UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR DO miRNA-149-3p NO PROCESSO DE MIGRAÇÃO E ADESÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR E SUA CORRELAÇÃO COM O METABOLISMO DE LIPÍDEOS

Priscila Ferrari de Morais

Fevereiro, 2019

PRISCILA FERRARI DE MORAIS

ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR DO miRNA-149-3p NO PROCESSO DE MIGRAÇÃO E ADESÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR E SUA CORRELAÇÃO COM O METABOLISMO DE LIPÍDEOS

Orientador: Profª. Drª. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES.

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

Rio Claro, 2019

M827a

Morais, Priscila Ferrari de
Análise Celular e Molecular do miRNA-149-3p no Processo de Migração e Adesão em Células de Carcinoma Hepatocelular e sua Correlação com o Metabolismo de Lipídeos / Priscila Ferrari de Morais. -- Rio Claro, 2019
87 p.

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

1. câncer de fígado CHC. 2. microRNAs. 3. metabolismo de lipídeos. 4. migração celular. 5. cultura de células. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise celular e molecular do miRNA-149-3p no processo de migração e adesão em células de carcinoma hepatocelular e sua correlação com o metabolismo de lipídeos

AUTORA: PRISCILA FERRARI DE MORAIS
ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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

Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. CAMILA ANDREA DE OLIVEIRA
x / Centro Universitário Hermínio Ometto

Profa. Dra. DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES
Pós-Doutoranda do Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente a Deus pela provisão e refúgio nos momentos bons e difíceis no decorrer do curso, e por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais Ana Lucia e João Valter, pelo amor, força e encorajamento depositado em mim e pelos ensinamentos fundamentais para viver com integridade.

Aos meus irmãos Henrique e Melissa pela parceria e amizade por toda a vida.

Ao meu noivo Odinei Gustavo pelo amor e por ser exemplo de pessoa determinada, esforçada e integra que é para mim.

À minha orientadora, Profª. Drª. Karen Cristiane Martinez de Moraes, pela orientação, ajuda, críticas, sugestões e amizade durante toda a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) pela disponibilidade e auxílio com o experimento de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (CG/EM).

Aos grandes amigos Letícia Ramos, Marina Bonfogo, Caio Mateus, Thaís Porto, Lara Santello e Lígia Pagliotto, por toda ajuda e pela grande amizade durante esses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (474060/2012-8) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2013/21186-5 e 2018/05286-3) pelos financiamentos que possibilitaram esta pesquisa.

“Confie no SENHOR de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência.
Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo”.
Provérbios 3:5-6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação ilustrativa dos componentes celulares do fígado.....15

Figura 2: Representação ilustrativa da comunicação celular através do contato célula-célula.....17

Figura 3: Processos metabólicos e síntese de ácido graxo *de novo*.....21

Figura 4: Esquema representativo da biogênese do miRNA.....23

Figura 5: Níveis de expressão relativa do RNAm AAMP em SK-HEP-1 crescidas em 10% de SBF.....42

Figura 6: Nível de expressão relativa do miRNA hsa-miR-149-3p em células SK-HEP-1.....42

Figura 7: Análise dos níveis proteicos de AAMP (52 kDa) e β-actina (42 kDa) por *western blot*.....*43*

Figura 8: Microscopia de florescência de células SK-HEP-1.....45

Figura 9: Ensaio da ferida (*wound healing*) em células SK-HEP-1 transfectadas ou não com o miR-149-3p.....45

Figura 10 - Ensaio de Invasão Celular. Análise do potencial invasivo de células SK-HEP-1 47

Figura 11: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à degradação da matriz extracelular (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs) 48

Figura 12: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesão celular *Tight Junction Protein 1* (TJP1) e Ocludina (OCLDN).....51

Figura 13: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesividade celular (E-caderina, N-caderina e Vimentina).....53

Figura 14: Representação esquemática da via de sinalização TGF-β1 e SMADs.....54

Figura 15: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à sinalização do fator de crescimento transformador (TGF-β1) e SMADs. 55

Figura 16: Representação esquemática da morfologia básica de uma gotícula de lipídeo.....56

Figura 17. Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro em células SK-HEP-1 e quantificação relativa de gotículas lipídicas. 57

Figura 18: Mensuração dos níveis de ácido araquidônico presente nas amostras. 59

Figura 19: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à fatores de transcrição no metabolismo de lipídeos: SREBP1, PPAR-α e PPAR-γ.....61

Figura 20: Níveis de expressão dos RNAms de genes correlatos a elongases, no metabolismo de lipídeos: ELOVL1 e ELOVL7.....62

Figura 21: Níveis de expressão relativa dos RNAm *AAMP* nas células hepáticas HEP-G2 crescidas em 10% de SBF.....64

Figura 22: Nível de expressão relativa do miRNA hsa-miR-149-3p em células HEP-G2.....65

Figura 23: Análise dos níveis proteicos de *AAMP* (52 kDa) e β-actina (42 kDa) por *western blot* nas condições estudadas.....66

Figura 24: Microscopia de florescência de células HEP-G2.....67

Figura 25: Ensaio da ferida (*wound healing*) em células HEP-G2.....68

Figura 26: Ensaio de Invasão Celular.....69

Figura 27: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à degradação da matriz extracelular (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs) 71

Figura 28: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesão celular Ocludina (OCLDN) e *Tight Junction Protein 1* (TJP1). 72

Figura 29: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à sinalização do fator de crescimento transformador (TGF-β1) e SMADs.....73

Figura 30: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesividade celular (E-caderina, N-caderina e Vimentina). 75

Figura 31. Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro em células HEP-G2..... 76

Figura 32: Quantidade de Ácido Oleico presente nas amostras. 77

Figura 33: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à fatores de transcrição, no metabolismo de lipídeos: SREBP-1, PPAR-α e PPAR-γ 78

Figura 34: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos elongases, no metabolismo de lipídeos: ELOVL-1 e ELOVL-7. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional e suas respectivas temperaturas de anelamento (Tm).....34

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR.....35

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR de miRNAs envolvidos no processo de hepatocarcinoma.....36

RESUMO: O carcinoma hepatocelular (CHC) ocupa o 5º lugar entre os cânceres mais comum no mundo. No geral, cânceres apresentam alto risco de recorrência na forma de doença metastática. A identificação e caracterização funcional de genes associados à invasão e metástase é crucial para o desenvolvimento de novas terapias orientada contra esse processo. A proteína celular associada a migração e angiogênese (*AAMP*), está amplamente distribuída em muitos tipos de células com potencial migratório. Associado a isso, vários estudos apontam o papel crucial do metabolismo lipídico na iniciação das metástases. Estudos demonstram que os microRNAs (miRNAs) têm um papel central no controle das funções básicas das células. Um miRNA de grande interesse para este trabalho é o miRNA-149-3p. Em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa, foi demonstrado que em células tumorais pulmonares (A549) esse miRNA foi apontado como um elemento de destaque no controle dos processos celulares de migração, pelo controle da proteína celular associada a migração e angiogênese (*AAMP*). Tendo em vista as doenças hepáticas, cabe avaliar os efeitos do miRNA-149-3p, considerando a existência de alvos putativos a esse miRNA, que se correlacionam diretamente com o metabolismo energético, buscando analisar pontos da via onde ocorre modulação ocasionada por este miRNA. Para as análises optou-se por trabalhar com as células SK-HEP-1 (linhagem metastática) e HEP-G2 (linhagem metabolizadora). Segundo as análises, demonstrou-se que tanto para SK-HEP-1 quanto para HEP-G2 a AAMP não é a proteína principal, responsável pelo controle da migração. Ao analisar a expressão dos genes correlatos ao processo de migração e adesão celular (MMP2 e MMP9; TIMP1 e TIMP2; Ocludina, TJP1 entre outros), observa-se que em SK-HEP-1 apresenta, aumento desses genes ao transfectar as células com o miR-149-3p mímico; e também houve aumento na expressão dos fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de lipídeos, inferindo que este microRNA potencializa e garante energia para as células desempenharem suas atividades (promove migração). Diferentemente em HEP-G2, onde os genes correlatos ao processo de migração e adesão aumentam ao inibir o miR-149-3p, que também, mostrou-se um modelo interessante no estudo do metabolismo energético. No presente estudo, o miR-149-3p obteve maior relevância no controle do metabolismo de lipídeos. A importância desse trabalho se destaca, uma vez que, o tratamento clínico com microRNAs ainda precisa de muita atenção, dedicação e pesquisa.

Palavras-chave: câncer de fígado CHC; microRNAs; metabolismo de lipídeos; migração celular; cultura de células.

ABSTRACT: Hepatocellular carcinoma (CHC) ranks 5th among the most common cancers in the world. In general, cancers are at high risk of recurrence in the form of metastatic disease. The identification and functional characterization of genes associated with invasion and metastasis is crucial for the development of new therapies targeted against this process. Cellular protein associated with migration and angiogenesis (AAMP), is widely distributed in many cell types with migratory potential. Associated with this, several studies point to the crucial role of lipid metabolism in the initiation of metastases. Studies have shown that microRNAs (miRNAs) play a central role in the control of basic cell functions. A miRNA of great interest for this work is miRNA-149-3p. In previous studies by the research group, it was demonstrated that in lung tumor cells (A549) this miRNA was indicated as a prominent element in the control of cellular migration processes, by the cellular protein control associated with migration and angiogenesis (AAMP). Considering the hepatic diseases, the effects of miRNA-149-3p can be evaluated, considering the existence of putative targets for this miRNA, which correlate directly with the energetic metabolism, seeking to analyze points of the pathway where the miRNA modulation occurs. For the analyzes we opted to work with the SK-HEP-1 (metastatic line) and HEP-G2 (metabolizing line) cells. According to the analyzes, it has been shown that for both SK-HEP-1 and HEP-G2 the AAMP is not the main protein responsible for migration control. In analyzing the expression of the genes correlated to the process of migration and cell adhesion (MMP2 and MMP9, TIMP1 and TIMP2, Occludin, TJP1 among others), it is observed that in SK-HEP-1 it presents, increase of these genes when transfecting cells with or miR-149-3p mimic; and there was also an increase in the expression of the transcription factors involved in lipid metabolism, inferring that this microRNA potentiates and guarantees energy for cells to perform their activities (promotes migration). Differently in HEP-G2, where the genes correlated to the migration and adhesion process increase when inhibiting miR-149-3p, which also proved to be an interesting model in the study of energy metabolism. In the present study, miR-149-3p was more relevant in the control of lipid metabolism. The importance of this work stands out, since, the clinical treatment with microRNAs still needs a lot of attention, dedication and research.

Keywords: liver cancer HCC; microRNAs; lipid metabolism; cell migration; cell culture.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....15
1.1 Fígado e carcinoma hepatocelular (CHC).....15
1.2 Elementos celulares e moleculares na metástase.....16
1.2.1 Adesão celular.....16
1.2.2 Transição epitélio-mesenquimal.....17
1.2.3 Angiogênese e Metástase.....18
1.3 Metabolismo de lipídios associado ao processo de migração celular.....19
1.4 Biogênese de MicroRNAs e a regulação da expressão gênica.....22
2. OBJETIVOS.....26
2.1 Objetivo geral.....26
2.2 Objetivos específicos.....26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....27
3.1 Cultura de células e transfecção celular.....27
3.2 Ensaios de microscopia de fluorescência.....28
3.3 Microscopia de campo claro – análise de gotículas lipídicas pela coloração de Oil Red O.....29
3.4 Análise da migração celular: os ensaios de *wound healing* (ensaio da ferida) e da migração em gota de agarose.....29
3.5 Extração de RNA total, miRNA, e transcrição reversa.....31
3.5.1 Extração de RNA total.....31
3.5.2 Extração de miRNA.....31
3.5.3 Transcrição reversa: RNA.....32
3.5.4 Transcrição reversa: miRNA.....33
3.6 Análise de expressão gênica por reações de PCR convencional e PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....33
3.6.1 Reações de PCR convencional.....33
3.6.2 Reações de qPCR: mRNAs.....35
3.6.3 Reações de qPCR: microRNAs.....36
3.7 Western blot.....37
3.8 Esterificação de ácidos graxos, identificação e quantificação via GC/MS.....38
3.9 Análise de bioinformática.....39
3.10 Análise estatística.....39

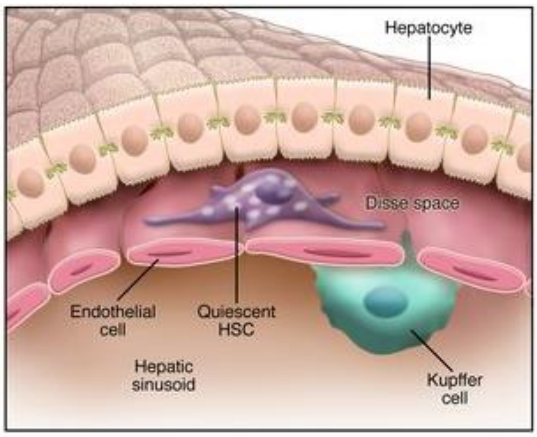
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....40
4.1 CAPITULO I – LINHAGEM CELULAR SK-HEP-1.....40
4.1.1 Análises preliminares: os efeitos moleculares do miRNA-149-3p na proteína *AAMP*.....40
4.1.2 Análise da expressão de proteína AAMP.....43
4.1.3 Ensaio de microscopia de fluorescência.....44
4.1.4 Ensaio de migração celular – ensaio da ferida (*wound healing*).....45
4.1.5 Ensaio de invasão celular.....46
4.1.6 Expressão de genes correlatos ao processo de adesão/ migração celular.....47
4.1.7 Análise de gotículas lipídicas pelo ensaio de *Oil Red O*.....56
4.1.8 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/ EM) – análise de ácidos graxos 58
4.1.9 Expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos.....59
5. Síntese dos resultados obtidos para SK-HEP-1.....63
6. CAPITULO II – LINHAGEM CELULAR HEP-G2.....63
6.1 Análises preliminares: os efeitos moleculares do miRNA-149-3p na proteína *AAMP*.....63
6.1.2 Análise da expressão de proteína AAMP.....65
6.1.3 Ensaio de microscopia de fluorescência.....66
6.1.4 Ensaio de migração celular – ensaio da ferida (*wound healing*).....68
6.1.5 Ensaio de invasão celular.....69
6.1.6 Expressão de genes correlatos ao processo de adesão/ migração celular.....70
6.1.7 Análise de gotículas lipídicas pelo ensaio de *Oil Red O*.....75
6.1.8 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/ EM) – análise de ácidos graxos.....76
6.1.9 Expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos.....77
7. Síntese dos resultados obtidos para HEP-G2.....79
8. DISCUSSÃO COMPARATIVA E CONCLUSÃO.....80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fígado e carcinoma hepatocelular (CHC)

O fígado é a maior glândula do corpo humano, pesando em média 1.500 g em adultos, o que equivale em média a 2,5% do peso corporal e é responsável pelas principais funções fisiológicas, como o metabolismo de carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, a secreção biliar e a desintoxicação (COX; NELSON, 2011). O órgão é composto por diferentes células especializadas (Figura 1), que são divididas em células parenquimatosas, os hepatócitos (correspondendo de 60% a 70% da massa celular total) e não-parenquimatosas, células endoteliais sinusoidais, células de Kupffer, células estreladas e colangiócitos (LEE; LUK, 2010; JUZA; PAULI, 2014).

Figura 1: Representação ilustrativa dos componentes celulares do fígado (Adaptado de IREDALE, 2007).



Sabe-se que são inúmeras as patologias que acometem o fígado. Indivíduos que apresentam alguma doença hepática, como as hepatites, por exemplo, estão propensos a complicações, sendo que 25% a 30% dos casos evoluirão para o quadro de cirrose hepática e 5% a 10% desenvolverão carcinoma hepatocelular (CHC) (EL-SERAG et al., 2008).

