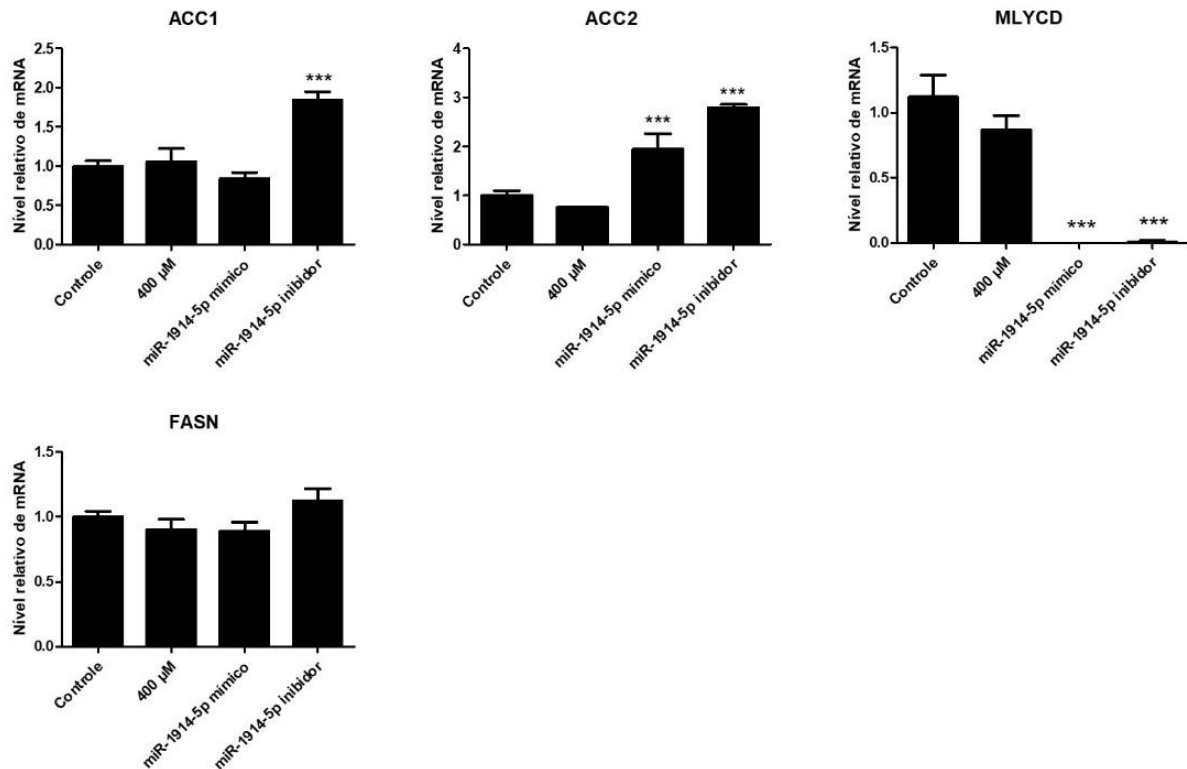
colaboradores (2016) mostraram uma diminuição na expressão de *ChREBP* em dietas ricas em gordura em ratos, o que estaria em linha com nossos resultados.

Os fatores de transcrição PPARs pertencem a família de receptores nucleares e seus membros diferem em suas atividades. O PPAR- γ , com níveis maiores de expressão no tecido adiposo, possui vias de sinalização mais intimamente envolvidas na captação e armazenamento de lipídeos (WALCZAK; TONTONNOZ, 2002). A sua expressão é altamente induzida em pacientes com DHGNA (PETTINELLI; VIDELA, 2011) e sua deleção em hepatócitos de camundongos mostrou ter função protetora contra o desenvolvimento da esteatose hepática (MORÁN-SALVADOR *et al.*, 2011). Já o PPAR- α é altamente expresso em hepatócitos e desempenha um importante papel na captação e oxidação de AGs, ativando genes importantes nesta via (TYAGI *et al.*, 2011). Em pacientes portadores de DHGNA, a expressão de PPAR- α é menor, resultando em taxas menores de oxidação de AGs (FRANCQUE, *et al.*, 2015). De acordo com os resultados, o nível de expressão de *PPAR- γ* foi aumentado em células transfectadas com o mímico do miR-1914-5p, enquanto que os níveis nas outras condições não foram alterados, em relação a condição controle. Por outro lado, os níveis de *PPAR- α* foram aumentados em células incubadas com AGs e também transfectadas com mímico ou inibidor, quando comparadas à condição controle. Quando analisamos essas três condições (400 μ M, mímico e inibidor), não há diferença estatística entre elas, sugerindo que o aumento da expressão deste gene estaria sendo induzida pela incubação das células com AGs. Um estudo realizado em 2006 mostrou que a expressão de *PPAR- α* foi aumentada quando camundongos do tipo selvagem foram alimentados com uma dieta rica em gordura, supondo que este aumento poderia indicar uma resposta protetora da célula para manter a homeostase lipídica (PATSOURIS *et al.*, 2006).

6.6.2 Genes correlatos à síntese *de novo* de AGs

A lipogênese *de novo* (LDN) é a via responsável por produzir lipídeos necessários para homeostase celular a partir de carboidratos (WU; NÄÄR, 2019). Donnelly e colaboradores (2005) estimaram uma contribuição de 30% da LDN para o desenvolvimento da esteatose hepática, tornando-se necessário analisar os genes desta via no modelo pró-esteatótico de células LX-2. Os resultados são apresentados na Figura 26.

Figura 26. Níveis de expressão relativa de mRNAs de *ACC1*, *ACC2*, *MLYCD* e *FASN* em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácido oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



A acetil-CoA carboxilase (ACC) é considerada a primeira enzima comprometida na via da LDN. Duas isoformas, ACC1 e ACC2, são encontradas em mamíferos e medeiam papéis fisiológicos distintos na célula. A ACC1 está localizada no citosol e é responsável pela conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, que vai servir como doador de carbonos para a síntese de AGs e, conseqüentemente, atua na regulação da via de biossíntese (LEE *et al.*, 2014). Por outro lado, a ACC2 é encontrada ancorada na superfície mitocondrial, sintetizando malonil-CoA que inibe alostericamente a via da oxidação de AGs (WAKIL; ABU-ELHEIGA, 2009). Estudos sugerem que a inibição de ACC1 e ACC2 poderia ser um tratamento efetivo da DHGNA, uma vez que reduziria a síntese de lipídeos via LDN e aumentaria a oxidação de AGs simultaneamente (BORBEAU; BARTBERGER, 2015).

Em relação aos níveis de *ACC1*, células transfectadas com o inibidor do miR-1914-5p tiveram um aumento significativo, enquanto que na condição de células incubadas com o miR-1914-5p mímico ou de células incubadas apenas com AGs, os

níveis foram os mesmos daquele encontrado na condição controle. Sabe-se que mRNAs de *ACC1* são alvos putativos do miR-1914-5p de acordo com os dados analisados em bancos de dados, o que está em linha com o resultado obtido. No caso da *ACC2*, as células transfectadas com mímico ou inibidor do miR-1914-5p tiveram um aumento significativo na expressão deste gene, quando comparados à condição controle, conforme mostrado na Figura 26. Análises estatísticas foram feitas entre as condições de mímico e inibidor, e apontaram uma diferença significativa de $**p < 0,005$ entre elas, evidenciando um aumento na expressão gênica das células transfectadas com o inibidor. O aumento da expressão de *ACC2* poderia indicar uma maior disposição de malonil-CoA intracelular, e conseqüente diminuição da oxidação lipídica. Ensaio de β -oxidação e análises da expressão gênica de genes relacionados a via oxidativa foram realizados e serão apresentados nesse trabalho e corroboram com a presente discussão.

A malonil-CoA descarboxilase (*MLYCD* ou *MCD*) tem a função de descarboxilar o malonil-CoA em acetil-CoA, numa reação de reversão àquela catalisada pela *ACC* (*CURRIE et al.*, 2013), como mencionado anteriormente. De Oliveira da Silva *et al.* (2018) demonstraram a *MLYCD* como alvo do miR-1914-5p em células estreladas hepáticas. De acordo com os resultados obtidos na Figura 26, a transfecção com mímico ou inibidor do miR-1914-5p diminuiu consideravelmente os níveis de *MLYCD*. Por outro lado, os resultados apresentados na Figura 18 contradizem os encontrados na Figura 26. Esses resultados poderiam ser explicados baseando-se na meia vida das proteínas *MLYCD*, e embora o gene não esteja sendo transcrito, a mesma possa ainda estar funcionalmente ativa no momento investigado. Outro ponto a ser observado é que o presente modelo de investigação celular analisa os efeitos do miR-1914-5p em quadro pró-esteatótico e difere do modelo celular utilizado por DE OLIVEIRA DA SILVA e colaboradores, o que poderia explicar tal contradição observada em nossos resultados.

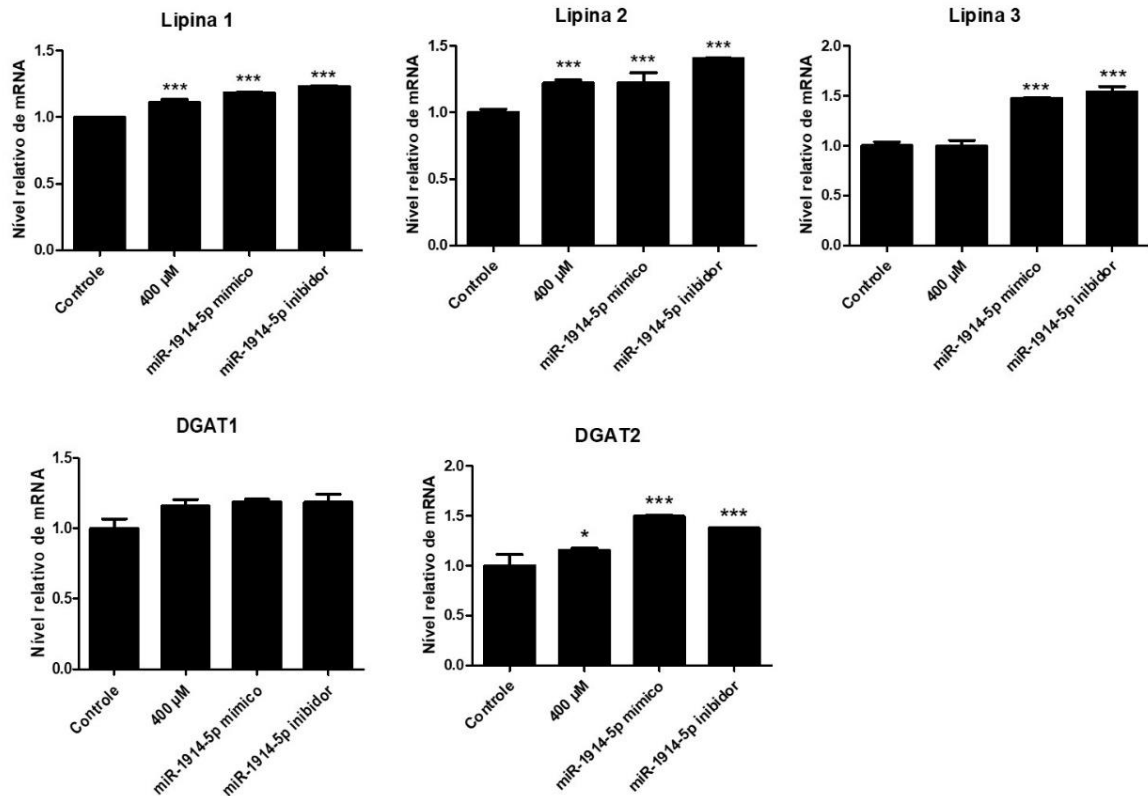
A *FASN* possibilita a produção de AGs a partir da cadeia carbônica do malonil-CoA, adicionando moléculas de acetil-CoA para a formação do ácido palmítico (*FERRAMOSCA; ZARA*, 2014). Os níveis da expressão de mRNA de *FASN* não foram alterados e permaneceu semelhante em todas as condições analisadas. Isto poderia ser explicado pela disposição de AGs na cultura celular, o que tornaria desnecessária o aumento da produção de AGs, uma vez que as células também adquirem AGs do meio (*THOMPSON; LOBO; BERNLOHR*, 2010).

6.6.3 Genes correlatos ao armazenamento de AGs

Após o processo de síntese, alongamento e dessaturação, os AGs podem ser esterificados no esqueleto de glicerol-3-fosfato para formarem lipídeos mais complexos, como os TGs (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

As lipinas são enzimas que convertem o ácido fosfatídico (através das reações enzimáticas da GPAT e AGPAT, respectivamente) em 1,2-diacilglicerol. Em mamíferos, três genes independentes codificam isoformas de lipinas: lipina 1, lipina 2 e lipina 3 (PÉTERFY *et al.*, 2001). Apesar de serem expressas em diferentes níveis dependendo do tecido em que se encontram, evidências sugerem que as três isoformas desempenham funções semelhantes (CSAKI; REUE, 2010). Os resultados apresentados na Figura 27 sugerem que os níveis de expressão da *lipina 1* aumentaram significativamente nas condições de mímico e inibidor, quando comparados às condições controle e de células incubadas apenas com AGs. Os níveis transcricionais da *lipina 2* aumentaram em todas as células incubadas com AGs. Contudo, nas células transfectadas com o inibidor do miR-1914-5p houve um significativo aumento estatístico quando estas são comparadas às demais condições. No caso da *lipina 3*, células transfectadas com mímico ou inibidor tiveram um aumento significativo nos níveis de expressão deste gene. Entretanto, análises comparativas entre essas duas condições não apresentaram diferenças estatísticas, sugerindo que o aumento da *lipina 3* não foi ocasionado pela presença ou inibição do miR-1914-5p.

Figura 27. Níveis de expressão relativa de mRNAs de *Lipina 1*, *Lipina 2*, *Lipina 3*, *DGAT1* e *DGAT2* em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



O passo final na síntese de TG é catalisado pela diacilglicerol aciltransferase (DGATs), que converte moléculas de diacilgliceróis (DGs) em TGs, podendo ser armazenados em gotículas lipídicas ou exportados na forma de VLDL (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). Células de mamíferos possuem duas enzimas DGATs: DGAT1 e DGAT2 (WELTE, 2015) e ambas são amplamente expressas no fígado (CASES *et al.*, 1998).

Ainda na Figura 27, os resultados mostram que os níveis de *DGAT1* não se alteraram em nenhuma das condições de cultivo incubadas com AGs, quando da comparação com a condição de cultivo controle, sugerindo que esse gene não atua no modelo celular utilizado. Por outro lado, os níveis de *DGAT2* foram aumentados consideravelmente em células transfectadas com mímico e inibidor, quando comparadas com as condições controle e de células incubadas com AGs. Entretanto, a comparação entre as condições de mímico e inibidor não apontaram diferença

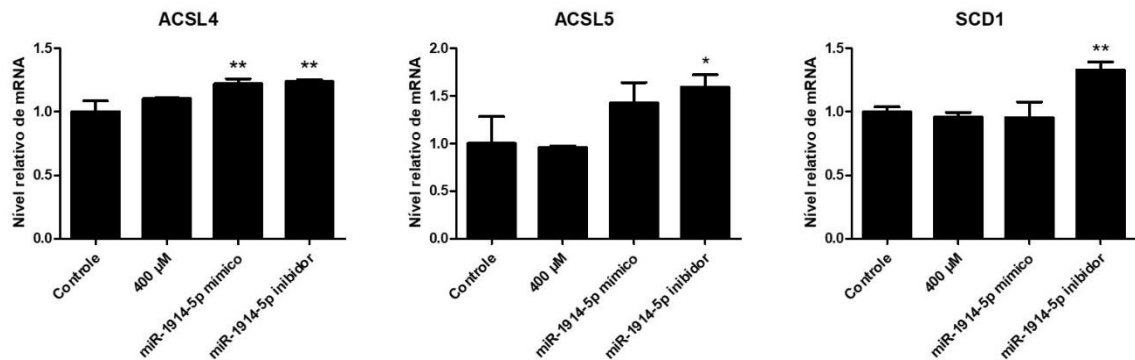
estatística, o que sugere que o aumento de *DGAT2* não é efeito da atuação direta do miR-1914-5p, mas sim de um feito sistêmico do mesmo em vias metabólicas paralelas.