O CHC é um dos tumores malignos mais comuns do mundo, cuja baixa expectativa de vida (cinco anos após o diagnóstico) deve-se à alta ocorrência de metástase (DAVIS et al., 2008). Como nos demais cânceres, o CHC surge quando ocorre mutação nos genes de uma célula que a fazem se multiplicar desordenadamente. Por sua vez, essa mutação pode ser causada por agentes externos, como o vírus da hepatite, modificações

epigenéticas, ou pela multiplicação excessiva das células, aumentando o risco de surgimento de erros na duplicação dos genes, e perturbação das vias celulares e moleculares (GOMES et al., 2013; JEMAL et al., 2011). O CHC representa o principal subtipo histológico de neoplasias hepáticas primárias, representando 70% a 85% do número total de cânceres de fígado. Os principais fatores de risco para o CHC incluem a infecção pelo vírus da hepatite B e C, as doenças hepáticas derivadas do consumo de álcool, como a cirrose; e a esteatose hepática não alcoólica (BAFFY et al. 2012).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam o câncer como uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando 8,8 milhões de óbitos em 2015 (FAROUZANFAR et al., 2015). Particularmente, o CHC é considerado o 5º câncer mais comum no mundo e a 3ª causa mais comum de morte relacionada ao câncer em humanos (FINGAS et al., 2016; GOMES et al., 2013; JEMAL, 2011). Embora nas últimas décadas os métodos de tratamentos do CHC estejam evoluindo (radio e quimioterapia, terapias locorregionais, ressecção hepática e a possibilidade de transplante), o prognóstico permanece extremamente diferente (DHIR et al., 2016; ZHANG et al., 2012).

1.2 Elementos celulares e moleculares na metástase

1.2.1 Adesão celular

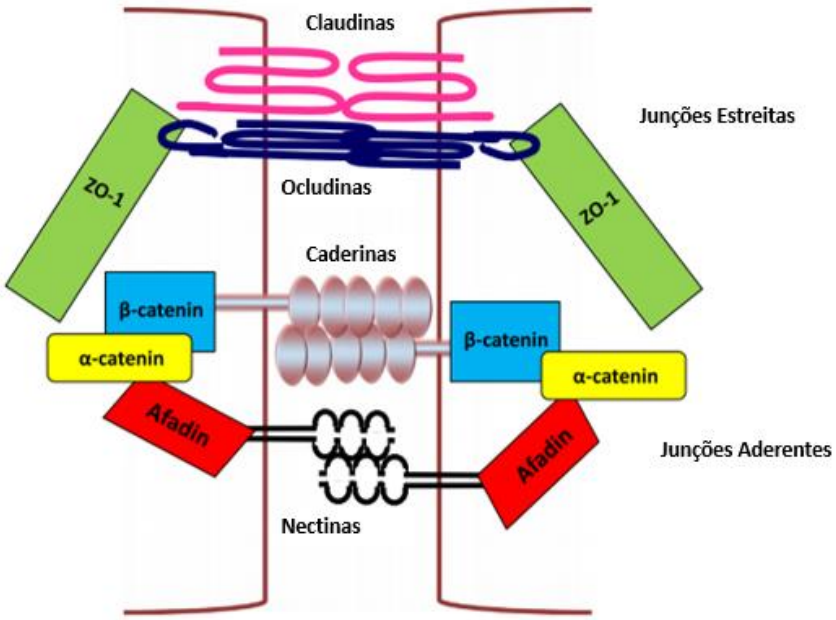
No geral, cânceres apresentam alto risco de recorrência na forma de doença metastática. A identificação e caracterização funcional de genes associados à invasão e metástase é crucial para o desenvolvimento de uma nova terapia orientada contra esse processo (AL KUBAISY et al., 2016). Entre as diversas áreas de estudo da biologia celular, a adesão célula-célula e a sua propriedade migratória se destacam, uma vez que podem prescrever tanto o desenvolvimento normal quanto a aquisição de um potencial invasivo durante a progressão tumoral (RODGERS et al., 2013).

As interações entre as células são importantes para a montagem e manutenção de tecidos tridimensionais. Estudos ultra-estruturais revelam que as células estão conectadas por múltiplos complexos juncionais, incluindo as junções estreitas, junções aderentes, junções comunicantes e desmossomos (Figura 2) (CAMPBELL et al., 2017). O mais apical de todos os componentes juncionais são as junções estreitas, elas possuem duas

funções, atuam como barreira regulando a passagem de íons, água e macromoléculas através das regiões entre as células e também estabelecendo e mantendo a polaridade da célula, restringindo a distribuição de lipídeos dentro da membrana (IKENOUCHI et al., 2007). As junções estreitas são compostas por mais de 40 proteínas que são proteínas transmembranas ou proteínas citoplasmáticas de ligação à actina. Os principais constituintes do grupo transmembranas são as Claudinas, Ocludina e moléculas de adesão juncional (JAMs). As principais proteínas de ligação à actina citoplasmáticas nas junções apertadas são as proteínas da Zônula de Oclusão (ZO). A Ocludina é importante para manter a estabilidade e a função de barreira das junções estreitas (CAMPBELL et al., 2017; SCHULZKE et al., 2005).

Embora todos os complexos juncionais sejam funcionalmente significativos, evidências recentes mostraram que as junções aderentes têm um papel crucial tanto como sensores de estímulos extracelulares quanto na regulação da dinâmica das células epiteliais (CAMPBELL et al., 2017; RODGERS et al., 2013).

Figura 2: Representação ilustrativa da comunicação celular através do contato célula-célula. (Adaptado de CAMPBELL et al., 2017).



1.2.2 Transição epitélio-mesenquimal

A transição epitélio mesenquimal (TEM) foi descrita como um conjunto de mudanças morfológicas que ocorrem nos epitélios embrionários e que dão origem a

células migratórias individuais (CAMPBELL et al., 2017). Os critérios atuais (vagamente definidos) para uma TEM incluem a desmontagem do contato célula-célula, levando à perda da polaridade epitelial e à separação em células individuais. Este processo é seguido pela aquisição de um fenótipo migratório ou mesenquimal. Este último é impulsionado pelo rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto e é acompanhado pela formação das ondulações na membrana e novos contatos entre as células e o substrato. A perda do contato célula-célula durante a TEM, tem sido amplamente atribuída a mutações nos componentes das junções aderentes ou em sua repressão transcricional. Em vários sistemas de modelos experimentais e em uma porcentagem significativa de tumores invasivos, observa-se perda de contatos célula-célula apesar da expressão normal dos genes que codificam as proteínas de adesão celular (CAMPBELL et al., 2017). Para que ocorra o processo de migração celular é necessário que haja uma regulação orquestrada de múltiplos processos celulares que envolvem a reorganização dinâmica do citoesqueleto. Tal reorganização é controlada por proteínas de ligação à actina que regulam os processos de formação nuclear, ramificação, alongamento, agrupamento e divisão celular (MOUNEIMNE et al., 2012).

1.2.3 Angiogênese e Metástase

Os eventos pró-metastáticos comuns à maioria dos tumores sólidos podem incluir a transição reversível de células tumorais de um estado epitelial para um estado mesenquimatoso, bem como suas interações com componentes estromais ou células estromais ativadas por tumores. Alguns tumores também promovem a secreção de exossomos que contêm proteínas, mRNAs e microRNAs, com o objetivo de estabelecer um nicho pró-metastático distante (OBENAUF, 2015; PASCUAL et al., 2017). Sendo assim, a metástase é um processo de múltiplas etapas em que células cancerígenas evadem o nicho do tumor primário, sobrevivem na circulação, colonizam locais distantes e proliferam (KREBS et al., 2017; SEGUIN et al., 2015). A disseminação de células tumorais e o desenvolvimento de metástases sólidas ocorrem através de vasos sanguíneos e linfáticos. As células tumorais circulantes podem ser detectadas em sangue venoso em pacientes com câncer de mama precoce e metastático, por exemplo, o que tem sido de grande relevância para o prognóstico (POLASIK et al., 2017).

Dentro desse contexto, a angiogênese se destaca como um mecanismo importante que promove a progressão do tumor, induzindo uma série de eventos, incluindo

proliferação e a diferenciação de células endoteliais, formação do tubo e maturação vascular (KUERTI et al., 2017). Esse processo de neovascularização é mediado por fatores de crescimento, dentre eles, o do endotélio vascular (VEGF), promovendo tanto o crescimento das células endoteliais como o crescimento do músculo liso vascular (KREBS et al., 2017; SEGUIN et al., 2015). A angiogênese é um processo complexo e a proteína celular associada a migração e angiogênese (*AAMP*), com peso molecular de 52 kDa, está amplamente distribuída em muitos tipos de células com potencial migratório. Evidências crescentes sugerem que *AAMP* desempenha um papel na regulação da migração celular de vários tipos de células, como células endoteliais, células musculares lisas vasculares, células T ativadas, células gliais, células de melanoma humano, bem como células de adenocarcinoma de cólon. Além disso, a expressão de *AAMP* foi significativamente regulada em tumores estromais gastrointestinais ou em células de câncer de mama (BLANCHOIN et al., 2014; HU et al., 2015).

Considerando a fisiologia da célula tumoral, sabe-se que para a manutenção das mesmas existe uma alta demanda energética. Os tumores mostram várias anomalias metabólicas, entre elas, o efeito Warburg, no qual a fermentação é utilizada mesmo na presença de oxigênio e é caracterizado por um aumento na captação e consumo de glicose, uma diminuição na fosforilação oxidativa e na produção de lactato (CURRIE et al., 2013). Atualmente alguns medicamentos que atuam no controle de células tumorais reduzem significativamente os níveis de colesterol celular ao bloquear diferentes etapas da biossíntese dessas moléculas e outras vias correlatas do metabolismo lipídico levando a inibição do crescimento celular e/ou à apoptose (HUANG; FRETER, 2015).

1.3 Metabolismo de lipídeos associado ao processo de migração celular

Vários estudos apontam o papel crucial do metabolismo lipídico na iniciação das metástases (LUO et al., 2017; PASCUAL et al., 2017; SANTOS; SCHULZE, 2012). A reprogramação metabólica foi estabelecida como característica do câncer. O câncer compartilha um fenótipo comum de proliferação celular descontrolada e, portanto, deve adquirir componentes de energia e biomassa suficientes para expandir e disseminar-se (LUO et al., 2017; PASCUAL et al., 2017; SANTOS e SCHULZE, 2012).

Uma marca emergente do câncer é a sua extensa reprogramação do metabolismo energético. Os lipídios são constituídos por ácidos graxos, os quais podem existir de

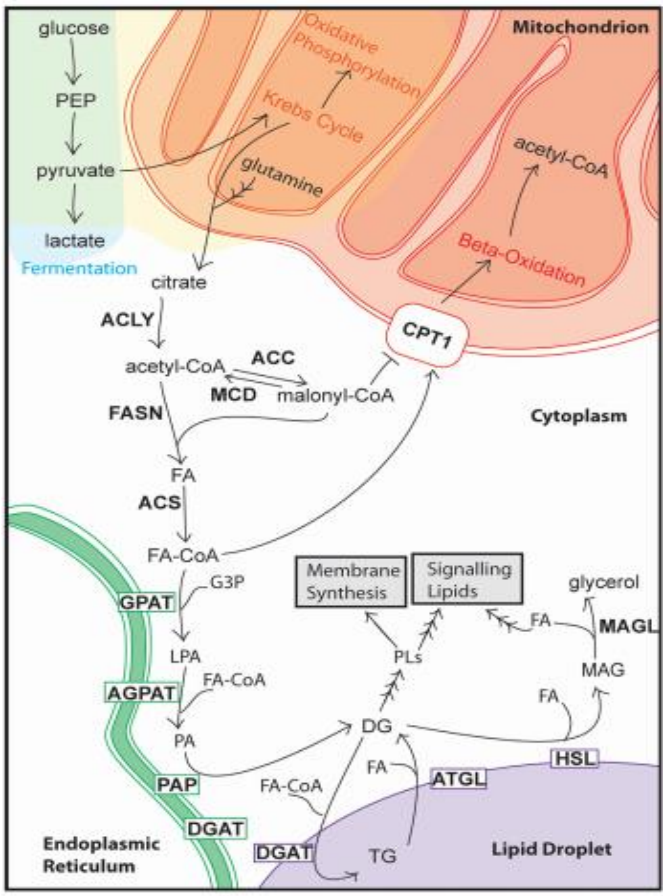
forma livre ou serem organizados em lipídeos mais complexos, como o triacilglicerol, fosfolipídio e colesterol (LEHNINGER et al., 2006). No geral, a maioria das células de mamíferos adquirem lipídios através de duas vias: através da alimentação, onde as células usarão os ácidos graxos livres na corrente sanguínea, ou através da síntese de ácido graxo *de novo*, realizada no fígado, tecido adiposo, mama em lactação, endométrio, e em tecidos com alguma alteração metabólica (LIU et al., 2010). Em particular, a síntese de ácido graxo *de novo* e o aumento do acúmulo de lipídios são um fenótipo comum observado em células agressivas de câncer de mama (WILMANSKI et al., 2017).

Antes das reações de montagem dos ácidos graxos, sucede-se a formação dos intermediários da sua biossíntese. Os grupos acetil são providos principalmente do citrato, que é produzido pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs). Várias etapas para converter carbonos de citrato em ácidos graxos bioativos são necessárias. Essas etapas envolvem ATP citrato liase (ACLY, ACL ou ATPCL), acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FASN ou FAS) e acil-CoA sintetases, também conhecido como ácido graxo-CoA-ligase (ACS, ACSL ou FACL) (Figura 3). No modelo de redução da disponibilidade de ácido graxo, a inibição dessas enzimas poderia limitar o crescimento de células cancerígenas. Importante para o significado clínico dessas estratégias, muitos inibidores dessas enzimas têm efeitos mínimos em células não cancerígenas (CURRIE, et al., 2013).

Entretanto, a síntese *de novo* de ácidos graxos é principalmente restrita ao tecido hepático e adiposo (RAY; ROY, 2017). Portanto, os lipídios alimentares que circulam servem como nutrientes para os tecidos normais, enquanto que as células malignas preferem sintetizar lipídios que utilizam vias *de novo*, aumentando assim a taxa de lipogênese intracelular. Alguns estudos demonstraram uma maior expressão de ácido graxo sintase (FASN), que é independente do conteúdo circulante de lipídios, em vários tipos de cânceres tais como mama, próstata, ovário e colorretal. O FASN catalisa as reações de condensação sucessivas para formar um ácido graxo a partir de substratos malonil-CoA e acetil-CoA, produzindo principalmente palmitato. Provavelmente, a FASN seja a enzima mais estudada no metabolismo tumoral, pois é super-expressa e está fortemente relacionada com a progressão tumoral maligna. O palmitato, que é produto final da via lipogênica e um ácido graxo saturado de 16 carbonos, pode ser alongado por ELOVL6 (proteína de alongamento de ácidos graxos de cadeia longa 6) ou dessaturado para formar um espectro de ácidos graxos diversos catalisados por esteroil-CoA desaturases (SCDs) (CHAVARRO et al., 2013; RAY; ROY, 2017). Hao et al., (2014)

demonstraram que a atividade de FASN foi significativamente aumentada no tecido de hepatocarcinoma. Essas alterações metabólicas podem ser explicadas pela alta expressão de várias sintetases de ácidos graxos em células de CHC, como SREBP1, ACLY, ACC, FASN e SCD1, em que FASN é a que apresenta maior expressão quando comparada às outras. A expressão de FASN também mostrou diferenças significativas entre células metastáticas de CHC, como a linhagem celular SK-HEP-1; e células menos metastáticas de CHC, como HEP-G2. Essas descobertas indicam que a expressão de FASN pode estar envolvida em metástases de CHC (HAO et al., 2014).

Figura 3: Processos metabólicos e síntese de ácido graxo *de novo* (CURRIE et al. 2013).



Considerando-se a complexidade das intrincadas reações que regulam o metabolismo de lipídios, diferentes co-fatores podem ser apontados e entre eles o receptor ativador de proliferação de peroxissomos (PPAR) e as proteínas de ligação de elemento regulador de esterol (SREBPs). Essas proteínas caracterizam-se como fatores de transcrição que controlam elementos centrais no metabolismo de lipídios. As SREBPs regulam o metabolismo lipídico e o armazenamento de energia através da síntese e

absorção de ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol, tornando-as cruciais para a manutenção da homeostase dos lipídios celulares. Já o PPAR-α serve como regulador mestre do metabolismo de lipídios no fígado, especialmente durante o jejum, que é acompanhado por grandes mudanças na absorção de lipídios no fígado (BENGOECHEA-ALONSO; ERICSSON, 2007; KERSTEN; STIENSTRA, 2017; SETHI et al., 2017). A ativação aberrante de SREBPs pode contribuir para a obesidade, doença hepática gordurosa e resistência à insulina, e também pode estar envolvida no desenvolvimento de cânceres (SHAO; ESPENSHADE, 2012). Além disso, há uma ampla evidência de que o aumento da produção de lipídeos é fundamental para a sobrevivência das células cancerígenas e para a progressão do câncer (ACKERMAN; SIMON, 2014; LIU et al., 2010; ZAIDI et al., 2013).