Conjuntamente, esses resultados inferem que células transfectadas com mímico ou inibidor estão produzindo diacilgliceróis, que por sua vez, estão sendo convertidos em TGs. Sabe-se que a enzima DGAT desempenha um importante papel no desenvolvimento da esteatose hepática e o silenciamento de suas atividades mostraram melhorar a esteatose em camundongos (YU *et al.*, 2005). Entretanto, as enzimas não apresentaram expressões significativas em nossas análises.

6.6.4 Genes correlatos à ativação e dessaturação de AGs

A família de acil-CoA sintetases de cadeia longa (ACSL) são importantes na via de armazenamento e oxidação de lipídeos, pois essas enzimas têm a capacidade de ativar os ácidos graxos recém-sintetizados, adicionando uma molécula de acil-CoA em suas cadeias e ativando-os para serem processados na formação de TGs ou para entrarem na via da β -oxidação (SINGH *et al.*, 2019). Em mamíferos, a família ACSL inclui 5 isoformas e estas se diferenciam em relação à distribuição de tecidos, localização celular, cinética enzimática e especificidade de substrato (MASHEK; LI; COLEMAN, 2006). Em nosso estudo, os genes *ACSL4* e *ACSL5* foram analisados e os resultados são mostrados na Figura 28. A *ACSL4* é encontrada no retículo endoplasmático e peroxissomos, enquanto a *ACSL5* localiza-se na membrana mitocondrial interna (HARDWICK *et al.*, 2013)

Figura 28. Níveis de expressão relativa de mRNAs de *ACSL4*, *ACSL5* e *SCD1* em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



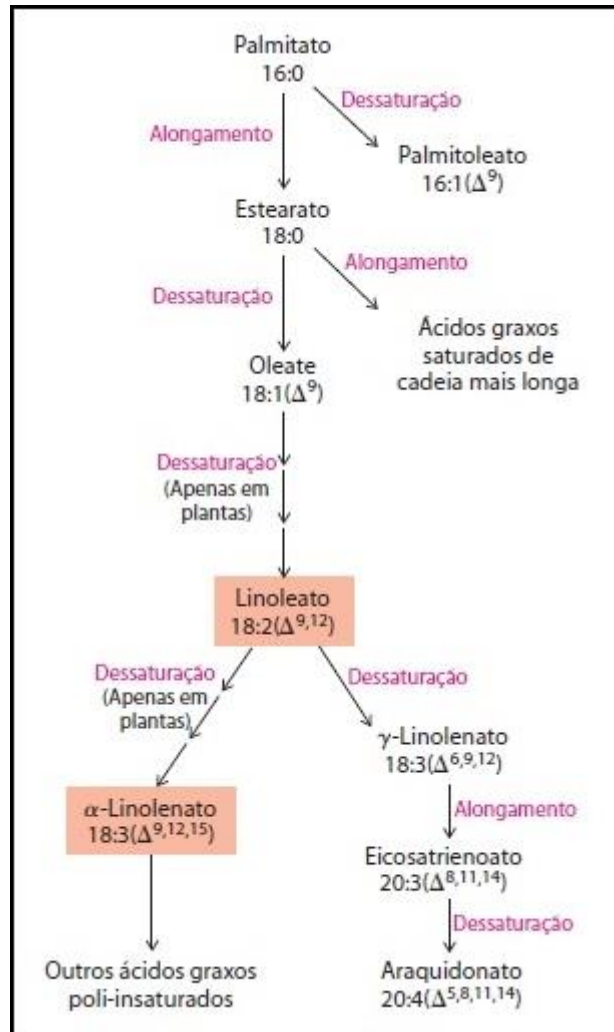
Células incubadas com AGs e transfectadas com mímico ou inibidor apresentaram níveis aumentados de *ACSL4*, quando comparadas à condição controle. Entretanto, análises comparativas entre as condições de células incubadas com AGs e células transfectadas com mímico e inibidor do miR-1914-5p, não apresentaram diferenças estatísticas. Quanto aos níveis de *ACSL5*, apenas a condição onde o miR-1914-5p foi inibido apresentou um aumento significativo quando comparado à condição controle e de células incubadas com AGs. Segundo Bu e Mashek (2010), a *ACSL5* canaliza AGs para vias de síntese de lipídeos, de modo a envolver a síntese *de novo* de AGs e regular reações subsequentes para produção de TGs e fosfolipídeos.

O palmitato, ácido graxo primário de 16 carbonos produzido na síntese *de novo*, pode sofrer modificações em sua estrutura, sendo alongado a estearato (C18:0) ou em AGs de cadeias carbônicas maiores, através da ação enzimática da ELOVL6. A estearoil-CoA dessaturase (*SCD1*) é uma enzima que converte AGs saturados em AGs monoinsaturados. Assim, o palmitato ou estearato podem ter insaturações adicionadas em suas estruturas, formando respectivamente o palmitolato (16:1) e oleato (18:1), pela ação da *SCD1* (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). A Figura 29 sintetiza este processo.

De acordo com a Figura 28, a expressão dos níveis de mRNA de *SCD1* foi aumentada apenas quando o miR-1914-5p foi inibido. Sabe-se que o miR-1914-5p possui sítios de interação com a *SCD1*, o que está em linha com o resultado obtido. Níveis aumentados de *SCD1* foram encontrados em camundongos obesos com

esteatose hepática (COHEN *et al.*, 2002), e no fígado humano o aumento da atividade desta enzima mostrou aumentar o conteúdo lipídico no fígado (KOTRONEN *et al.*, 2009).

Figura 29. Via de alongamento e dessaturação do ácido palmítico.



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

6.6.5 Genes a via de β -oxidação de AGs

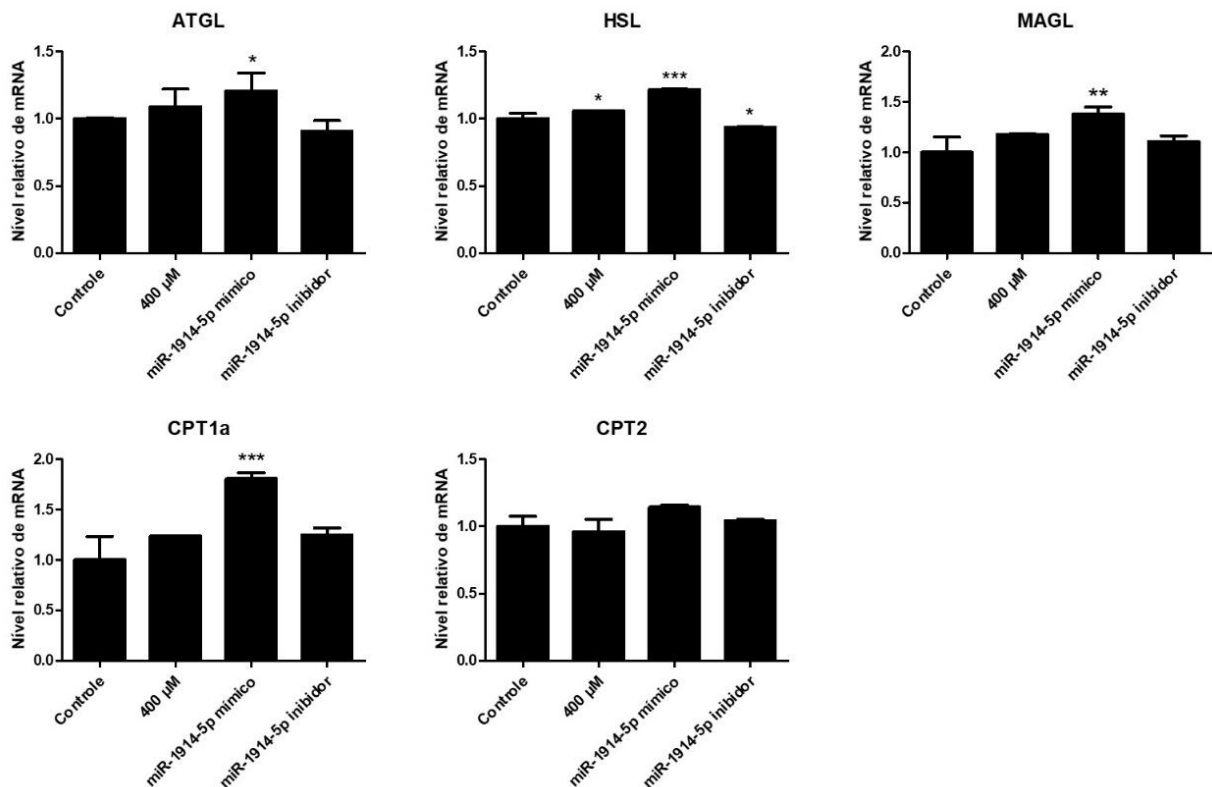
O acúmulo de TGs no quadro esteatótico é resultado de um desequilíbrio entre as taxas de aquisição e oxidação lipídica (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). A β -oxidação lipídica ocorre nas mitocôndrias ou peroxissomos para fornecer energia através da produção de ATP.

As células podem hidrolisar TGs armazenados em gotículas lipídicas em três AGs, a partir da ação em sequência das enzimas lipase de triglicerídeos de tecido

adiposo (ATGL), que catalisa a primeira hidrólise, seguida da lipase hormônio-sensível (HSL) e a lipase monoacilglicerol (MAGL) (CURRIE *et al.*, 2013). Por fim, a carnitina palmitoiltransferase (CPT1), situada na membrana externa da mitocôndria, é responsável pelo transporte de AGs de cadeia longa para o interior das mitocôndrias, e posteriormente, a CPT2, localizada na membrana interna da mitocôndria, dará início às reações de β -oxidação (NASSIR; IBDAH, 2014). Existem três isoformas de CPT1, sendo estas específicas para o tecido (BROWN *et al.*, 2018). A CPT1a foi a isoforma analisada em nosso estudo.

É possível observar na Figura 30 que células transfectadas com moléculas mimetizadoras tiveram um aumento nos níveis de expressão de *ATGL*, *HSL* e *MAGL* quando comparadas às outras condições. Células transfectadas com o inibidor mostraram níveis de *ATGL* e *MAGL* semelhantes àqueles encontrados na condição controle, enquanto que os níveis de *HSL* diminuíram, o que poderia indicar um menor nível de hidrólise dos TGs. Atrelado a isto, os níveis de *CPT1a* aumentaram significativamente na condição das culturas transfectadas com o mímico, o que não ocorreu nas culturas transfectadas com o inibidor, uma vez que os níveis de mRNA estão iguais aos encontrados na condição controle. Os níveis de *CPT2* não foram alterados em nenhuma condição. A partir disto, sugere-se que o aumento dos níveis de *CPT1a* poderiam ocorrer em resposta aos altos níveis de TGs sintetizados, representando um efeito compensatório da célula em tentar obter uma homeostase lipídica intracelular.

Figura 30. Níveis de expressão relativa de mRNAs de *ATGL*, *HSL*, *MAGL*, *CPT1a* e *CPT2* em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mimico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácidos oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



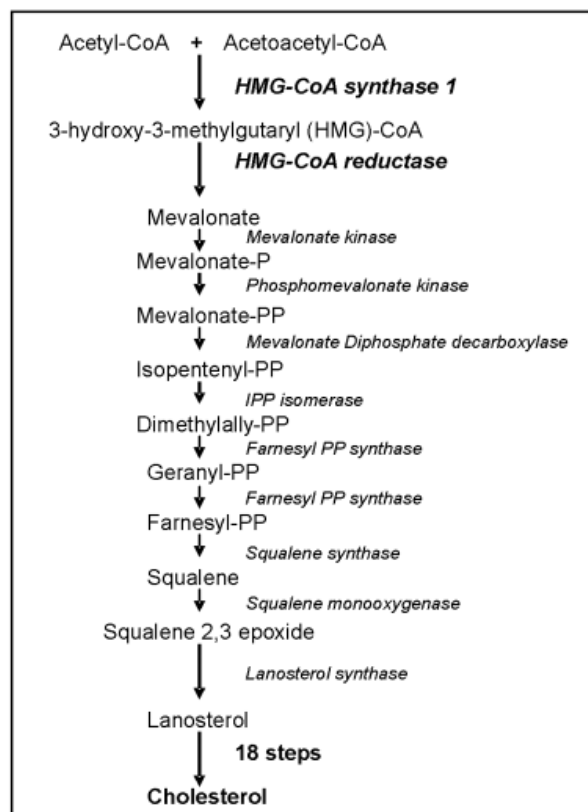
Os resultados obtidos até aqui inferem que a inibição do miR-1914-5p aumenta consideravelmente os níveis de TGs intracelulares, indicando que está havendo certo acúmulo lipídico. Por outro lado, células transfectadas com moléculas mimetizadoras exibem acúmulo de TGs, entretanto, apresentando níveis semelhantes àqueles encontrados na condição das células apenas incubadas com AGs. Apesar disto, infere-se que a célula aumentou os níveis da expressão de genes relacionados a via de oxidação lipídica, de modo a tentar obter a homeostase em resposta ao acúmulo lipídico (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018).

6.6.6 Genes correlatos ao metabolismo de colesterol

Os fatores de transcrição da família de proteínas de ligação a elementos reguladores de estero (SREBPs) regulam a síntese e captação de AGs e colesterol. Enquanto SREBP1c tem participação ativa na síntese de AGs, sabe-se que a ativação

dos genes relacionados na via de síntese de colesterol, como HMG-CoA redutase (*HMGCR*) e HMG-CoA sintase (*HMGCS*), se dá através do SREBP2 (MADISON, 2016). As enzimas HMGCS e HMGCR catalisam reações limitantes na síntese de colesterol, onde a HMGCS catalisa a condensação irreversível de acetil-CoA (derivado de reações de oxidação e transportado para o citoplasma) em HMG-CoA, que por sua vez será convertido em mevalonato pela HMGCR (CERQUEIRA *et al.*, 2016). Em seguida, diversas outras reações enzimáticas sequenciais ocorrem gerando o produto colesterol, como esquematizado na Figura 31 (VOCK; DÖRING; NITZ, 2008). O colesterol pode desempenhar vários papéis nas células de mamíferos, sendo componente das bicamadas lipídicas ou agir como precursor de hormônios esteroides (CERQUEIRA *et al.*, 2016).

Figura 31. Via da síntese de colesterol.

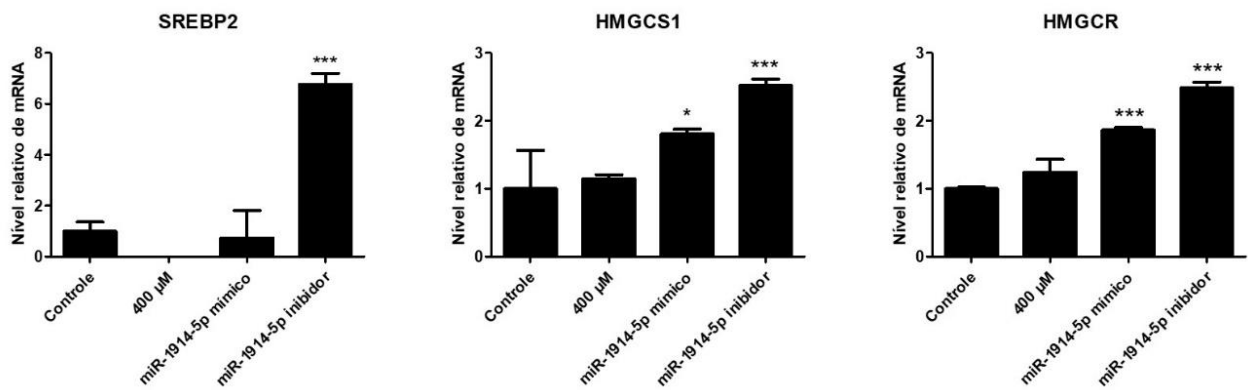


Fonte: VOCK; DÖRING; NITZ, 2008

A partir dos resultados obtidos na análise de colesterol intracelular, foi possível observar uma significativa redução dos níveis de colesterol quando as células foram transfectadas com o inibidor do miR-1914-5p. Desta forma, foi feita a análise da expressão dos principais genes relacionados à via de síntese de colesterol.