1.4 Biogênese de MicroRNAs e a regulação da expressão gênica

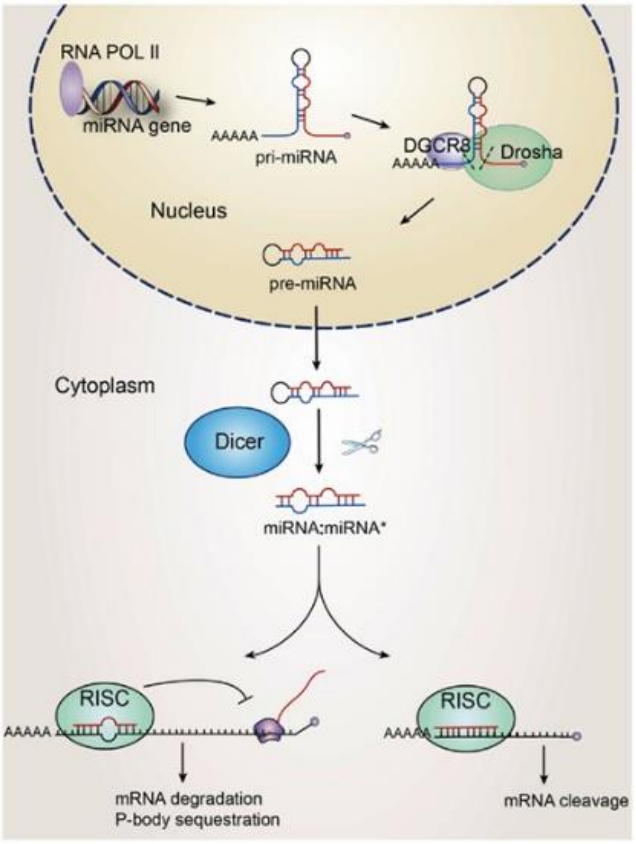
Além dos elementos elencados, estudos demonstram que os microRNAs (miRNAs) têm um papel central no controle das funções básicas das células, incluindo migração e invasão (FAN et al., 2016) e metabolismo lipídico (KWAK et al., 2010). Os miRNAs atuam em diversos processos biológicos (LU et al., 2005; BARTEL, 2009) tais como desenvolvimento, proliferação, diferenciação, crescimento, metabolismo, apoptose, resposta ao estresse celular e patogenias (CROCE; CALLIN, 2005; FAN et al., 2016; VITSIOS et al., 2017). Em tumores, a expressão de miRNAs é amplamente alterada (BONCI et al., 2016), sugerindo que as desregulações do miRNA estão profundamente implicadas no desenvolvimento e progressão do tumor, fornecendo uma nova visão sobre os mecanismos de metástase do câncer. Sabe-se que a expressão de miRNAs pode se alterar significativamente nos hepatocarcinomas, o que certamente se conecta (HAO-XIANG et al., 2010; YE et al., 2003) com as alterações fisiológicas. Assim, entender os mecanismos de atuação dessas pequenas moléculas poderá elucidar particularidades bioquímicas e moleculares que controlam o desenvolvimento de cânceres.

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs de cadeia simples, não codificantes, constituídos por aproximadamente 22 nucleotídeos, processados a partir de RNAs precursores endógenos com estrutura de forquilha. Eles modulam a expressão gênica do RNA mensageiro (RNAm) alvo, visando a clivagem ou repressão do processo de tradução (HUANG et al., 2007). Nos últimos anos, essas pequenas moléculas vêm ganhando

atenção devido ao seu papel diversificado na regulação celular (XIE et al., 2015). O primeiro miRNAs foi descoberto em 1993 pelo grupo liderado por Victor Ambros, que mostrou que *lin-4* estava envolvido no controle da progressão temporal da diferenciação celular em *Caenorhabditis elegans (*ARREDONDO-VALDEZ et al., 2016; LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993).

Essas pequenas moléculas são expressas como elementos precursores, que necessitam de um processamento para a sua maturação. O miRNA precursor primário (pri-miRNA) é expresso no núcleo pela RNA polimerase III ou II (CORTEZ et al., 2011) sendo em seguida processado em um miRNA precursor, pré-miRNA, através da enzima Drosha. Os pré-miRNAs são ativamente exportados para o citoplasma pela exportina nuclear 5 e em seguida clivados pela enzima Dicer, juntamente com a proteína de ligação ao RNA de resposta de transativação de cadeia dupla (TRBP), resultando numa pequena estrutura de RNA de cadeia dupla de cerca de 22 nucleotídeos (BARTEL, 2004; CORTEZ et al., 2011). Esta fita dupla de miRNA é incorporada no complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC), que cliva uma das fitas dependentemente do estado fisiológico celular e, em seguida, guia a fita simples de RNA a regiões complementares em moléculas de RNAm alvos (LEE et al., 2009; CORTEZ et al., 2011). A Figura 4 traz uma representação esquemática da biogênese de um miRNA.

Figura 4: Esquema representativo da biogênese do miRNA (BARCA-MAYO; LU, 2012).



Vários estudos apontam que essas pequenas moléculas desempenham papéis importantes em processos biológicos cruciais, tais como o desenvolvimento de órgãos, diferenciação e proliferação celular, apoptose celular e invasão de células cancerígenas (HUANG et al., 2007; WANG et al., 2011). Além do mais, devido à sua capacidade de exercer funções semelhantes aos supressores de tumores ou proteínas oncogênicas, acredita-se que os miRNAs desempenham um papel importante na carcinogênese. Muitos trabalhos têm proposto que os miRNAs podem ser ferramentas úteis para a caracterização de tumores específicos. Em processos cancerígenos, os padrões de expressão de miRNAs poderiam ajudar a identificar o diagnóstico e prognóstico da doença. Alguns estudos têm proposto o miRNA como biomarcador na ocorrência de carcinoma hepatocelular com base em perfis de expressão dos miRNAs a partir de biópsias de tumores sólidos (ARREDONDO-VALDEZ et al., 2016; XIE et al., 2015).

É notório que a interrupção do processo metastático pode ser benéfica para a maioria dos indivíduos portadores do câncer. Particularmente nas patologias hepáticas, diversos estudos apontam o papel de miRNAs no descontrole homeostático. Hao-Xiang et al. (2009), demonstraram que o miRNA-9 possui estreita correlação com metástases

intra-hepáticas. Esse miRNA-9 foi fortemente expresso em célula SK-HEP-1, que são altamente invasivas. Essas observações indicaram adicionalmente que o miRNA-9 poderia estar implicado na metástase de CHC. De mesmo modo, Wong et al., (2015) descreveram que a superexpressão da família de miRNA-200, identificada como um importante regulador da transição epitélio-mesenquimal (TEM), regula negativamente a expressão de repressores de transcrição ZEB1 e ZEB2, levando à expressão da E-caderina, inibindo assim a TEM. Porém, quando ocorre a diminuição da expressão de miRNA-200, há aumento da expressão dos repressores ZEB1/2, diminuindo a expressão de E-caderina, o que acarreta na transição epitélio-mesenquimal. Uma vez que a TEM é um passo crucial na metástase do câncer, os membros da família miR-200 foram considerados como miRNAs supressores de metástase de carcinoma hepatocelular (WONG et al., 2015). Ainda sobre hepatocarcinoma, Fang et al., (2015) analisaram o padrão de expressão de miRNAs em diferentes subtipos de CHC e descobriram que o miR-188-5p é um miRNA associado à doença. De modo essencial, a expressão de miR-188-5p foi significativamente correlacionada com os números nodulares e invasão microvascular. Esses achados implicam que o miR-188-5p pode ser usado como um biomarcador prognóstico para CHC (FANG et al., 2015).

Um miRNA de grande interesse para este trabalho é o miRNA-149-3p. Em Silva et al. (2016), foi demonstrado que em células tumorais pulmonares esse miRNA-149-3p foi apontado como um elemento de destaque no controle dos processos celulares de migração, pelo controle da proteína celular associada a migração e angiogênese (AAMP), o que pode ser considerado promissor no controle metastático, pois evidências sugeriram que a AAMP desempenha um papel na regulação da migração celular de múltiplos tipos de células, tais como células endoteliais (ECs), células musculares lisas vasculares (SMCs), células T ativadas, células de melanoma humano, bem como células de adenocarcinoma do cólon. Além disso, a expressão de AAMP foi significativamente aumentada em tumores estromáticos gastrointestinais ou células de câncer de mama (HU et al, 2016). Entretanto, em outros estudos, o miR-149-3p também demonstrou controlar a progressão de tumores pelo controle da migração (OKATO et al., 2017) através da ativação de mecanismos apoptóticos (SI et al., 2017), e pela via de sinalização de Wnt-1 (CAO et al., 2016). Em Yang et al., (2017) demonstraram que a regulação positiva da expressão de miR-149-3p pode suprimir significativamente a proliferação, invasão e migração *in vitro,* bem como, suprimir o crescimento tumoral em células de câncer de bexiga *in vivo* (YANG et al., 2017). Em alguns tumores, a expressão do miR-149-3p é

baixa e atua como um supressor de tumor inibindo a sinalização mTOR. O miR-149-3p induz apoptose e inibe a proliferação e invasão em células Be2C, HeLa, glioma e CHC (PAN et al., 2012). A baixa expressão do miR-149 está associada com a interação AKT/mTOR em glioma e nos tecidos de CHC, e prevê a agressividade do tumor e o prognóstico desfavorável (ZHANG et al., 2017). No trabalho de Silva et al., (2016) foram investigados 21 alvos de miRNAs que estavam associados à migração celular em células de câncer de pulmão (A549) e o miR-149-3p foi o que apresentou maior expressão (SILVA et al., 2016).

Tendo em vista as doenças hepáticas, cabe avaliar os efeitos do miRNA-149-3p, considerando a existência de alvos putativos e interação a esse miRNA, que se correlacionam diretamente com o metabolismo energético, sustentando, portanto, o processo de migração celular, buscando analisar pontos da via onde ocorre modulação ocasionada por este miRNA; embora o papel do metabolismo lipídico que confere as propriedades agressivas dos tumores malignos ainda permanece obscuro, é preciso identificar elementos centrais no controle desses processos, visando o futuro desenvolvimento de fármacos que auxiliem no manejo de tratamento do câncer, como descrito em CORBET; FERON (2017); LUO et al., (2017); POULOSE, et al., (2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar aspectos celulares e moleculares da atuação do miR-149-3p no processo de migração e adesão em células de carcinoma hepatocelular e sua correlação com o controle do metabolismo de lipídeos, utilizando como linhagens celulares SK-HEP-1 e HEP-G2.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar alterações morfológicas nas culturas celulares transfectadas ou não com o miR-149-3p, focando-se em elementos do citoesqueleto e núcleo celular;
- Avaliar os efeitos fisiológicos do miR-149-3p no processo de migração celular;
- Avaliar a capacidade modulatória do miR-149-3p no metabolismo de lipídeos;

- Avaliar os níveis de expressão da proteína AAMP em células transfectadas ou não com o miR-149-3p;
- Analisar a expressão de principais genes correlatos ao processo de migração e adesão, e os de metabolismo de lipídeos nas células transfectadas ou não com o miR-149-3p, visando a descrição de características funcionais do papel do miRNA em análise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células e transfecção celular

Células das linhagens SK-HEP-1 (American Type Culture Collection, ATCC® HTB-52™) e HEP-G2 (American Type Culture Collection, ATCC® HB-8065™), oriundas de carcinoma hepatocelular, foram crescidas em garrafas de 75 cm^2 com Meio *Minimum Essential Media* (MEM – *Thermo Fisher Scientific Inc.*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% antibiótico Gibco™ Anti-anti (Thermo Fisher Scientific Inc.). As culturas celulares foram mantidas em estufa, a 37°C e atmosfera contendo 5% CO_2 e para os ensaios as culturas foram crescidas até aproximadamente 90 % de confluência.

Para a realização dos ensaios, 4,5 x 10^5 e 4,0 x 10^5 células SK-HEP-1 e HEP-G2, respectivamente, foram semeadas independentemente em garrafas de 75 cm^2. Em intervalos regulares de 24 horas, o meio de cultura de ambas as linhagens foi substituído. As células foram incubadas e crescidas até atingir a confluência de 90%, e em seguida removidas por tripsinização, contadas em câmara de Neubauer e, em seguida, utilizadas nas análises celulares e moleculares.

Para os ensaios de transfecção, 1,0 x10^5 e 2,0 x10^5 células para SK-HEP-1 e HEP-G2, respectivamente foram cultivadas na presença de 10% de SBF em placa de 6 poços. Para realizar a transfecção, inicialmente o miRVana™ Mimics 149-3p foi diluído no meio *Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific)* na concentração de 10 nM a 50 nM, seguido de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, em outro tubo o agente de transfecção, Lipofectamina® RNAiMAX (*Thermo Fisher Scientific*), foi diluído no meio *Opti-MEM*, incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a mistura dos dois tubos (mímico com agente de transfecção), seguida de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a formação do complexo

de transfecção. Em seguida, foi acrescentado 800 μL do meio MEM contendo 10% de SBF. Esta mistura foi adicionada na placa de 6 poços e colocada na estufa a 37°C e 5% de CO_2. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio fresco (MEM contendo 10% de SBF) e a placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO_2. Após novo intervalo de 24 h, as células foram coletadas e os ensaios foram realizados. O mesmo procedimento metodológico foi realizado para os ensaios que utilizaram o miRVana™ Inhibitor 149-3p, porém apenas na concentração de 30 nM, por comparação ao miR-149-3p mímico.

3.2 Ensaios de microscopia de fluorescência

Para as análises de microscopia de fluorescência os diferentes grupos celulares foram cultivados sob lamínulas em placas de 24 poços. Para tal, $1,5 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ de células SK-HEP-1 e HEP-G2, respectivamente, foram cultivadas como descrito em 3.1 até a confluência de 80%. As células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 1,37% contendo Triton X-100 a 0,2%, por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida de 5 minutos em agitação com tampão de fosfato alcalino (PBS – 1X) (68,5 mM de NaCl, 1,35 mM de KCl, 5 mM de Na_2HPO 2,1 mM de KH_2PO_4 e água deionizada). Em seguida, adicionou-se solução de albumina bovina (BSA) a 1% (aproximadamente 200 uL) por duas horas, consequentemente, foram realizadas sucessivas lavagens com PBS 0,5X. Posteriormente, foi realizada marcação com 200 μL de faloidina-TRITC diluída em BSA 0,5% (1% diluído em água) na proporção 1:150, a qual permaneceu na célula por duas horas para visualização dos filamentos de actina. Para análise de núcleo, foi utilizado 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (*Sigma-Aldrich*, USA) na concentração final de de $1,20 \times 10^{-5}$ M diluído em 0.5X de tampão (PBS) (68,5 mM de NaCl, 1,35 mM de KCl, 5 mM de Na2HPO 2,1 mM de KH2PO4 e água deionizada para completar 1 litro) por um intervalo de três minutos ao abrigo de luz. Após a marcação com DAPI, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS 0,5X sob agitação. Em seguida as lamínulas foram montadas na presença de N-propil galato e analisadas em microscópio modelo OLYMPUS BX51.

3.3 Microscopia de campo claro – análise de gotículas lipídicas pela coloração de Oil Red O

Para a análise das gotículas de lipídios nas diferentes condições de cultivo e das moléculas mímicas e inibidoras do miRNA, as células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços, como descrito em 3.1.1. Para coloração por *Oil Red*, as células foram fixadas com formol a 4% (diluído em água), por um intervalo de 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de três lavagens sucessivas das lamínulas em PBS (0,5x). Após as lavagens as células foram coradas em solução de Oil Red® (Sigma-Aldrich), previamente preparada. Para tal, 0,105g do reagente foi pesado e diluído em propilenoglicol 100% (0,17 mM de *oil red* Merck + 15 mL de propilenoglicol), a solução foi aquecida a 100°C por 5 minutos. Em seguida foi acrescentado propilenoglicol 100% (Merk) por 5 minutos, por duas vezes e, depois de retirado, em seguida foi adicionada a solução de *oil red* (Sigma-Aldrich) e mantida por 7 minutos em agitação. Em seguida, o material foi novamente incubado em propilenoglicol 85% V/V por 3 minutos e lavado com água destilada. Por último, foi adicionada hematoxilina de Harris (3 mM de hematoxilina + 20 mM de alúmen de potássio + 2 mM de óxido de mercúrio) por 1 minuto o qual foi removida e lavada com água corrente. As lâminas foram montadas com auxílio de gelatina glicerinada e analisadas em microscópio óptico utilizando-se contraste de fase com o microscópio OLYMPUS BX51. Em seguida, as análises quantitativas foram realizadas utilizando o programa *ImageJ*, acrescido do *plugin "Colour Deconvolution"*.