Conforme apresentado na Figura 32, é possível observar que os níveis transcricionais da *SREBP2* não foram alterados nas células da condição controle, células incubadas com AGs e células transfectadas com o mímico do miR-1914-5p. De acordo com Vallim e Salter (2010), que avaliaram o efeito de uma dieta hiperlipídica em *hamsters*, os níveis de expressão de *SREBP2* diminuem na presença de altas concentrações de gordura, corroborando com o observado em nossas análises. Em contrapartida, células transfectadas com o inibidor do miR-1914-5p apresentaram um aumento significativo nos níveis de expressão de *SREBP2*, em comparação com as demais condições. Como já mostrado em bancos de dados, este fator de transcrição possui sítios putativos de interação com o miR-1914-5p, o que explicaria seu aumento em células contendo o inibidor.

Figura 32. Níveis de expressão relativa de mRNAs de *SREBP2*, *HMGCS1*, *HMGCR* em células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p e posteriormente incubadas em meio contendo 400 μ M AGs – ácido oleico e palmítico (2:1), por 24 h. A condição controle contém células cultivadas em 10% SBF. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.



Uma vez que há aumento dos níveis de *SREBP2*, ocorre aumento da expressão de genes relacionados diretamente com este fator de transcrição. Nota-se que em células onde o miR-1914-5p foi inibido, os níveis de expressão de *HMGCS1* e *HMGCR* aumentaram significativamente quando comparados às outras condições. Dados obtidos a partir de banco de dados sugerem que o gene *HMGCS1* possui sítios de interação com o miRNA em estudo, o que também estaria de acordo com o observado em nossas análises. Conseqüentemente, se há maior produção de substrato catalisado pela *HMGCS1*, os níveis de *HMGCR* aumentam na tentativa de manter os níveis de colesterol em homeostasia celular, como forma de resposta

compensatória. Baseando-se também em informações de bioinformática, algumas enzimas (não analisadas neste trabalho) envolvidas na síntese de colesterol também possuem sítios putativos de interação com o miR-1914-5p, tais como a fosfomevalonato quinase (*PMVK*), lanosterol sintase (*LSS*), citocromo P450 família 51 (*CYP51A1*) e 24-dehidrocolesterol redutase.

Estudos mais detalhados irão esclarecer como o inibidor miR-1914-5p atua nessa via. Por outro lado, análises preliminares de estudos proteômicos, obtidas em nosso grupo de pesquisa, apontou que, apesar do aumento da expressão do mRNA de *HMGCS1*, não houve síntese proteica da molécula, insinuando que o miR-1914-5p estaria atuando como RNA de interferência na modificação pós-transcricional. O miRNA pode atuar de acordo com a sua complementaridade com o mRNA-alvo. Neste cenário, poderíamos deduzir que a imperfeita complementaridade do miR-1914-5p estaria resultando na inibição traducional.

A diminuição nos níveis de colesterol intracelular pode também ser explicado por outra ótica. As células podem remover o excesso de colesterol através do transporte reverso de colesterol (TRC) (FU *et al.*, 2004). Este transporte reverso se dá por invaginações na membrana plasmática, denominadas cavéolas. As cavéolas possuem proteínas associadas em sua estrutura, as caveolinas. Estas proteínas, por sua vez, possuem 3 isoformas: caveolina-1, caveolina-2 e caveolina-3 (LUO *et al.*, 2010), diferindo na estrutura molecular e distribuição dos tecidos (RAZANI; WOODMAN; LISANTI, 2002). Estudos têm mostrado que as caveolinas podem estar envolvidas na regulação do colesterol através do TRC (SMART *et al.*, 1996; FU *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2010). Pesquisas em bancos de bioinformática têm sugerido que a caveolina-2 possui sítios de interação com o miR-1914-5p. Esta informação, por sua vez, pode sugerir que, a inibição deste miRNA poderia aumentar a expressão da caveolina-2, de modo a aumentar o efluxo de colesterol para o meio extracelular. Logo, os níveis de expressão de genes correlatos à síntese de colesterol poderiam ter sua expressão aumentada como forma de compensar os baixos níveis de colesterol no meio intracelular. Entretanto, mais investigações desta correlação deverão ser feitas.

6.7 Marcação de AGs e análise da β -oxidação por fluorescência

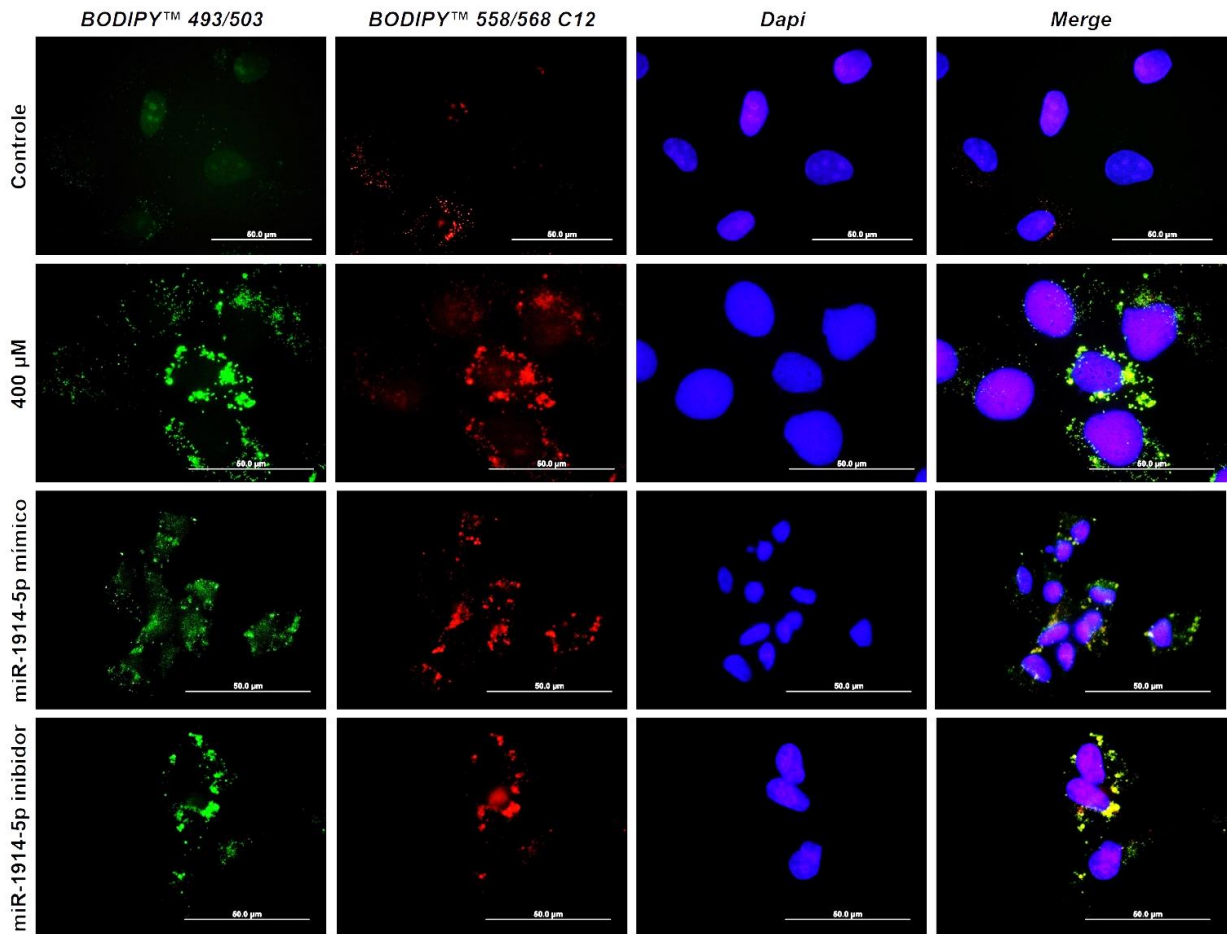
Para se analisar os níveis de β -oxidação de AGs, ensaios de microscopia de fluorescência foram realizados, para se mensurar os lipídeos neutros armazenados e/ou oxidados. Os resultados são apresentados na Figura 33.

Ao analisarmos os resultados (Figura 33 B), é possível observar que as células transfectadas com o mímico do miR-1914-5p não apresentaram uma completa sobreposição do vermelho C12 (molécula análoga a um AG saturado de 12 carbonos) às gotículas verdes de lipídeos neutros (apontadas em verde nas imagens). Esses resultados sugerem que parte dos lipídeos armazenados estavam sendo oxidados para obtenção de energia por parte da célula. Este fenômeno é observado em células cujo meio celular carece de nutrientes, como postulado por Rambold e colaboradores (2015). Ainda em nossas análises, isso sugere uma forte alteração metabólica

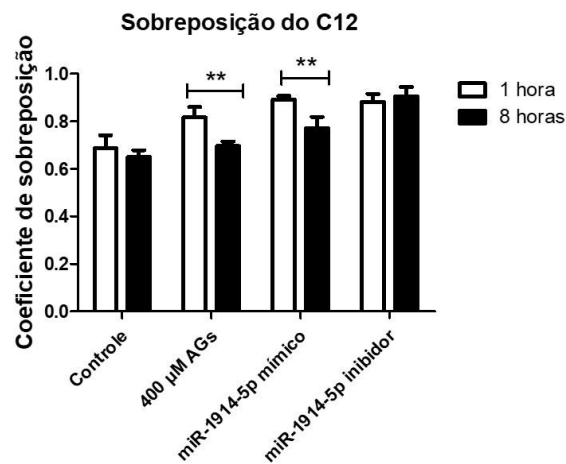
Em contrapartida, células onde o miR-1914-5p foi inibido, houve uma sobreposição completa do vermelho C12 ao verde das gotículas de lipídeos, indicando um maior armazenamento de lipídeos e uma redução nas taxas de oxidação. Esses resultados, em parte, justificam os aumentos nos níveis de expressão de *ACC2* (Figura 26) e dos transcritos *ACSL4/5* (Figura 28) nas culturas transfectadas com a molécula inibidora do miR-1914-5p. Um acúmulo de lipídeos neutros e uma redução na atividade oxidativa, leve a “morte em meio à fartura” caso a situação se persista, muito semelhante aos quadros da diabetes, sendo deletério à célula e ao organismo como um todo.

Figura 33. A) Microscopia de fluorescência. Células hepáticas estreladas, LX-2, transfectadas com mímico (40 nM) ou inibidor (40 nM) do miR-1914-5p, incubadas com 400 μ M de AGs (2:1 ácidos oleico e palmítico), coradas com BODIPY™ 558/568 C12 (lipídeo vermelho), BODIPY™ 493/503 (lipídeo verde), e DAPI (núcleo em azul). **B)** Quantificação da sobreposição do C12 com gotículas de lipídeos verdes pelo Coeficiente de Sobreposição. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Tukey, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

A)



B)



7 CONCLUSÕES

O cultivo de células transfectadas com o mímico do miR-1914-5p e incubadas com AGs mostrou um aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol intracelulares, além da modulação de genes correlatos à síntese e oxidação de lipídeos, quando comparadas à condição controle. O aumento da expressão do gene *SREBP1c*, por sua vez induz a ativação de genes lipogênicos. A diminuição dos níveis de *MLYCD*, juntamente com o aumento dos níveis de *ACC2* poderiam indicar uma grande disposição de malonil-CoA no meio. O aumento dos níveis de *ACSL4*, *lipina 1* e *DGAT2* podem sugerir um aumento na síntese de TGs e posterior armazenamento em gotículas lipídicas. Entretanto, uma maior expressão de genes relacionados à hidrólise de TGs, como *ATGL*, *HSL* e *MAGL*, poderia indicar que a célula não estaria apenas armazenando TGs, mas tentando buscar uma homeostase lipídica liberando esses AGs para oxidação. Com os altos níveis de malonil-CoA no meio intracelular, o aumento da expressão da *CPT1a* poderia indicar um efeito compensatório da célula, onde a *CPT1a* tentaria combater a inibição ocasionada pelo aumento de *ACC2*. Apesar do miR-1914-5p modular os níveis de expressão de diversos genes correlatos ao metabolismo de lipídeos, cabe ressaltar que essas análises são a nível de mRNA, o que não necessariamente implica numa maior expressão das proteínas.

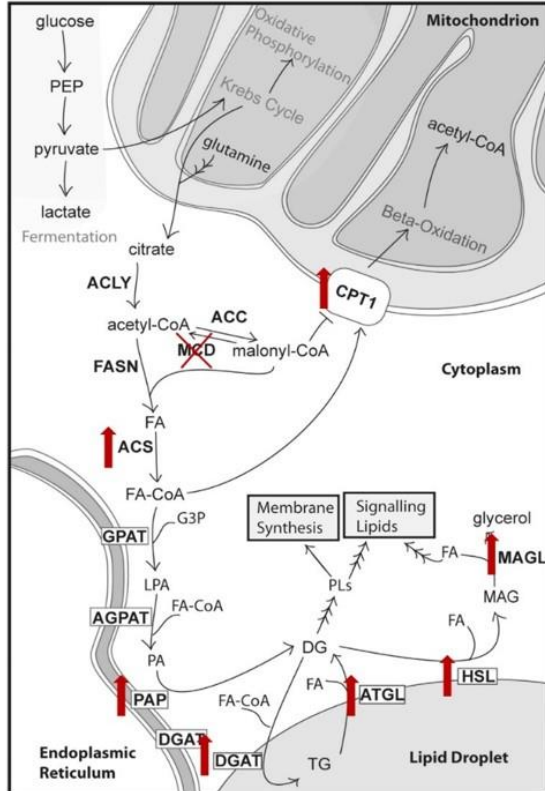
Em células transfectadas com moléculas inibidoras do miR-1914-5p e incubadas com AGs, observa-se um aumento nos níveis de expressão dos genes *SREBP1c* e *ACC1*, sendo este último um gene alvo do miR-1914-5p. A baixa expressão de *MLYCD*, juntamente com o aumento de *ACC1* faz com que haja malonil-CoA para seguir na síntese de AGs. Níveis aumentados de *ACC2* produz malonil-CoA o suficiente para inibir a via da β -oxidação. O aumento de *ACSL4*, *ACSL5*, *lipina 1* e *DGAT2* sugere uma maior síntese de TGs. A baixa expressão de lipases para hidrólise de TGs poderia indicar um maior armazenamento de TGs em gotículas lipídicas, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise de TGs intracelulares. A expressão dos níveis de mRNA de *SCD1* foi aumentada quando o miR-1914-5p foi inibido, pois sabe-se que o miR-1914-5p possui interação com o mRNA deste gene. É provável que, se há uma maior expressão de *SCD1*, sugere-se uma maior produção de AGs insaturados, como o ácido oleico, corroborando com o apresentado no ensaio de GC/MS (Figura 23). Apesar de supostamente aumentar a lipogênese *de novo*, a inibição do miR-1914-5p diminuiu consideravelmente os níveis de colesterol intracelulares, quando comparado à condição controle, além de mostrar ter sítios

putativos de interação com genes relacionados à via de síntese de colesterol. A partir dos resultados obtidos, a inibição deste miRNA pareceu ter um efeito mais intenso na LDN, uma vez que genes relacionados à via oxidativa não foram modulados. Os esquemas simulando os efeitos do aumento ou inibição do miR-1914-5p em células LX-2 são apresentados na Figura 34.

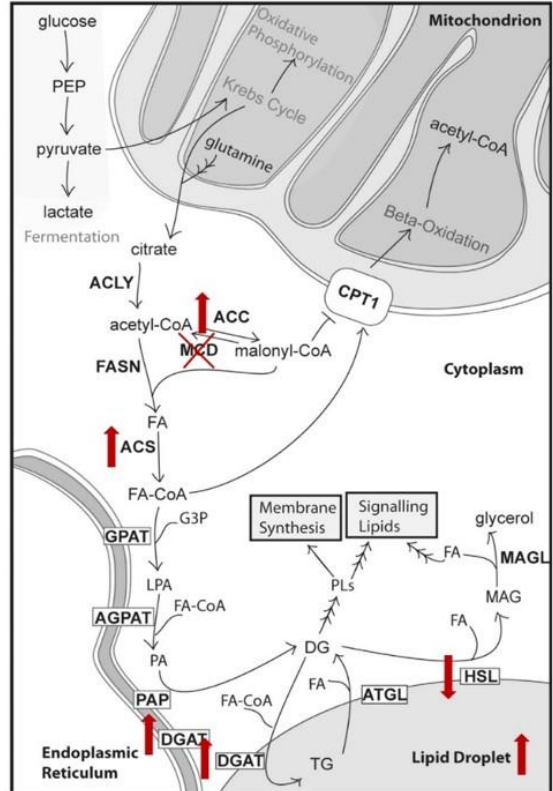
Podemos concluir que o efeito do miR-1914-5p parece variar em linhagens cultivadas isoladamente, tendo a confirmação de que a potencial ação deste miRNA é aparentemente fortalecida quando este é inserido em linhagens cocultivadas.