3.4 Análise da migração celular: os ensaios de *wound healing* (ensaio da ferida) e da migração em gota de agarose

Para os ensaios de cicatrização da ferida, 1,0 x10^5 e 2,0 x10^5 de células SK-HEP-1 e HEP-G2 foram semeadas, respectivamente em placas de 6 poços e crescidas em condições usuais (item 3.1). As células foram ou não transfectadas com miR-149-3p mímico ou miR-149-3p inibidor, utilizando-se as condições descritas no item 3.1, foram semeadas com 1 mL de meio de cultura, seguido de incubação por 24 horas. A troca do meio de cultura foi realizada em intervalos regulares de 24 horas, assim, até se obter a confluência de 80%. Ao atingir a confluência foram feitos riscos longitudinais, com auxílio de uma ponteira de 200 μL, na monocamada de células aderente ao fundo dos

poços, simulando uma lesão. Com o auxílio de uma câmera digital acoplada à objetiva do microscópio, cada poço foi fotografado no momento da lesão (T=0 horas) e 24 horas depois. As placas foram analisadas no microscópio binocular invertido *Motic AE2000*® (Motic). Para as análises quantitativas dos resultados, foi utilizado o *software ImageJ 1.48v* (NIH – http://imagej.nih.gov/ij). Para cada condição investigadas um grupo de 100 células foram avaliadas e foram mensuradas o crescimento/ migração celular por medida indireta, considerando-se a ausência de células na área ferida.

Para os ensaios de invasão celular, adaptou-se a técnica descrita por Wiggins; Rappoport (2010), denominada *Agarose Spot Assay* ou Ensaio da Gota de Agarose, que viabiliza a análise direta da migração celular. Para a realização desse ensaio, em ambiente estéril, foi preparada uma solução de agarose a 0,8% em PBS 1 x, por aquecimento a 100° C e agitação contínua até completa dissolução da agarose. Feito isso, a solução foi resfriada a temperatura de 40° C e aliquotada em 2 microtubos de 1,5 mL. As alíquotas foram diluídas na proporção 1:1, com PBS 1 x e meio MEM 20% SBF para a formação das soluções do controle negativo, e do controle positivo, respectivamente. Um total de seis gotas de 15 µL das soluções de controle negativo e positivo (três gotas de cada solução) foram pipetadas nos poços de placas de 6 poços, previamente preparadas com uma solução de Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich®) 0,1% em água, por 20 min, e em seguida por 12 horas secando.

Após a polimerização das gotas de agarose a 4° C por 10 min, 1,0 x 10^5 células de SK-HEP-1 e 2,0 x 10^5 células de HEP-G2, crescidas em meio contendo 10%, SBF transfectadas ou não com as moléculas miméticas ou inibidoras do miR-149-3p, foram semeadas com 1 mL de meio de cultura nas placas contendo as gotas de agarose. As imagens foram adquiridas nos intervalos de 0 e 24 horas com o auxílio de uma câmera digital acoplada à objetiva do microscópio binocular invertido *Motic AE2000*® (Motic). Seguindo as recomendações especificadas em Wiggins; Rappoport (2010), a região da gota de agarose apresentando a maior quantidade de células invasoras, foram contadas manualmente em triplicatas e realizadas as análises quantitativas, sendo a região com maior quantidade de células equivalente a 100% e as com menor número de células equivalente a essa porcentagem.

3.5 Extração de RNA total, miRNA, e transcrição reversa

3.5.1 Extração de RNA total

Após o crescimento das células SK-HEP-1 e HEP-G2 nas culturas transfectadas ou não com as moléculas miméticas ou inibidoras do miR-149-3p, e das respectivas culturas utilizadas como controle experimental, o RNA das amostras foi coletado adaptando-se as condições descritas no manual do fornecedor do *TRIZOL® Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Para a extração, as células foram coletadas ($6{,}0x10^5$) e ressuspendidas em 500 uL de *TRIZOL®* seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Para 500 uL de *TRIZOL®*, foram adicionados 100 uL de clorofórmio (Merck) seguido de agitação vigorosa do microtubo por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 G por 15 minutos a 4ºC, resultando em uma mistura trifásica, da qual o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Ao sobrenadante adicionou-se 250 uL de álcool isopropílico (100%), seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e então, a amostra foi centrifugada a 10.000 G por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de RNA foi lavado com 500 uL de etanol 80%. Os microtubos foram cuidadosamente invertidos 3 vezes seguido de centrifugação a 7500 G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, para que o precipitado pudesse ficar seco, os microtubos foram deixados abertos por no máximo 10 minutos dentro da capela. Esse precipitado de RNA foi ressuspendido em 25 µL de água livre de RNAse e quantificado. As amostras de RNA foram analisadas com o auxílio do aparelho espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare), utilizando-se a razão A260/A280 e A260/A230 para se avaliar a qualidade do RNA extraído.

3.5.2 Extração de miRNA

Para a análise da expressão de miRNAs, os mesmos foram extraídos das células SK-HEP-1 e HEP-G2 nas culturas transfectadas ou não com as moléculas miméticas ou inibidoras do miR-149-3p, e das respectivas culturas utilizadas como controle experimental, utilizando-se o *miRNAse mini kit* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, as células foram ressuspendidas em 700 µL de *QIAzol Lysis*

Reagent e incubadas a temperatura ambiente durante 5 min. Logo após foram adicionados 140 µL de clorofórmio a cada amostra e a mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 3 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 G, por 15 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos microtubos de 1,5 mL e a eles foram adicionados 1,5 x v/v de etanol. As amostras foram então transferidas para as mini colunas (*RNeasy® Mini Column* - Qiagen®) e em sequência foram centrifugadas a 8.000 G, por 15 segundos à temperatura ambiente. Descartaram-se os filtrados. Em seguida, foram adicionados 700 µL de tampão RWT (Qiagen®) em cada uma das colunas, com posterior centrifugação a 8.000 G, por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e foram adicionados 500 µL de tampão RPE (Qiagen®) às colunas, seguido de nova centrifugação a 8.000 G por 15 segundos à temperatura ambiente. Novamente, os filtrados foram descartados e outros 500 µL de tampão RPE (Qiagen®) foram adicionados às colunas, com posterior centrifugação a 8.000 G por 2 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte dos filtrados, as colunas foram colocadas em novos microtubos de 1,5 mL, com posterior centrifugação a 8.000 G por 1 minuto à temperatura ambiente. As colunas foram então transferidas para microtubos de 1,5 ml e foram adicionados 50 µL de água livre de RNAse diretamente sobre as membranas das colunas, com posterior centrifugação à temperatura ambiente por 1 min a 8.000 G. Os filtrados foram quantificados no espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare) a 260 nm, utilizando a razão A260/A280 e A260/A230.

3.5.3 Transcrição reversa: RNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído dos grupos celulares, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As reações de transcrição reversa foram realizadas com 200 ng do RNA extraído, 10 µM de oligonucleotídeos (10 x RT *Random primer*), 8 mM de dNTPs [25 x dNTP *Mix*] e 1,25 U de transcriptase reversa (*Multi Script*TM *Reverse Transcriptase*) conforme especificado pelo fabricante. Com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S®* (Eppendorf), as reações foram incubadas a 25°C por um intervalo de 10 minutos, seguido de incubação a 37°C por 120 minutos e inativação enzimática a 85°C por 5 minutos, conforme as orientações do fornecedor. O excedente da amostra de

RNA total extraído foi armazenado a -80°C, enquanto que o cDNA sintetizado foi diluído (1:10) e estocado a -20°C até sua utilização.

3.5.4 Transcrição reversa: miRNA

A síntese de cDNA a partir das amostras de RNAs totais extraídos, enriquecidas com miRNAs, foi realizada por reações de transcrição reversa utilizando o *Miscript II RT Kit* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para essas reações, 2 µg de RNA total enriquecidos com miRNAs foram utilizadas além de 20 mM de tampão (5 x *miScript HiSpec Buffer*), 10 mM de oligonucleotídeos (10 x *miScript Nucleics Mix*), 10 mM da enzima transcriptase reversa (*miScript Reverse Transcriptase Mix*), água livre de RNAses em quantidade suficiente para um volume final de 20 µL. Com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S*® (Eppendorf), a mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguido de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos para inativação da transcriptase reversa, seguindo as informações do fornecedor dos reagentes. O excedente da amostra de RNA total extraído foi armazenado a -80°C, enquanto que o cDNA sintetizado foi diluído (1:10) e estocado a -20°C até sua utilização.

3.6 Análise de expressão gênica por reações de PCR convencional (RT-PCR semiquantitativa) e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

3.6.1 Reações de PCR convencional (RT-PCR semiquantitativa)

Para as reações de PCR convencional, as sequências codificadoras de genes correlatos ao processo de migração e adesão celular foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 1) com o auxílio de ferramentas básicas de bioinformáticas como software Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) e Blast (www.ncbi.lm.nih.gov/Blast).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional e suas respectivas temperaturas de anelamento (Tm).

Gene	**Sequência**	**Tm (°C)**	**Tamanho do *Amplicón* (pb)**
β-actina	**S:** TCGTGCGTGACATTAAGG	55	359
	AS: GATCTTCATTGTGCTGGGTG		
mmp2	**S:** GACCCAGAGACAGTGGATGA	49	340
	AS: CAGTGCAGCTGTTGTACTCC		
mmp9	**S:** CCAGTTTCCATTCATCTTCC	45	287
	AS: TCTTGTCGCTGTCAAAGTTC		
timp1	**S:** GTTGTTGCTGTGGCTGATAG	48	324
	AS: GTGATGTGCAAGAGTCCATC		
timp2	**S:** TCAGTGAGAAGGAGGTGGAC	47	301
	AS: ATCTGGTACCTGTGGTTCAG		
smad2	**S:** CAAATTCAGAGAGGTTCTGC	47	286
	AS:CCCTGATTAACAGACTGAGC		
smad3	**S:** CTTTGAGGCTGTCTACCAGT	44	294
	AS:TGACAACAATGGGTTGAGTA		
smad4	**S:** TCACCTGGAATTGATCTCTC	45	313
	AS: ATGCTATCTGCAACAGTCCT		
smad7	**S:** AGCCCTCTCTGGATATCTTC	49	286
	AS: CTGTACGCCTTCTCGTAGTC		

Após a síntese de cDNA, reações de PCR foram processadas em um volume final de 15 µl, utilizando 2 µl do cDNA (1:10), 10 µM de oligonucleotídeos direto e reverso, 1,5 mM de $MgCl_2$, solução tampão para PCR (1 X), 250 µM de dNTP e 1,25 U da enzima *Taq DNA polimerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As reações foram processadas em triplicatas. As reações foram realizadas com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S*® (Eppendorf) e então submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,9%. Para a quantificação dos resultados foi utilizado o *software ImageJ 1.48v* (NIH – http://imagej.nih.gov/ij), levando em consideração a intensidade de sinal por unidade de área.

3.6.2 Reações de qPCR: mRNAs

Para as reações de qPCR, as sequências codificadoras dos genes de interesse foram obtidas do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 2) com o auxílio de ferramentas básicas de bioinformáticas como software Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) e Blast (www.ncbi.lm.nih.gov/Blast).

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR.

Gene	Sequência
β-actina	**S:** CGGGACCTGACTGA CTAC
	AS: CTCCTTAATGTCACG CAC
aamp	**S:** GCAAUAACACAAUUGUCAGGAC
	AS: GCCCTCCCACCCTTGACCAGAC
tgfβ1	**S:** GACTCGCCAGAGTG GTTATC
	AS: GGAGCTGAAGCAAT AGTTGG
Ocludina	**S:** AAAGAACTCTCCCGTTTGGA
	AS: GCAGATCCCTTCACTTGCTT
tjp1	**S:** GAACGAGGCATCATCCCTAA
	AS: GCTGCGAAGACCTCTGAATC
ppar-γ	**S:** GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC
	AS: ACTCAAACTTGGGCTCCATAAAG
srebp1	**S:** CCCTGTAACGACCACTGTGA
	AS: TTCATGGCTGTCAGAAGCAG
ppar-α	**S:** GGCCTCAGGCTATCATTACG
	AS: ACCAGCTTGAGTCGAATCGT
elovl1	**S:** CATGCTTTCCAA
	AS: GGTCATTGAGCTG
elovl7	**S:** TAGCCAAGTGACTTTCCTTC

	AS: CTGTATTTAGAAGGGCATGG
vimentina	**S:** GCTCAGATTCAGGAACAGCA
	AS: TTCCAGGGACTCATTGGTTC
E-cadherina	**S:** ACACTTCTGCTGATCCTGTC
	AS: TTCTGGTTATCCATGAGCTT
N-cadherina	**S:** CACAGATTCGGGTAATCCTC
	AS: CTTCTCCTCCACCTTCTTCA

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se *SYBR Green/ Rox qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.) e placas de 96 poços vedadas com o selo óptico (*MicroAmp® Optical Adhesive Film* - Thermo Fisher Scientific Inc.). Cada reação foi processada em um volume final de 5 μL, em cada qual contendo 1,5 μL de oligonucleotídeos, 1 μL de cDNA (1:10) e 2,5 μL de *SYBR® Green PCR Master Mix*. As reações foram processadas em triplicatas.

As reações foram realizadas no ciclador *7500 Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific Inc.) em triplicatas. O método de quantificação relativa da expressão gênica (ΔCT) foi utilizado, permitindo quantificar diferenças nos níveis de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras.

3.6.3 Reações de qPCR: microRNAs

Os oligonucleotídeos (Tabela 3) utilizados para análise de expressão dos miRNAs de interesse foram desenhados com o auxílio de ferramentas básicas de bioinformáticas, como software Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) e Blast (www.ncbi.lm.nih.gov/Blast), a partir de suas respectivas sequências maduras disponíveis nos bancos de dados mirDB (http://mirdb.org/miRDB/), MiRBase (http://www.mirbase.org/) e NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR de miRNAs envolvidos no processo de hepatocarcinoma.

microRNA	Sequência
hsa-miR-149-3p	**S:** AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC

As reações de qPCR foram realizadas com o *miScript SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen®). O cálculo da expressão gênica relativa dos miRNAs foi realizado pelo método do ΔCT, conforme sugerido pelo fabricante do aparelho *7500 Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.7 Western blot

Células SK-HEP-1 e HEP-G2, nas culturas transfectadas ou não com as moléculas miméticas ou inibidoras do miR-149-3p, e das respectivas culturas utilizadas como controle experimental foram cultivadas em garrafas de 25 cm^2 até aproximadamente 90% de confluência e em seguida foram coletadas para os ensaios. Lisados celulares foram preparados pela ressuspensão dos precipitados celulares recolhidos das culturas com solução de lise (Triton x-100 0,5%, Tris HCl pH 7,2 [10 mM], NaCl [100 mM], MgCl2 [2,5 mM], DTT [0,5 mM], PMSF [1 mM], seguido de incubação a 4 ºC por 30 minutos. Os lisados foram sonicados (sonicador Sonics Vibra Cell VCX130 *VIBRA CELL®*), em 40% de amplitude por quarenta segundos, para que as moléculas se quebrem, as células se rompam e as proteínas sejam liberadas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos sob refrigeração de 4 ºC. O sobrenadante foi recolhido e as proteínas quantificadas em espectrofotômetro (595 nm) seguindo o protocolo descrito por Bradford, 1976. Para construção da curva padrão, foi utilizada a concentração padrão de albumina sérica bovina (BSA) a 500 ng/ µL em diversas diluições. 100 µg de proteína juntamente com 4% (v/v) SDS e 5% de β-mercaptoetanol na proporção 1:1, foram utilizadas nas análises. Cada uma das amostras foi desnaturada a 95ºC por 5 minutos, e em seguida estas foram submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida a 10%. A eletroforese ocorreu a 200 V e 50 mA durante aproximadamente 40 minutos para separação das proteínas contidas nos extratos celulares. Após a corrida

eletroforética os géis foram preparados para a transferência das proteínas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Os géis foram submersos em solução de transferência (25 mM Tris-HCl, 0,192 M de glicina, 10% metanol) por 10 minutos e as transferências foram realizadas por 20 minutos a uma corrente elétrica fixa de 18v pelo aparelho transferidor do tipo Semi-Dry (*Uniscience*). Após o término da transferência as membranas foram bloqueadas em Blotto [5% de Leite em pó desnatado contendo TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6) por 4 horas. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T (1M Tris-HCl pH 7.6, 5 M NaCl, 1% Tween 20) durante 7 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos policlonais primário anti-AAMP (ABCAM, EUA) 52 kDa e anti-β-actina (*Cell Signaling*, EUA) 42 kDa, produzidos em coelho. As incubações foram realizadas em um intervalo de 24 horas sob agitação constante a 4ºC. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes consecutivas por 5 minutos com TBS-T para retirar os anticorpos que não se ligaram à membrana e, então, incubadas com o anticorpo secundário (Cayman Chemical). As membranas foram incubadas com esses anticorpos por um intervalo de 4 h sob agitação a temperatura ambiente. Realizadas as incubações, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos para retirada dos anticorpos secundários não ligados e em seguida reveladas. A detecção de sinais foi realizada com o *Western Blotting Luminol Reagent* (GE) de acordo com as especificações do fornecedor. Após a revelação e secagem dos filmes, as bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do software Quantity One®, Biorad) onde a densidade ótica de cada banda foi aferida.

3.8 Esterificação de ácidos graxos, identificação e quantificação via GC/MS

Para a obtenção de ácidos graxos (AGs), previamente todo material plástico (ponteiras, microtubos de 1,5 mL e caixas de ponteiras) foi tratado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2%. Para a realização das análises, as células SK-HEP-1 e HEP-G2 foram cultivadas em placas de 6 poços como descrito no item 3.1. Após remoção das células por tripsinização, estas foram lavadas com tampão fosfato-salino e lisadas na presença de metanol para início das reações de transesterificação. Para a completa remoção dos ácidos graxos nas amostras o catalisador hidróxido de potássio foi adicionado e aquecido a 60 ºC para completa saponificação das amostras. Após o

resfriamento das amostras, à elas foram acrescidos ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 7M para esterificação dos AGs. As amostras foram submetidas à evaporação e no final do processo eluidas com hexanos para análise em cromatografia gasosa (CG) utilizando-se um cromatógrafo a gás GC-210 (Shimadzu Scientific Instruments, Japão) equipado com uma coluna capilar RTX MS (30 m × 0,25 mm DI, 0,25 µm de espessura), acoplado a um detector seletivo de massa (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus). O cromatógrafo a gás foi conectado a um computador e os dados foram processados usando o software GCMS solution versão 2.5. A eluição foi realizada com hélio a 1 mL/min. As amostras foram injetadas usando o modo sem divisão (temperatura da porta: 250 °C) e mantidas por 1 min. A temperatura da coluna foi ajustada para iniciar a 160 °C durante 5 min, aumentar para 200 °C a 5 °C/min, permanecer a 200°C durante 3 min, aumentar para 280°C a 8°C/min, e permanecer a 280°C durante 6 min. O espectrômetro de massa foi operado no modo de ionização de elétrons a 70 eV, com uma faixa de varredura de 40 a 500 m/z. Para a identificação e quantificação da amostra, foi obtida uma curva de calibração utilizando padrões de ácidos graxos (ácido láurico, mirístico, palmítico, linoleico, oleico, esteárico, erúcico e araquidônico) da Sigma-Aldrich nas seguintes concentrações: 0,5, 1, 2, 3 e 5 ppm.

3.9 Análise de bioinformática

As análises de interesse para o presente estudo foram realizadas por bioinformática, utilizando-se informações disponíveis em banco de dados como mirDB (http://mirdb.org/miRDB/), MiRBase (http://www.mirbase.org/) e Target Scan (http://www.targetscan.org/). As sequências maduras dos miRNAs e os oligonucleotídeos dos genes de interesse foram analisados e desenhadas em ferramentas básicas de bioinformáticas como o Blast (www.ncbi.lm.nih.gov/Blast) e o Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi), respectivamente.

3.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados com o auxílio do programa *Graph Pad Prism® 5.0 software*, através do teste *One Way ANOVA* seguido de análise

de *Dunnett*, e do teste *Two-Way* ANOVA. O nível de significância adotado foi de *p≤0,05 com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se o objetivo principal deste trabalho, duas linhagens hepáticas tumorais foram investigadas. A linhagem SK-HEP-1 foi escolhida por apresentar alta capacidade de metástase (EUN et al., 2014; HEFFELFINGER et al., 1992; e JHOU, 2017), o que a torna um bom modelo de estudo do processo de migração e adesão celular. A linhagem humana SK-HEP-1 foi derivada do fluido ascítico de um paciente com adenocarcinoma de fígado em 1971.

A segunda linhagem utilizada nos estudos foi a HEP-G2, linhagem derivada do tecido hepático de um homem de 15 anos de idade, com carcinoma hepatocelular bem diferenciado (DONATO et al., 2015). A morfologia das células HEP-G2 é epitelial e têm sido amplamente utilizadas para avaliar os efeitos tóxicos de uma ampla variedade de produtos químicos e drogas, devido a sua potencial capacidade em metabolizar compostos químicos e orgânicos. Além disso, é a linhagem celular mais estudada devido às vantagens da disponibilidade e secreção de proteínas humanas (BUSUTTIL; KLINTMALM, 2014; FAQI, 2012) embora não apresente alta capacidade migratória comparada a SK-HEP-1 (HSIEH et al., 2012).

Diante disso, as análises iniciais foram realizadas com células da linhagem SK-HEP-1, seguido das análises comparativas com as células HEP-G2.

4.1 CAPITULO I – LINHAGEM CELULAR SK-HEP-1

4.1.1 Análises iniciais: os efeitos moleculares do miRNA-149-3p na proteína AAMP

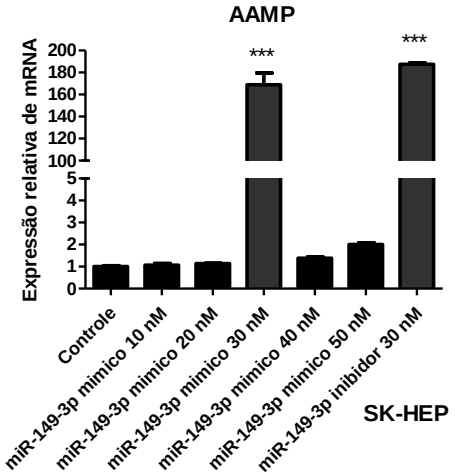
Para avaliar o efeito do miR-149-3p nas células SK-HEP-1, considerando-se as análises preliminares do nosso grupo de pesquisa que demonstraram a interação física entre esse miRNA e a proteína *AAMP* em linhagens celulares pulmonares (SILVA et al., 2016), os níveis de expressão do RNAm *AAMP* foram avaliados nos diferentes grupos celulares investigados. Os respectivos controles experimentais dos efeitos da

lipofectamina RNAiMAX também foram realizados. Considerando-se que não demonstraram alterações significativas em relação ao controle experimental (culturas crescidas sob condições regulares), os resultados obtidos para esse grupo experimental não são apresentados nas Figuras a seguir. A Figura 5 apresenta os resultados, das diferentes concentrações do miR-149-3p na modulação da expressão do gene *AAMP* nas células em análise. Resultados significativos são observados quando da transfecção celular com 30 nM do miR-149-3p mímico; e essa concentração foi escolhida para as futuras análises celulares e moleculares. A concentração de 30 nM do miR-149-3p inibidor foi também escolhida, baseando-se nos efeitos dessa concentração de molécula inibidora na inativação dos miRNAs circulantes pela complementariedade de bases entre o miR-149-3p endógeno e a molécula artificial.

Complementado as análises e baseado o efeito dos miRNAs-149-3p mímico e inibidor nas células SK-HEP-1, os níveis do RNAm de AAMP também foram avaliados para as células transfectadas com o miR-inibidor (Figura 5). Níveis transcricionais de *AAMP* semelhantes aos níveis encontrados nas culturas transfectadas com a molécula mimetizadora foram observadas nas culturas transfectadas com a molécula inibidora.

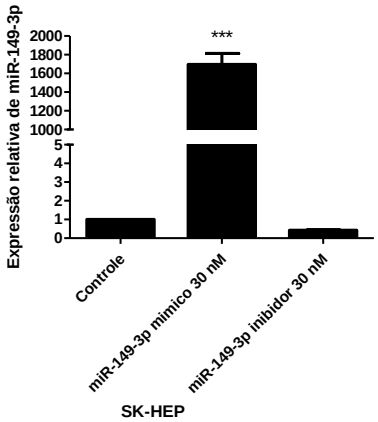
Considerando-se os resultados obtidos e a capacidade da interação física entre o RNAm AAMP e o miR-149-3p, que desencadeia mecanismos de RNA de interferência (RNAi), uma vez que o duplex de RNA formados desencadeia mecanismos de degradação das mesmas (CHRISTOPHER et al., 2016; JONAS; IZAURRALDE, 2015), análises de *Western blot* reforçaram e se tornaram necessárias para se avaliar esse mecanismo molecular na célula hepática.

Figura 5: Níveis de expressão relativa do RNAm AAMP em SK-HEP-1 crescidas em 10% de SBF. As diferentes culturas foram transfectadas independentemente, com diferentes concentrações dos hsa-miR-149-3p com diferentes concentrações dos hsa-miR-149-3p mímico (10 nM a 50 nM) ou do inibidor (30nM). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real e os resultados normalizados com o gene β-actina. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde ***p<0,0005, utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



No entanto, na Figura 6 observa-se o nível de expressão do miR-149-3p mímico e inibidor nas culturas celulares, apresentando aumento do miR-149-3p mímico ao mimetizar a molécula endógena e diminuição da expressão ao inibir o miR-149-3p, confirmando a expressão do miR-149-3p de acordo com a transfecção.

Figura 6: Nível de expressão relativa do miRNA hsa-miR-149-3p em células SK-HEP-1 crescidas até a confluência, na ausência (Controle) e presença do miR-149-3p mímico e inibidor. A expressão gênica relativa apresentada nos gráficos foi normalizada em relação ao gene *U6*. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. ***$p \leq 0.01$.

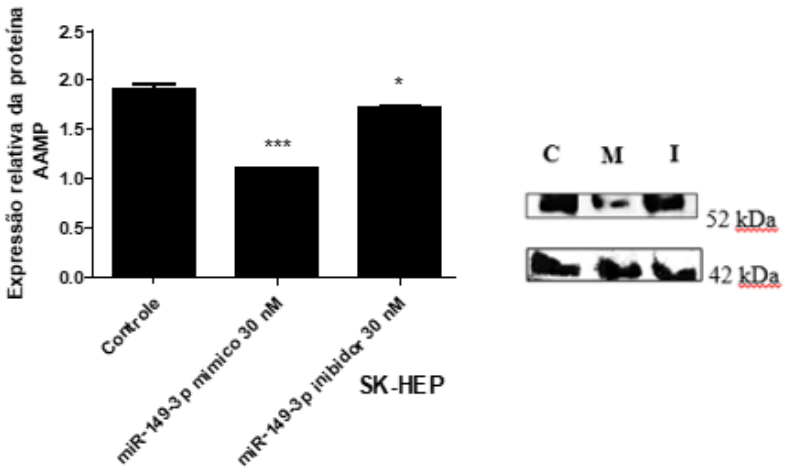


4.1.2 Análise da expressão de proteína AAMP

Para se avaliar possíveis mecanismos de RNAi mediado pelo miR-149-3p nas células hepáticas SK-HEP-1 e para se avaliar a atuação funcional da proteína celular associada a migração e angiogênese (AAMP), análise de *Western blot* foram realizados. A proteína AAMP foi inicialmente identificada em uma linhagem de melanoma humano e se correlaciona com a motilidade celular (BECKNER et al., 1995). Esta proteína é altamente expressa em diferentes tipos de células endoteliais, musculares, células de melanoma humano e células de carcinoma da próstata e da mama. Análises prévias demonstraram altos níveis de expressão da proteína AAMP em tumores gastrointestinais invasivos e no carcinoma ductal da mama com necrose, sendo considerada um marcador de mau prognóstico (YIN et al., 2013). A Figura 7 apresenta resultados das análises de *Western blot* realizadas bem como as respectivas quantificações relativas das proteínas, utilizando-se a proteína β-actina como de referência endógena. Comparativamente aos níveis de expressão de AAMP na condição controle. A análise dos resultados demonstra redução de aproximadamente 50% nos níveis dessa proteína, quando da transfecção com o miR-149-3p mímico. Por outro lado, a presença da molécula inibidora não induz redução significativa nos níveis de AAMP, quando da comparação com a condição controle experimental. A análise conjunta desses resultados, somado às análises dos níveis transcricionais de AAMP observadas na Figura 5, aponta fortemente a existência de mecanismos de RNA de interferência (RNAi) mediada pela interação miRNA-149-3p–RNAm AAMP, como observada em Silva et al., (2016). Essa observação é respaldada pelos altos níveis transcricionais de AAMP encontrados e a baixíssima expressão proteica, sugerindo fortemente a degradação do RNAm O mecanismo de RNAi é um mecanismo celular endógeno que atua no controle da expressão gênica, onde pequenos RNAs de interferência (siRNAs) ligados ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC) medeiam a clivagem e degradação do RNA mensageiro (RNAm) alvo através de um processo catalítico envolvendo endonucleases (TABERNERO et al., 2013). Os resultados mostrados na Figura 7 sugerem esse mecanismo. Por outro lado, nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor, esta molécula possui sequência complementar ao miR-149-3p endógeno. Dessa maneira a complementaridade do miR-149-3p inibidor com o miR-149-3p endógeno desencadeia o sequestro das moléculas endógenas do miRNA, o que reduz a sua atuação funcional no bloqueio da tradução ou a degradação da fita de RNAm, por isso, somente uma leve alteração nos níveis de AAMP são observadas

nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico, uma vez que, a transfecção modula a homeostase celular, sem, entretanto, aumentar os níveis traducionais.

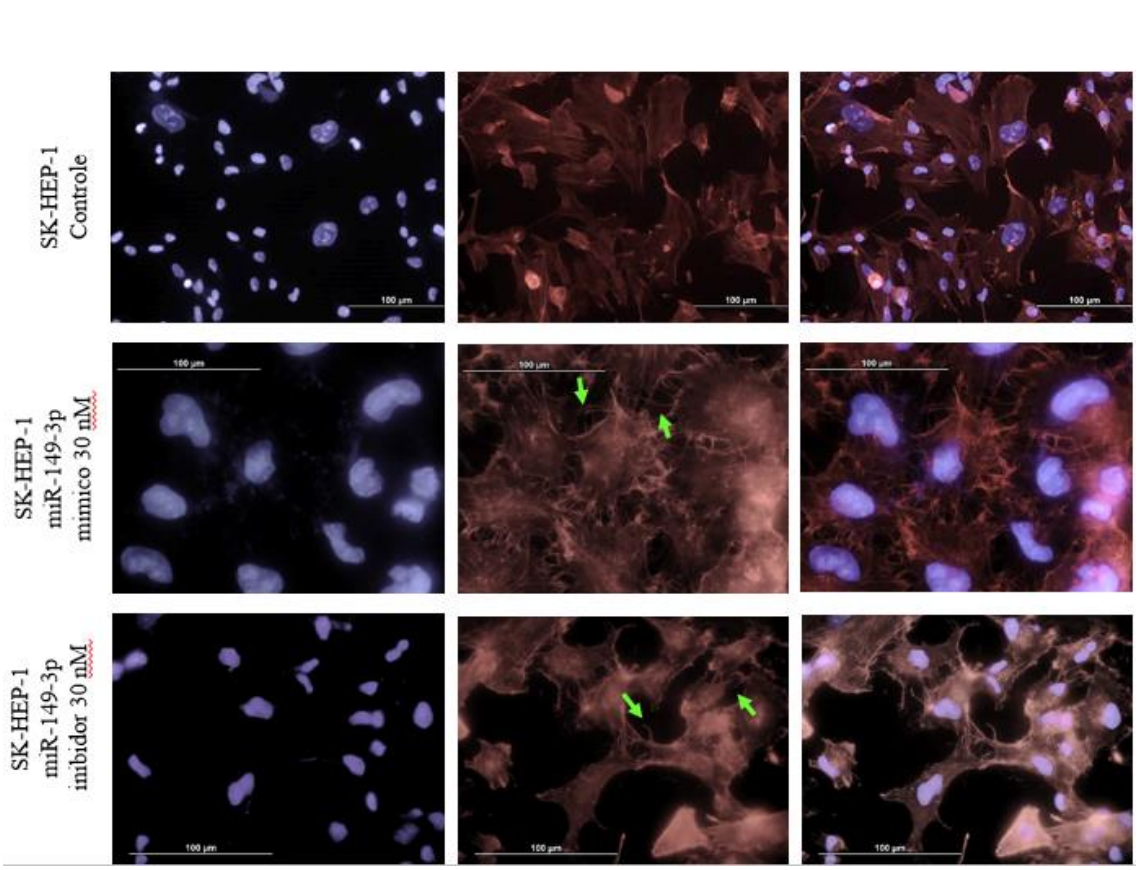
Figura 7: Análise dos níveis proteicos de AAMP (52 kDa) e β-actina (42 kDa) por *western blot* nas condições estudadas. As bandas estão representas como Controle **(C),** miR-149-3p mímico 30 nM **(M)** e miR-149-3p inibidor 30 nM **(I)**. Os gráficos foram construídos utilizando-se o *software Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando-se ANOVA. *p<0,05, ***p<0.001.