Figura 34. Esquema sintético do aumento ou inibição do miR-1914-5p em células LX-2.

Aumento do miR-1914-5p em LX-2



Inibição do miR-1914-5p em LX-2



Fonte: Adaptado de Currie *et al.*, 2013.

REFERÊNCIAS

- AHMED, E. A. et al. Review on liver steatosis and its impact on liver transplantation. **J Liv Res Dis Ther**, v. 3, n. 4, p. 00064, 2017.
- ALLEN, E. S. The liver: anatomy, physiology, disease and treatment. **BIO4161, Human Anatomy & Physiology, Northeastern University**, 2002.
- AMEER, F. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895-902, 2014.
- ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1221-1231, 2002.
- BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World journal of hepatology**, v. 9, n. 16, p. 715, 2017.
- BHATIA, H.; VERMA, G.; DATTA, M. miR-107 orchestrates ER stress induction and lipid accumulation by post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 4, p. 334-343, 2014.
- BODEN, G. et al. Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver. **Obesity**, v. 19, n. 7, p. 1366-1373, 2011.
- BOURBEAU, M. P.; BARTBERGER, M. D. Recent Advances in the Development of Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) Inhibitors for the Treatment of Metabolic Disease: Miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 2, p. 525-536, 2015.
- BROWN, Z. J. et al. Carnitine palmitoyltransferase gene upregulation by linoleic acid induces CD4+ T cell apoptosis promoting HCC development. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 1-14, 2018.
- BROWNING, J.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.
- BU, S. Y.; MASHEK, D. G. Hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 5 mediates fatty acid channeling between anabolic and catabolic pathways. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 11, p. 3270-3280, 2010.
- BURRA, P. Liver abnormalities and endocrine diseases. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 4, p. 553-563, 2013.
- BUZZETTI, E.; PINZANI, M. ; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016.
- CALDER, P. C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, p. 18S-32S, 2015.

CARROLL, R. G. et al. An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 15, p. 5509-5521, 2018.

CASES, S. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13018-13023, 1998.

CERQUEIRA, N. uno MFSA M. et al. Cholesterol biosynthesis: a mechanistic overview. **Biochemistry**, v. 55, n. 39, p. 5483-5506, 2016.

CHIANG, J. Liver physiology: metabolism and detoxification. **Pathobiology of human disease**, p. 1770-1782, 2014.

COHEN, P. et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 240-243, 2002.

CSAKI, L. S.; REUE, K. Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 257-272, 2010.

CURRIE, E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153-161, 2013.

DA SILVEIRA, M, B. **Análise Funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo de lipídeos de células hepáticas tumorais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Universidade do Estado de São Paulo, 2019.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: a tale of two “hits”?. 1998.

DE OLIVEIRA DA SILVA, B. et al. Altered global microRNA expression in hepatic stellate cells LX-2 by angiotensin-(1–7) and miRNA-1914-5p identification as regulator of pro-fibrogenic elements and lipid metabolism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 98, p. 137-155, 2018.

DENECHAUD, P. D. et al. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. **FEBS letters**, v. 582, n. 1, p. 68-73, 2008.

DENTIN, R.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 81-86, 2005.

DIJKSTRA, A. J.; HAMILTON, R. J.; HAMM, Wolf (Ed.). **Trans fatty acids**. John Wiley & Sons, 2008.

DING, J. et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPAR α expression in nonalcoholic fatty liver disease. **Scientific reports**, v. 5, p. 13729, 2015.

DOEGE, H. et al. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1245-1258, 2006.

DONNELLY, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DUBUQUOY, C. et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 1, p. 145-153, 2011.

DUTTARROY, A. K. **Cellular proteins and their fatty acids in health and disease**. Wiley-VCH, 2003.

EL TAGHDOUNI, A. et al. In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 8, n. 1, p. 14, 2015.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 7, p. 1746, 2014.

FISCHER, E.; SPEIER, A. Darstellung der ester. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 28, n. 3, p. 3252-3258, 1895.

FRANCQUE, S. et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of hepatology**, v. 63, n. 1, p. 164-173, 2015.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.

FU, Y. et al. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 14140-14146, 2004.

GERHARD, G. S.; DISTEFANO, J. K. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 2, p. 226, 2015.

GOEDEKE, L. et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. **Hepatology**, v. 68, n. 6, p. 2197-2211, 2018.

GUNDERMANN, K. J. et al. Essential phospholipids in fatty liver: a scientific update. **Clinical and experimental gastroenterology**, v. 9, p. 105, 2016.

GUNN, P. J. et al. In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. **Physiological reports**, v. 5, n. 24, p. e13532, 2017.

HAAS, J. T.; FRANCQUE, S.; STAELS, B. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **Annual review of physiology**, v. 78, p. 181-205, 2016.

HAN, J. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **cell**, v. 125, n. 5, p. 887-901, 2006.

HARDWICK, J. P. et al. Eicosanoids in metabolic syndrome. In: **Advances in Pharmacology**. Academic Press, 2013. p. 157-266.

HARDY, T. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 451-496, 2016.

HAYES, C.; CHAYAMA, K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 280, 2016.

HE, S. et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6706-6715, 2010.

HENSLEY, K. et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 983-989, 2000.

HETHERINGTON, A. M. et al. Differential lipotoxic effects of palmitate and oleate in activated human hepatic stellate cells and epithelial hepatoma cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 1648-1662, 2016.

HIGUCHI, N. et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology Research**, v. 38, n. 11, p. 1122-1129, 2008.

HONG, Y. et al. In vitro inhibition of hepatic stellate cell activation by the autophagy-related lipid droplet protein ATG2A. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9232, 2018.

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

ILIOPOULOS, D. et al. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1 α and affects lipid metabolism. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 6, p. 1513-1523, 2010.

IPSEN, D. H.; LYKKESFELDT, J.ens; TVEDEN-NYBORG, Pernille. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, n. 18, p. 3313-3327, 2018.

JIN, X. et al. Transition from hepatic steatosis to steatohepatitis: unique microRNA patterns and potential downstream functions and pathways. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27, n. 2, p. 331-340, 2012.

JOIS, T. et al. Dietary macronutrient composition directs ChREBP isoform expression and glucose metabolism in mice. **PloS one**, v. 11, n. 12, 2016.

KANWAR, P.; KOWDLEY, K. V. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clinics in liver disease**, v. 20, n. 2, p. 225-243, 2016.

KARANJIA, R. N. et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 45, p. 9880, 2016.

KIM, J. B. Dynamic cross talk between metabolic organs in obesity and metabolic diseases. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 3, p. e214-e214, 2016.

KMIEC, Z. Cooperation of liver cells in health and disease: with 18 tables. **Springer Science & Business Media**, 2001.

KNOOK, D. L.; SEFFELAAR, A. M.; DE LEEUW, A. M. Fat-storing cells of the rat liver: their isolation and purification. **Experimental cell research**, v. 139, n. 2, p. 468-471, 1982.

KOO, S. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19, n. 3, p. 210, 2013.

KOTRONEN, A. et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 203-208, 2009.

KRETH, S.; HÜBNER, M.; HINSKE, L. C. MicroRNAs as clinical biomarkers and therapeutic tools in perioperative medicine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 2, p. 670-681, 2018.

LABRECQUE, D. R. et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 467-473, 2014.

LEE, J. et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12604-12611, 2010.

LEE, J. et al. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 7, p. 3190-3199, 2014.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEVENE, A. P.; GOLDIN, R. D. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. **Histopathology**, v. 61, n. 2, p. 141-152, 2012.