4.1.3 Ensaio de microscopia de fluorescência

Para se observar diferenças morfológicas no núcleo e no citoesqueleto celular, análises de microscopia de fluorescência foram realizadas. A Figura 8 apresenta alterações na morfologia celular nas células transfectadas pelo mímico e/ou pelo inibidor, quando comparado ao controle. É possível observar um aumento no tamanho celular ao transfectá-las com a molécula mimetizadora do miR-149-3p, e também a modificação do citoesqueleto, deixando visível a formação de inúmeros filopódios (indicados pelas setas). Essas alterações sugerem uma maior adesão intracelular e entre células e substrato. No tratamento com o inibidor do miR-149-3p, diferentemente do mímico, há modificações consideráveis na estrutura dos filopódios, causando um espaçamento entre as células, supondo perda de sua aderência ao substrato e da adesão célula-célula, possivelmente facilitando a migração celular.

Figura 8: Microscopia de florescência de células SK-HEP-1. Diferentes tratamentos celulares com SK-HEP-1 foram cultivados em lamínulas e depois corados com faloidina-TRITC (filamentos de actina) e DAPI (núcleos) para investigar alterações morfológicas em grupos celulares. As setas apontam os filopódios.

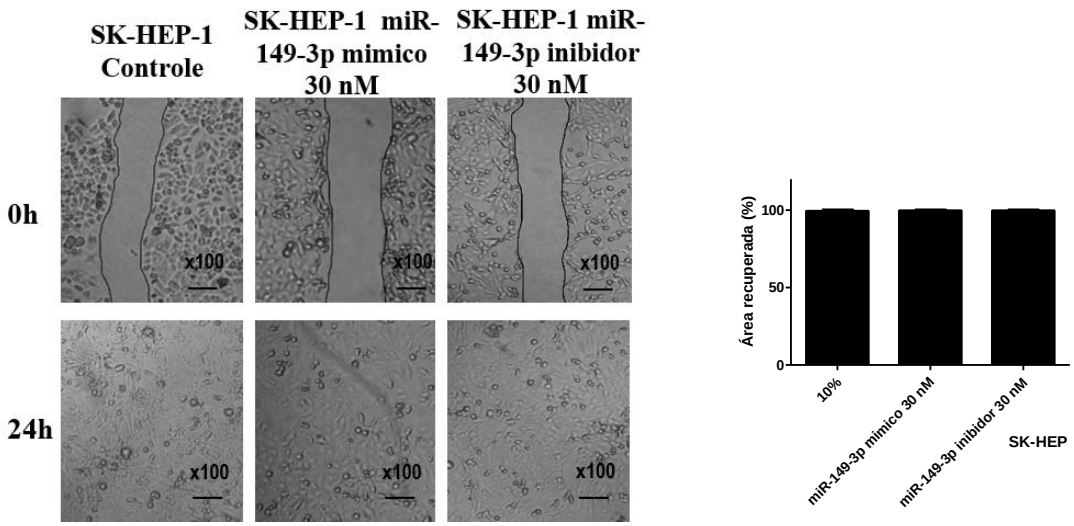


4.1.4 Ensaio de migração celular – ensaio da ferida (*wound healing*)

Considerando-se as alterações morfológicas apresentadas (ítem **4.1.3)**, o ensaio da ferida (*wound healing*) foi realizado para se avaliar os efeitos fisiológicos das transfecções nas linhagens celulares na proliferação celular e/ ou migração. A Figura 9 apresenta os resultados obtidos nos ensaios da ferida em SK-HEP-1 bem como sua quantificação. Pela análise dos resultados, observa-se que depois de 24 horas a ferida se fecha por completo em todas as condições de trabalho, inclusive no controle. Considerando-se que essa linhagem celular possui alta capacidade metastática (JHOU, 2017), todas as injúrias fecharam em 24h, independentemente da presença das moléculas

miméticas ou inibidoras do miRNA-149-3p, comprovando seu potencial proliferativo e invasivo (HAO-XIANG et al., 2010). No entanto, é importante ressaltar que este ensaio avalia os efeitos de proliferação celular e migração. Por fim, embora ocorram alterações morfológicas na SK-HEP-1, seja no citoesqueleto ou no núcleo (Figura 8), para este ensaio não houve nada que interferisse na sua replicação e/ou migração.

Figura 9: Ensaio da ferida (*wound healing*) em células SK-HEP-1 transfectadas ou não com o miR-149-3p. Diferentes grupos de células SK-HEP-1 foram cultivadas em placas de 6 poços. Sob confluência, a migração celular foi examinada por meio de um ensaio de cicatrização de feridas. As imagens são de microscopia (x100). O gráfico mostra a quantificação da recuperação das áreas lesionadas após um período de 24 horas.

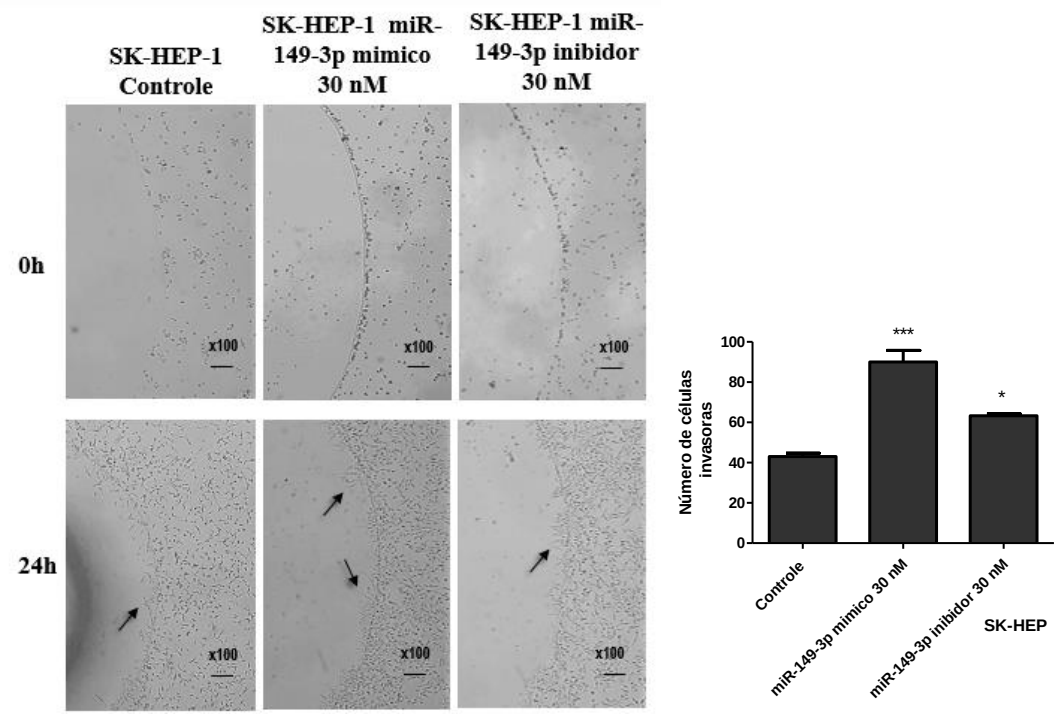


4.1.5 Ensaio de invasão celular

Para se complementar as análises dos ensaios da ferida (4.1.4) foram realizados ensaios para se avaliar o potencial invasivo das células SK-HEP-1 em cada um dos grupos estudados. Para tanto, adaptou-se a metodologia descrita por Wiggins; Rappoport (2010), a qual permite a análise do potencial invasivo/ migratório celular sobre superfícies planas. Em nossas análises, gotas de agarose preparadas com ou sem concentrações de SBF foram utilizadas, atuando como um elemento estimulador de quimiotaxia (AHMED et al., 2017). Os resultados são apresentados na Figura 10 e demonstram a invasão/ migração das células nas gotas contendo SBF em todas as condições de trabalho, após um intervalo de 24 horas da semeadura, principalmente a transfecção com o miR-149-3p mímico,

apresentou a maior diferença estatística em relação ao controle, efeito esse potencializado pelo miR-149-3p, o que sugere a capacidade de modulação fisiológica do miR-149-3p como agente promotor ou facilitador da migração pela modulação da homeostase celular.

Figura 10 - Ensaio de Invasão Celular. Análise do potencial invasivo de células SK-HEP-1 dos grupos controle e transfectados com o miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, através do ensaio de gota de agarose. Imagens de microscopia (x100) das células SK-HEP-1 migrando por debaixo das gotas de agarose diluídas em MEM 10% SFB; as imagens foram adquiridas nos períodos de 0 e 24 horas. As setas apontam para um grupo de células invasoras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *Two-Way* ANOVA. *p≤0.05 e ***p≤0.001.



4.1.6 Expressão de genes correlatos ao processo de adesão/ migração celular

Para se avaliar particularidades do processo de adesão e migração celular foram realizadas análises de qPCR e RT-PCR para genes de interesse correlatos ao processo de degradação da matriz extracelular (Figura 11) e às interações célula-célula e célula-matriz (Figura 12 e 13). Esses genes modulam os processos de migração celular, angiogênese, invasão celular e metástase.

A matriz extracelular (MEC) é formada por macromoléculas importantes como, colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (BONNANS, et al., 2014), que criam um ambiente propício para o desenvolvimento e morfogênese celular. Componentes da MEC interagem constantemente com células epiteliais, servindo como ligantes para receptores

celulares, como integrinas, transmitindo sinais que regulam a adesão, migração, proliferação, apoptose e sobrevivência. Os componentes da MEC liberados através da sua clivagem ou degradação também regulam sua arquitetura e influenciam o comportamento celular. Além disso, as células estão constantemente reconstruindo e remodelando a MEC por meio de síntese, degradação, remontagem e modificação química. Esses processos são complexos e precisam ser rigidamente regulados para manter a homeostase dos tecidos, especialmente em resposta a lesões (HYNES, 2009; LU et al., 2011 e BONNANS, et al., 2014).

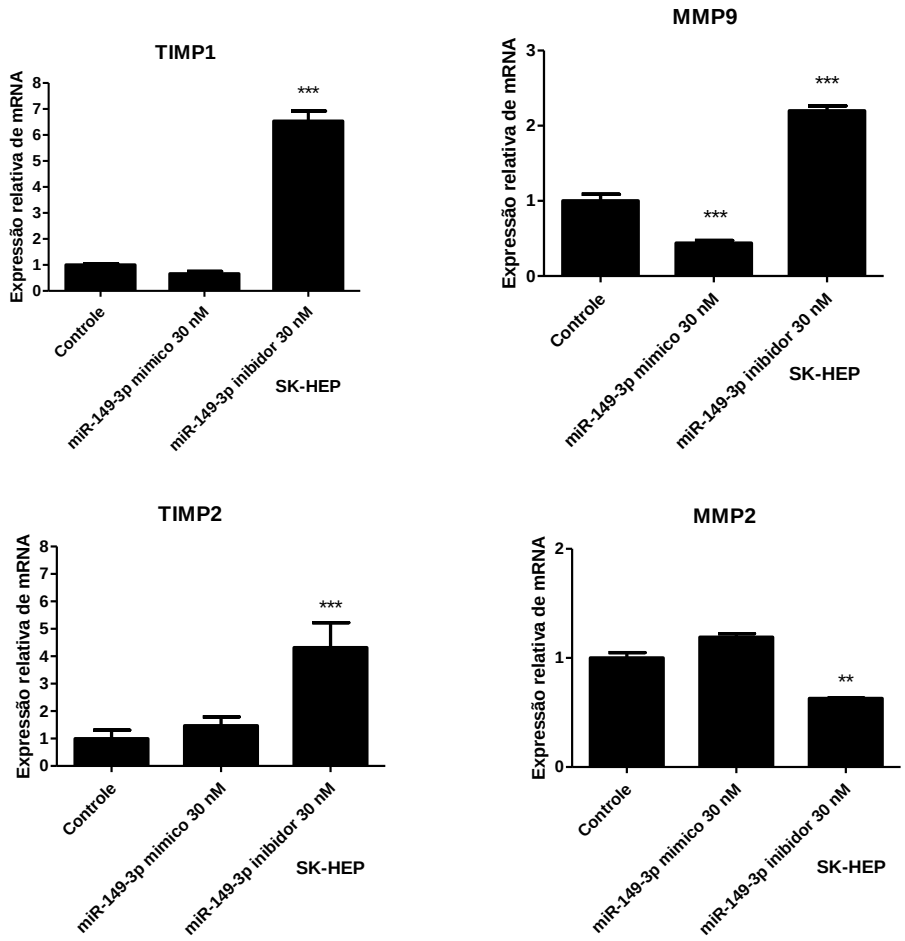
As proteínas matriz metaloproteinases (MMPs) pertencem a família das endopeptidades. Essas são proteinases dependente de zinco (Zn^{2+}), que participam da degradação da MEC. Elas incluem aproximadamente 25 proteínas, as quais podem ser divididas em: colagenases (MMP1, 8 e 13), gelatinases (MMP2 e 9) (VISSE; NAGASE, 2003), estromelisinas (MMP3, 7 e 10), metrilisinas (MMP7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP14, 15, 16, 17 e 24) e outras que são classificadas por sua especificidade ao substrato (De SOUZA ARAÚJO et al., 2011; VISSE; NAGASE, 2003).

Existem também os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Quatro tipos de TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4) já foram descritas em vertebrados. As mudanças nos níveis de TIMPs afeta diretamente os níveis de MMPs (VISSE e NAGASE, 2003). Os TIMPs dos tipos 1 e 2 representam membros bem caracterizados da família de inibidores e apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMPs, embora a TIMP1 forme preferencialmente complexo com a MMP9, enquanto o TIMP2 atua sobre a MMP2 (DE AZAMBUJA RIBEIRO et al., 2008).

Assim sendo, ao observar a Figura 11, os níveis de TIMP1 nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico não apresenta diferença estatística em relação ao controle, porém as células transfectadas com o miR-149-3p inibidor apresenta um aumento significativo em seus níveis transcricionais, quando comparado com os níveis encontrados no controle. Ao analisar a expressão de MMP9 observa-se uma diminuição da expressão relativa na transfecção com o miR-149-3p mímico em relação ao controle, e novamente um aumento da expressão relativa no miR-149-3p inibidor. Conjuntamente, considerando-se o aumento transcricional das MMPs na presença do inibidor, e a possível formação de complexos entre MMPs e TIMPs, pode-se sugerir a inibição da degradação da matriz extracelular. Alguns estudos, CUI et al., (2015); GAZZANELLI, (2001); MANNELLO; THIELE et al., (2017), atribuíram funções anti-apoptóticas e pró-

angiogênicas ao TIMP1 e como um marcador de mau prognóstico em malignidade do carcinoma hepatocelular.

Figura 11: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à degradação da matriz extracelular (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs). Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em SK-HEP-1. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. **p≤0.01 e ***p≤0.001.



Paralelamente, os níveis de TIMP2 nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico não apresentou diferença estatística em relação ao controle, porém a transfecção com o miR-149-3p inibidor apresentou um aumento significativo em seus níveis transcricionais, quando comparado com o controle. Ao analisar os níveis transcricionais de MMP2 nos diferentes grupos celulares, observa-se uma redução significativa na expressão do gene na transfecção realizada com o miR-149-3p inibidor, em comparação

com os níveis transcricionais encontrados nas células não transfectadas e consideradas controle experimental. Assim, considerando-se as observações de De Azambuja Ribeiro et al., (2008), pela análise dos resultados a observação de uma redução significativa nos níveis de MMP2, sugerem uma tentativa de redução na atividade funcional dessa metaloproteínase mediada pelo efeito do miR-149-3p inibidor. Paralelamente, o aumento transcricional de TIMP2, reforça a observação dessa tentativa do bloqueio funcional de MMP2.

Além disso, cabe ressaltar que os níveis transcricionais de outras moléculas correlacionadas ao processo de migração e adesão celular e interação célula-célula foram analisados, como os apresentados nas Figuras 12, 13 e 14.

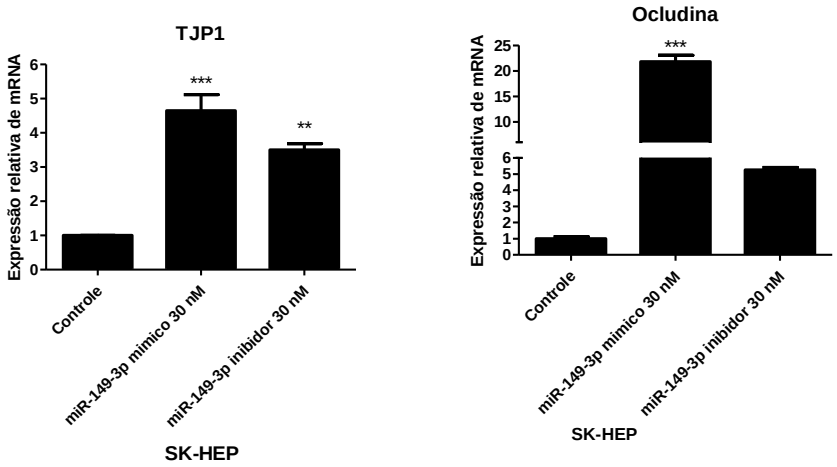
As células interagem umas com outras e com a matriz extracelular subjacente através de complexos proteicos especializados que medeiam a adesão, mantêm a estrutura e transmitem informações para o interior da célula sobre o ambiente intra e extracelular. Esta informação é essencial para diferentes aspectos das funções dos tecidos, bem como para o remodelamento fisiológico e patológico. Um componente importante de adesão celular é TJP1 (*Tight Junction Protein 1*) (ZIHNI et al., 2014). A proteína TJP1 é um componente de junções estreitas que podem regular o remodelamento do citoesqueleto de actina. A baixa expressão de RNAm TJP1 durante a progressão do tumor desempenha um papel crucial na modulação da migração e invasão do câncer. Além disso, a expressão alterada de TJP1, deve desempenhar um papel importante no processo de dissociação celular (NAGAI et al., 2016; TSAI et al., 2018). Outra molécula associada às junções estreitas foi a Ocludina, que é considerada uma proteína integral necessária para a estrutura e função das junções celulares. A Ocludina é uma proteína transmembrana, se liga diretamente às proteínas adaptadoras citoplasmáticas que, por sua vez, se ligam ao citoesqueleto de actina (NAGAI et al., 2016; OSANAI et al., 2007; SÁNCHEZ-PULIDO et al., 2002) agindo assim, como facilitadora para o processo de movimentação/ migração celular.

A Figura 12 apresenta os níveis de expressão relativo das duas proteínas acima mencionas. Ao se analisar a expressão relativa de TJP1, observa-se um aumento significativo na expressão relativa desse gene das culturas transfectadas com o miR-149-3p mímico e com o miR-149-3p inibidor, sugerindo que, ao mimetizar o miRNA ou inibi-lo, a adesão celular por TJP1 aumenta em relação ao controle. Por sua vez, a análise transcricional do gene da Ocludina nas culturas investigadas revela um aumento dos

níveis do RNAm nos grupos transfectados com o mímico, quando comparado com a expressão da cultura controle

Baseado no estudo de Peglion et al., (2014), é possível que haja migração coletiva das células, o que explica o aumento da expressão relativa do RNAm dessas proteínas de adesão, e concomitantemente ocorra a migração das células, como pode ser visto na Figura 12. Segundo, Haeger et al., (2015), durante a migração coletiva, as junções célula-célula garantem a adesão e a mecanocompressão necessária para integrar a força em todo o coletivo migratório. Ao conectar o citoesqueleto de actina a múltiplos corpos celulares, a junção célula-célula forma a base para integrar as forças através de toda a célula, desencadeando a movimentação coletiva entre elas (HAEGER et al., 2015; PEGLION et al., 2014).

Figura 12: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesão celular *Tight Junction Protein 1* (TJP1) e Ocludina (OCLDN). Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em SK-HEP-1. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. **p≤0.01 e ***p≤0.001.



Além das moléculas investigadas e apresentadas na Figura 12, a Vimentina é uma das proteínas mais amplamente expressas da família de proteínas do filamento intermediário do tipo III e normalmente expressa em células de origem mesenquimal (ZHAO et al., 2008). A expressão da Vimentina tem sido mais frequentemente associada à capacidade invasiva do câncer gástrico e foi sugerido que desempenha um papel importante na metástase (FUYUHIRO et al., 2010). Uma linhagem celular não invasiva de câncer de mama adquiriu maior motilidade e invasividade após a superexpressão de Vimentina (TADOKORO et al., 2016). A Figura 13 apresenta os resultados referente a

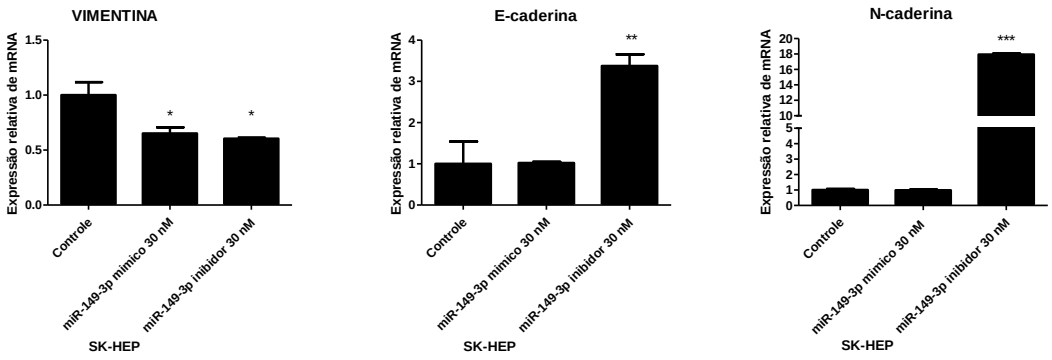
expressão relativa do RNAm Vimentina nos diferentes grupos celulares analisados. Pode-se observar que a expressão relativa de Vimentina nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico e inibidor apresentam seus níveis transcricionais reduzidos, em relação a condição controle. Assim, baseados nesses resultados e nos ensaios de migração celular pela análise do ensaio do fechamento da ferida e pelo ensaio da gota de agarose, que não demonstraram o efeito funcional do miR-149-3p no controle da migração celular, vê-se que as moléculas mimetizadores e inibidoras, atuam nas células no sentido de modular o equilíbrio celular, na tentativa provável de controlar a migração. Particularmente em relação a expressão da Vimentina, sabe-se que a linhagem SK-HEP-1 apresenta características metastáticas (FUYUHIRO et al., 2010), e por isso o nível transcricional do gene Vimentina é estatisticamente maior que os níveis do mesmo nas células transfectadas.

Prosseguindo as análises, a molécula E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio localizada no tecido epitelial. Essa é uma importante molécula de adesão celular e que atua como elemento colaborador de transdução de sinal. Ela pode direcionar a formação de complexos proteicos ligados ao citoesqueleto de actina em combinação com formação de β-catenina, que pode prevenir e reduzir a adesão de células tumorais. A E-caderina é um símbolo importante da ocorrência da perda da transição epitélio-mesenquimal (ZHOU et al., 2016). A transição epitélio-mesenquimal (TEM) implica profundas mudanças fenotípicas, incluindo a perda da adesão célula-célula e polaridade celular, e confere às células capacidades migratórias e invasivas (THIERY et al., 2009). Durante a TEM, o marcador de células mesenquimais E-caderina sofre uma diminuição nos níveis de expressão (ZHANG et al., 2013) que atua como um facilitador da invasão de células cancerígenas e a progressão do câncer metastático (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; THIERY, 2002; THIERY et al., 2009).

Paralelamente, outro gene de destaque na TEM é a N-caderina. A N-caderina têm um papel chave nas interações célula-célula e funcionam não somente para estabelecer adesões íntimas entre as células, mas também definem especificidade entre as adesões inibindo a proliferação excessiva e a invasão de tecidos vizinhos (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2001; WHEELOCK; JOHNSON, 2003). Além disso, a diminuição de E-caderina e o aumento de N-caderina é frequentemente observado em cânceres agressivos (WHEELOCK et al., 2008).

A Figura 13 apresenta os resultados das análises dos níveis de RNAm E-caderina. Os resultados apontam um aumento significativo nos níveis transcricionais desse gene nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor. Ainda na Figura 13 é apresentado os resultados obtidos para N-caderina, que na cultura transfectada com o miR-149-3p inibidor tem seus níveis transcricionais superexpressos. A análise conjunta dos resultados das caderinas reforça a observação de que esteja ocorrendo alterações no equilíbrio celular. Resumidamente, observa-se que em SK-HEP-1 os miRNAs-149-3p mímico e inibidor facilita a migração celular.

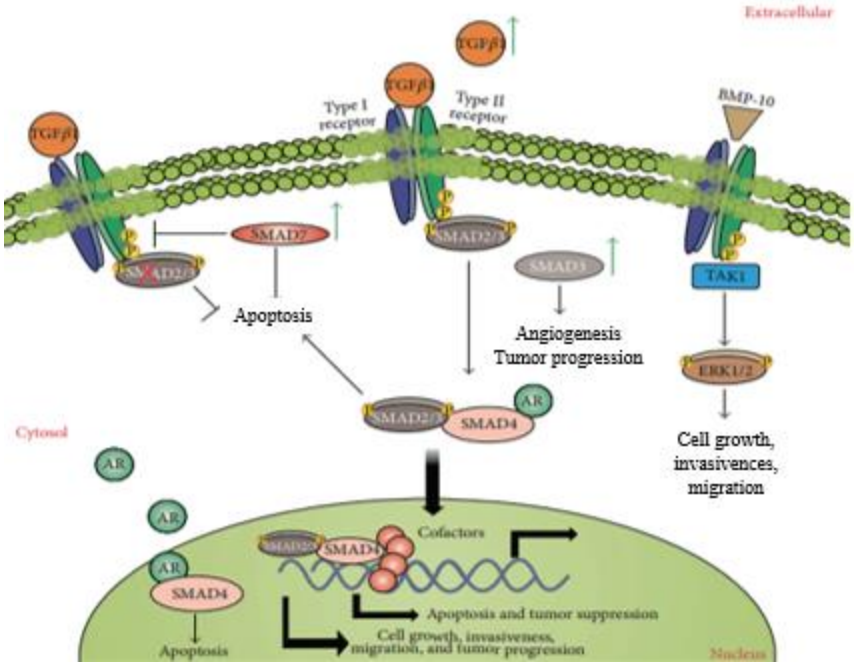
Figura 13: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesividade celular (E-caderina, N-caderina e Vimentina). Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em SK-HEP-1. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05, **p≤0.01 e ***p≤0.001.



Além do abordado e considerando as vias de sinalização celular que podem auxiliar nos mecanismos moleculares de migração e metástase, elementos da via controlada pelo fator de crescimento transformador (TGF-) foram avaliados. Após a estimulação com TGF-β1, o receptor TGFR2 ativo recruta e fosforila o TGFR1, que ativado é capaz de fosforilar SMAD2 e SMAD3. SMAD2 e o SMAD3 ativadas formam um complexo com SMAD4 e então se translocam para o núcleo, onde o complexo SMAD2/3/4 regula a expressão de genes alvo, incluindo aqueles que participam do processo de TEM, como E-caderina e N-caderina. Opostamente, SMAD7 é responsável por bloquear ou impedir que esse complexo chegue ao núcleo e atue como fatores de transcrição. Esquematicamente, a Figura 14 ilustra essa via de sinalização celular. TGF-β1 possui um duplo papel no câncer: ele inibe o crescimento, a invasividade e a motilidade

celular e promove a apoptose em células cancerosas em estágio inicial, enquanto que no câncer em estágio avançado promove a proliferação, invasão e motilidade das células e inibe a apoptose. (DA SILVA et al., 2013; YANG, et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

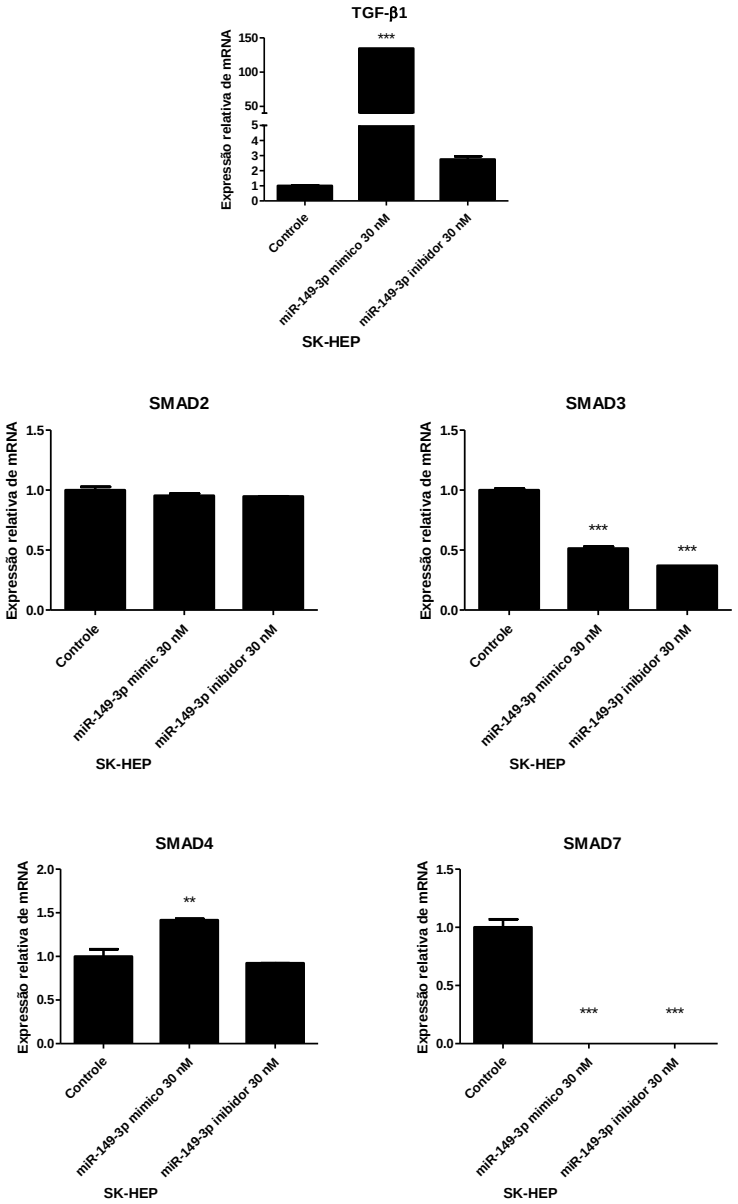
Figura 14: Representação esquemática da via de sinalização TGF-β1 e SMADs (da Silva et al., 2013 - adaptado).



Considerando-se essa via de sinalização, em nossos ensaios, somente a transfecção celular com as moléculas mimetizadoras do miRNA-149-3p aumentam significativamente os níveis transcricionais de TGF-β1 (Figura 15), em comparação com os resultados obtidos com as células não transfectadas. Nenhuma alteração significativa foi observada na expressão de TGF-β1 quando transfectadas com o miR149-3p inibidor, em relação ao controle experimental. Esse aumento exacerbado nos níveis de TGF-β1 pode estar estimulando o crescimento celular, a migração e progressão das células tumorais, como observadas em nossas análises e em diferentes autores (MALFETTONE et al., 2017; WEAVER, 2017). Ainda, pelas análises dos resultados pode-se sugerir que o aumento da expressão de TGF-β1 tenha modulado a expressão de SMADs. Embora os níveis transcricionais de SMAD3 tenham se reduzido nas células transfectadas, quando em comparação com o controle observa-se uma forte inibição da expressão de SMAD7 nessas células que é responsável pela inibição da cascata intracelular de ativação mediada pelas SMADs (YAN et al., 2009). A queda nos níveis de SMAD7 favorecem a

translocação do SMAD2/3 para o núcleo, estimulando a transcrição de genes correlatos com o processo de migração celular (MATSUO et al., 2010; YAN et al., 2009).