LI, F. Q. et al. Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 739-47, 2015.

- LI, Z.; RANA, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 8, p. 622-638, 2014.
- LIN, Y. et al. MicroRNA profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. **Cancer Biomarkers**, v. 18, n. 4, p. 339-347, 2017.
- LISS, K.; FINCK, B. N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimie**, v. 136, p. 65-74, 2017.
- LOU-BONAFONTE, J. M.; ARNAL, C.; OSADA, J. New genes involved in hepatic steatosis. **Current opinion in lipidology**, v. 22, n. 3, p. 159-164, 2011.
- LUO, D. X. et al. A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1243-1257, 2010.
- MADISON, B. B. Srebp2: a master regulator of sterol and fatty acid synthesis. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 3, p. 333-335, 2016.
- MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 4, p. 393-416, 2004.
- MARTIUS, G. et al. Hepatic fat accumulation and regulation of FAT/CD36: an effect of hepatic irradiation. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 5379, 2014.
- MASHEK, D. G. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. **Advances in nutrition**, v. 4, n. 6, p. 697-710, 2013.
- MASHEK, D. G.; LI, L. et al.; COLEMAN, R.osalind A. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 9, p. 2004-2010, 2006.
- MIN, H. K. et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 665-674, 2012.
- MORÁN-SALVADOR, E. et al. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte-and macrophage-specific conditional knockouts. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 8, p. 2538-2550, 2011.
- MORAVCOVA, A. et al. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. **Physiological research**, v. 64, p. S627, 2015.
- MOSLEHI, A.; HAMIDI-ZAD, Z. Role of SREBPs in liver diseases: a mini-review. **Journal of clinical and translational hepatology**, v. 6, n. 3, p. 332, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURO, E.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E.; EGGERT, U. S. Lipids in cell biology: how can we understand them better?. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 12, p. 1819-1823, 2014.

NAKABAYASHI, H. et al. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer research**, v. 42, n. 9, p. 3858-3863, 1982.

NASSIR, F. et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. **Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167, 2015.

NASSIR, F.; IBDAH, J. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 8713-8742, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninguer**. 4a ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. v. 2

NI, Y. et al. Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 43, p. 7666, 2017.

OZOUGWA, J. C.; EYO, J. E. Hepatoprotective effects of *Allium cepa* (onion) extracts against paracetamol-induced liver damage in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 26, 2014.

OZOUGWU, J. Physiology of the liver. **International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences**, v. 4, n. 8, p. 13-24, 2017.

PATSOURIS, D. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1508-1516, 2006.

PERTTILÄ, J. et al. PNPLA3 is regulated by glucose in human hepatocytes, and its I148M mutant slows down triglyceride hydrolysis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 9, p. E1063-E1069, 2012.

PERUMPAIL, B. J. et al. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 47, p. 8263, 2017.

PÉTERFY, M. et al. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. **Nature genetics**, v. 27, n. 1, p. 121-124, 2001.

PETTINELLI, P. et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-molecular basis of disease**, v. 1792, n. 11, p. 1080-1086, 2009.

PETTINELLI, P.; VIDELA, L. A. Up-regulation of PPAR- γ mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1424-1430, 2011.

PEVERILL, W.; POWELL, L.; SKOIEN, R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 8591-8638, 2014.

PINEAU, L. et al. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. **Traffic**, v. 10, n. 6, p. 673-690, 2009.

PIRAZZI, C. et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 6, p. 1276-1282, 2012.

PONZIANI, F. R. et al. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 8, p. 1055-1067, 2015.

POPEIJUS, H. E. et al. Fatty acid chain length and saturation influences PPAR α transcriptional activation and repression in HepG2 cells. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 12, p. 2342-2349, 2014.

PURI, P. et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 1081-1090, 2007.

QIN, S.; YIN, J.; HUANG, K. Free fatty acids increase intracellular lipid accumulation and oxidative stress by modulating PPAR α and SREBP-1c in L-02 cells. **Lipids**, v. 51, n. 7, p. 797-805, 2016.

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

RATZIU, V. et al. A survey of patterns of practice and perception of NAFLD in a large sample of practicing gastroenterologists in France. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 2, p. 376-383, 2012.

RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 3, p. 431-467, 2002.

RICCHI, M. et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 5, p. 830-840, 2009.

RISTIG, M.; DRECHSLER, H.; POWDERLY, W. G. Hepatic steatosis and HIV infection. **AIDS Patient Care & STDs**, v. 19, n. 6, p. 356-365, 2005.

ROMEO, S. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Nature genetics**, v. 40, n. 12, p. 1461, 2008.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive physiology**, v. 4, n. 1, p. 177-197, 2011.

SATTAR, N.; FORREST, E.; PREISS, D. Non-alcoholic fatty liver disease. **bmj**, v. 349, p. g4596, 2014.

SAYINER, M. et al. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. **Clinics in liver disease**, v. 20, n. 2, p. 205-214, 2016.

SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M.D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 79-94, 2016.

SEVASTIANOVA, K. et al. Effect of short-term carbohydrate overfeeding and long-term weight loss on liver fat in overweight humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 96, n. 4, p. 727-734, 2012.

SHI, L.; TU, B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. **Current opinion in cell biology**, v. 33, p. 125-131, 2015.

SINGH, A. B. et al. Liver-specific knockdown of long-chain acyl-CoA synthetase 4 reveals its key role in VLDL-TG metabolism and phospholipid synthesis in mice fed a high-fat diet. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 5, p. E880-E894, 2019.

SMART, E. J. et al. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29427-29435, 1996.

SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 61, n. 5, p. 1282-1293, 2016.

SOZIO, M. S.; LIANGPUNSAKUL, S.; CRABB, D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. In: **Seminars in liver disease**. © Thieme Medical Publishers, 2010. p. 378-390.

STAEHR, P. et al. Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. **Diabetes**, v. 52, n. 2, p. 260-267, 2003.

STUART, B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. **John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, England. DOI**, v. 10, p. 0470011149, 2004.

SUN, S. et al. Caveolae and caveolin-1 mediate endocytosis and transcytosis of oxidized low density lipoprotein in endothelial cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1336-1342, 2010.

SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 9, p. 542, 2013.

THOMPSON, B. R.; LOBO, S.; BERNLOHR, D. A. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 318, n. 1-2, p. 24-33, 2010.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TOLMAN, K. G.; DALPIAZ, A. S. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 6, p. 1153, 2007.

TSAI, J. H. et al. Aggressive non-alcoholic steatohepatitis following rapid weight loss and/or malnutrition. **Modern Pathology**, v. 30, n. 6, p. 834, 2017.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 236, 2011.

VALLIM, T.; SALTER, A. M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 82, n. 4-6, p. 211-218, 2010.

VOCK, C.; DÖRING, F.; NITZ, I. Transcriptional regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase genes by human ACBP. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 5-6, p. 515-524, 2008.

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

WALCZAK, R.; TONTONOZ, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPAR γ in the control of lipid metabolism. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 2, p. 177-186, 2002.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943-951, 2006.

WANG, F. S. et al. The global burden of liver disease: the major impact of China. **Hepatology**, v. 60, n. 6, p. 2099-2108, 2014.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 1, p. 25-30, 2016.

WANG, M. et al. Inhibition of LXR/SREBP-1c-Mediated Hepatic Steatosis by Jiang-Zhi Granule. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

WATSON, J. A.; LOWENSTEIN, J. M. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 22, p. 5993-6002, 1970.

WEI, Y. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 2, p. 193, 2008.

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

WINDEMULLER, F. et al. Lipogenesis in Huh7 cells is promoted by increasing the fructose: Glucose molar ratio. **World journal of hepatology**, v. 8, n. 20, p. 838, 2016.

WU, S.; NÄÄR, A. M. A lipid-free and insulin-supplemented medium supports De Novo fatty acid synthesis gene activation in melanoma cells. **PloS one**, v. 14, n. 4, 2019.

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. 142-151, 2005.

YEH, M. M.; BRUNT, E. M. Pathological features of fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 754-764, 2014.

YILMAZ, Y. Is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 36, n. 9, p. 815-823, 2012.

YU, X. X. et al. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. **Hepatology**, v. 42, n. 2, p. 362-371, 2005.

ZHANG, X. Q. et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 7, p. 1768, 2014.