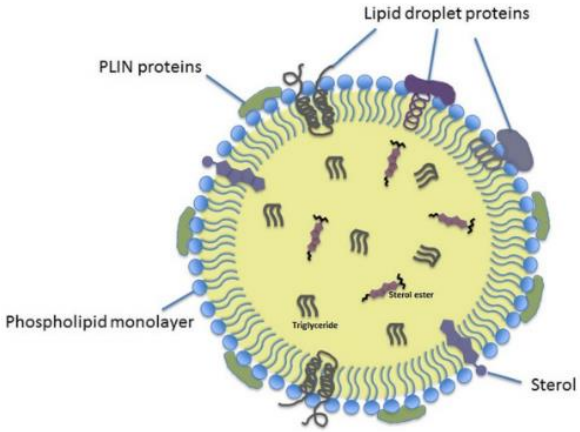
Figura 15: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à sinalização do fator de crescimento transformador (TGF-β1) e SMADs. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em SK-HEP-1. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. **p≤0.01 e ***p≤0.001.



4.1.7 Análise de gotículas lipídicas em microscopia de luz de campo claro: as análises de *Oil Red O*.

As gotículas lipídicas são estruturas celulares formadas por um núcleo lipídico neutro envolto por uma monocamada de fosfolipídeos com composição peculiar e exibindo um conjunto diversificado de proteínas associadas (Figura 16) (BOZZA et al., 2009). Em mamíferos, o armazenamento de lipídeos neutros é observado em células como adipócitos, hepatócitos, células esteroidogênicas e macrófagos (FUJIMOTO, 2004; VIOLA, 2010). Os lipídeos neutros reunidos nos hepatócitos são reconstituídos em lipoproteínas (VLDL) e distribuídos por todo o corpo. O aumento do acúmulo de lipídeos neutros nessas células geralmente causa doenças e distúrbios. A ingestão excessiva de alimentos resulta no desenvolvimento de gotículas lipídicas em adipócitos e hepatócitos, resultando em obesidade e fígado gorduroso (BOZZA et al., 2009; FUJIMOTO, 2004).

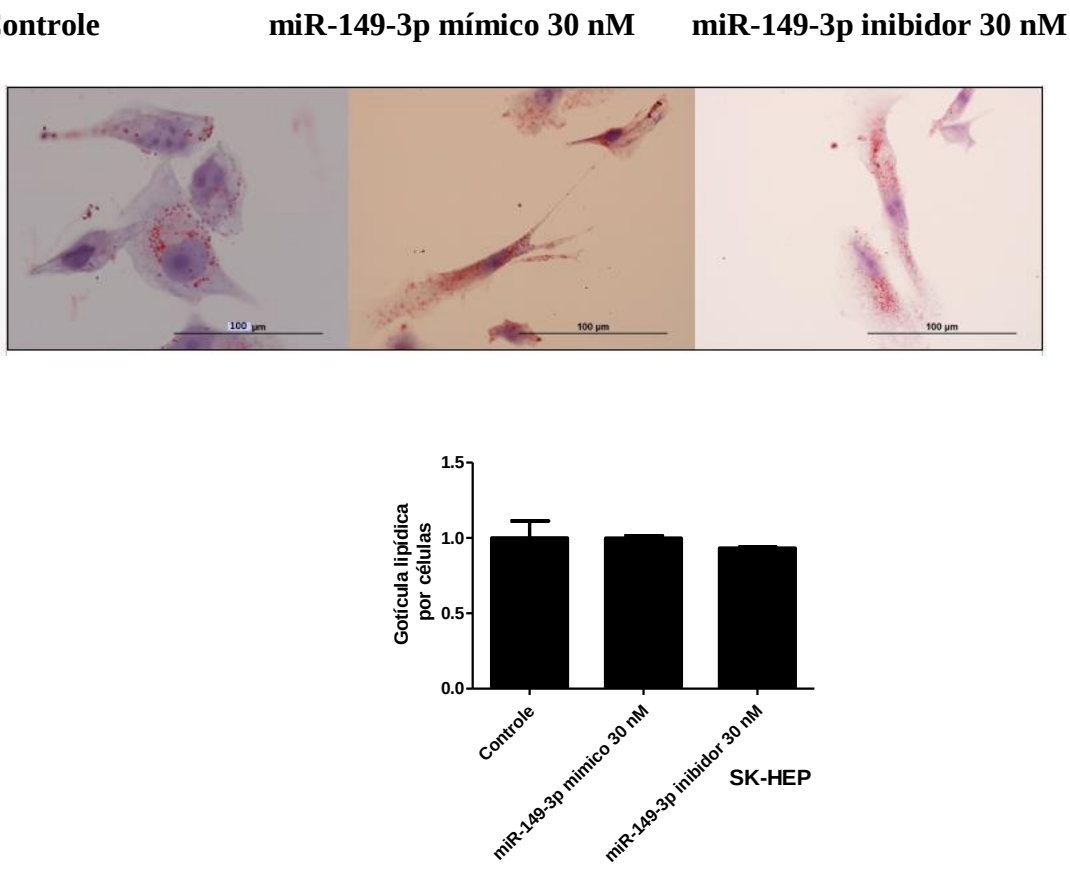
Figura 16: Representação esquemática da morfologia básica de uma gotícula de lipídeo (ONAL et al., 2017).



Assim, é importante entender o processo de deposição e mobilização de lipídeos neutros celulares. Embora, no passado a presença de gotículas lipídicas nas células estivesse envolvida com o armazenamento e o tráfego de lipídeos, agora está bem estabelecido que as gotículas lipídicas são estruturas celulares altamente reguladas envolvidas em muitos aspectos da ativação e metabolismo celular e estão envolvidas nos processos inflamatórios e neoplásicos (BOZZA et al., 2009; ONAL et al., 2017; VIOLA, 2010).

No entanto, para se avaliar os efeitos do miR-149-3p na modulação dessas estruturas, análises de microscopia de campo claro foram realizadas. Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que a presença das moléculas mimetizadoras ou inibidoras não alteram o número médio das gotículas lipídicas nas células, em comparação com a condição controle. Esses resultados sugerem uma não alteração no padrão bioquímico dessas gotículas e do metabolismo lipídico nas células transfectadas.

Figura 17. Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro em células SK-HEP-1 e quantificação relativa de gotículas lipídicas. Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*.

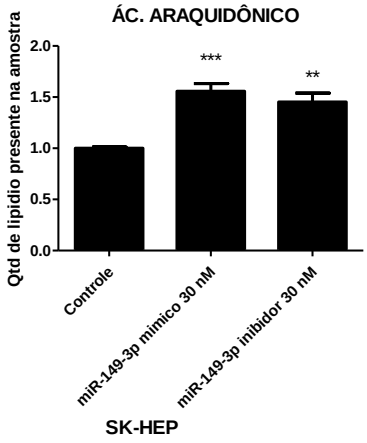


4.1.8 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/ EM) – análises de ácidos graxos

Para complementar as análises lipídicas, análise de CG/ EM foram realizadas para a mensuração de ácidos graxos (AG) específicos. AG são moléculas orgânicas que se caracterizam pela presença de uma cadeia de hidrocarboneto alifático com grupos metilo e carboxilo em extremidades opostas; ácidos graxos polinsaturados contêm mais de uma ligação dupla em sua estrutura (ORTIZ et al., 2013). Existem dois grupos principais de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa biologicamente importantes: ácidos graxos polinsaturados ômega-6 (ω-6) com sua primeira ligação dupla em C6, contando a partir do metil C, e ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (ω-3) com primeira ligação insaturada em C3. Os ácidos graxos ω-3, como o (ácido docosahexaenoico, DHA e ácido eicosapentaenoico, EPA) têm propriedades anticancerígenas demonstradas *in vitro* e *in vivo* (YANG, et al., 2014), embora os mecanismos subjacentes a esses benefícios não sejam claros. Em contraste, os ácidos graxos ω-6 como ácido araquidônico (ARA) ou ácido linoleico (LA) são considerados como possuindo efeitos promotores de tumor (FÉLÉTOU et al., 2011 e MICHALAK et al. 2016). Neste contexto, o efeito pró-tumorigênico dos ácidos graxos polinsaturados ω-6 é principalmente atribuído aos eicosanoides ω-6 gerados enzimaticamente pelas células cancerígenas, como as prostaglandinas e os leucotrienos. Curiosamente, tanto os ω-6 eicosanoides quanto a atividade enzimática responsável por sua geração aumentam em muitos tipos de câncer (ORTIZ et al., 2013; YANG, et al., 2014 e MICHALAK et al. 2016).

Assim, foram realizadas CG/ EM para a mensuração dos ácidos, láurico, mirístico, palmítico, linoleico, oleico, esteárico, erúcico e araquidônico e os resultados obtidos a partir da esterificação de ácidos graxos e quantificação via cromatografia gasosa por espectrometria de massa, e alterações significativas foram observadas somente na produção de ácido araquidônico, nas culturas transfectadas tanto com o miR-149-3p mímico como miR-149-3p inibidor, quando em comparação com os níveis do mesmo nas células controle. A Figura 18 apresenta as análises e reforçam a existência de mecanismos de ativação do processo inflamatório, pelas transfecções celulares, sugeridas na análise de TGF-β1 (Figura 13), que favorecem a migração celular.

Figura 18: Mensuração dos níveis de ácido araquidônico presente nas amostras. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em SK-HEP-1. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. **p≤0.01 e ***p≤0.001.



4.1.9 Expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos

O equilíbrio celular deve reconhecer e responder adequadamente aos seus diversos estímulos. Ao assegurar a expressão correta de genes específicos, o sistema regulador desempenha um papel central no controle de muitos processos biológicos, desde a progressão do ciclo celular e manutenção do equilíbrio metabólico e fisiológico intracelular, até as etapas de diferenciação celular e tempo de desenvolvimento (BOYADJIEV; JABS, 2000; VAQUERIZAS et al., 2009). Várias doenças surgem de um colapso do sistema regulatório, os fatores de transcrição. Aproximadamente um terço dos distúrbios do desenvolvimento humano tem sido atribuído à disfunção dos fatores de transcrição (VAQUERIZAS et al., 2009). Sua principal função é ligar ou desligar, temporariamente ou espacialmente a transcrição gênica de genes alvos, ativando-os ou reprimindo-os, através de elementos específicos durante a transcrição (HOBERT, 2008).

Vários elementos participam da modulação celular do metabolismo de lipídeos, entre eles os fatores de transcrição SREBP1 e membros da família PPAR.

SREBP1 é um fator de transcrição que regula a síntese e absorção de colesterol e ácidos graxos em células animais (OH et al., 2005). Estudos mostraram que o SREBP1 desempenha um papel na síntese e no metabolismo dos ácidos graxos. Quando as células estão isentas de esteróis, um processo proteolítico libera as porções ativas de SREBP1, que entram no núcleo e estimulam a transcrição de genes em três vias do metabolismo

lipídico, biossíntese do colesterol; absorção de colesterol e ácidos graxos do plasma e biossíntese de ácidos graxos. (OH et al., 2005; SHAFIEE et al., 2017). Pela análise dos resultados apresentados na Figura 19, observa-se um aumento na expressão do RNAm SREBP1 nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico, em relação as células controle. Nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor não foram observadas alterações estatísticas em relação ao controle.

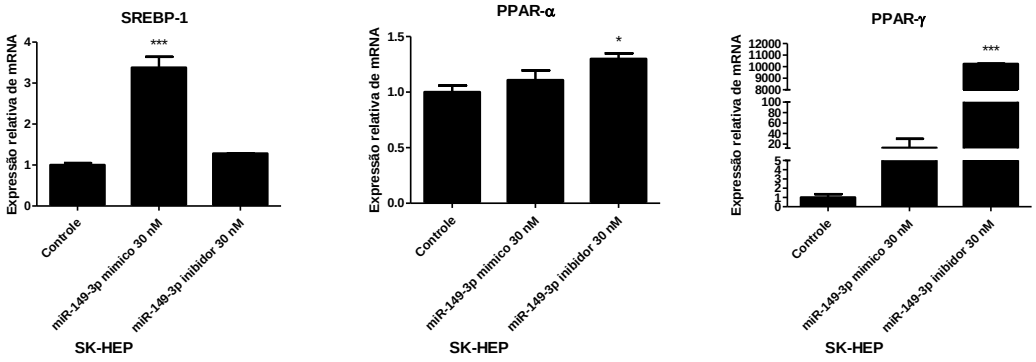
Além de SREBP1, membros da família dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR - PPARα, PPARβ/δ e PPARγ) atuam na modulação transcricional de lipídeos. Essas moléculas, que são receptores nucleares são ativadas após a interação dos mesmos com ligantes específicos, sendo translocadas para o núcleo, onde elas mudam sua estrutura e regulam a transcrição gênica de moléculas correlacionadas a proliferação, diferenciação, metabolismo celular, especialmente a homeostase de lipídeos e glicose (CHENG et al., 2016; JANANI; RANJITHA KUMARI, 2015).

O PPARα e o PPARγ compõem a subfamília de PPAR e cada um exibe padrões e funções de distribuição tecidual específicos da isoforma. A expressão de PPARα é enriquecida em tecidos com altas taxas de oxidação de ácidos graxos, como fígado, coração, músculo esquelético, entre outros. Atuam como sensor nutricional que permite a adaptação das taxas de catabolismo de ácidos graxos, lipogênese, e ainda, é um regulador transcricional de genes envolvidos na β-oxidação peroxisomal e mitocondrial e no transporte de ácidos graxos (COSTA, 2013).

O PPARγ possui funções pleiotrópicas, como a regulação do metabolismo de glicose e lipídeos, propriedades antinflamatórias, inibição do estresse oxidativo e melhora da função endotelial (JANANI; RANJITHA KUMARI, 2015). A Figura 19 também apresenta os resultados para membros da família PPAR. Em relação a PPARα, este apresenta níveis transcricionais aumentados nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor, quando da comparação com a condição controle, o que sugere mais uma vez uma alteração do metabolismo mediada pelo miRNA inibidor. Nenhuma alteração significativa foi observada nas células transfectadas com o miRNA 149-3p mímico, quando comparado com o controle experimental. Por sua vez, a análise dos níveis do RNAm do PPARγ, também apresentou um padrão transcricional semelhante ao observado na análise de PPARα. Nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor observa-se um aumento significativo dos níveis transcricionais de PPARγ em relação ao controle experimental. Conjuntamente, os resultados sugerem a atuação funcional do miR-149-3p no metabolismo lipídico das células SK-HEP-1, que potencialmente atuam

na migração celular. Essas observações são reforçadas pelo descrito em (DING et al., 2016) que demostra a atuação do miR-149-3p na modulação do metabolismo energético celular.

Figura 19: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à fatores de transcrição no metabolismo de lipídeos: SREBP1, PPAR-α e PPAR-γ, respectivamente. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM. Teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05 e ***p≤0.001.

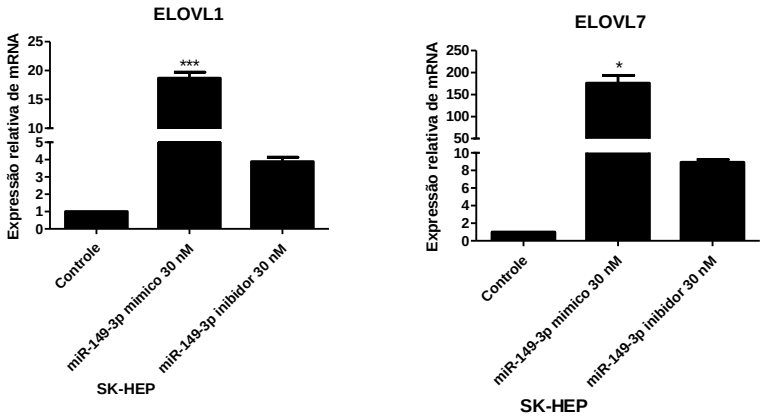


Por sua vez, estudos bioquímicos sobre elementos que compõem a maquinaria de processamento de moléculas lipídicas de ácidos graxos, sugeriram a existência de várias vias distintas de alongamento em mamíferos. Os ácidos graxos são alongados por enzimas acopladas à membrana do retículo endoplasmático (RE) após sua conversão em acil-CoAs. Essa reação é catalisada por uma enzima, a ácido graxo elongase. Mamíferos têm sete elongases (ELOVL1-7), e cada um exibe uma especificidade de substrato característica (KIHARA, 2012). Sugere-se que ELOVL1 controle a síntese de alongamento de cadeia muito longa de ácidos graxos até 26 carbonos para, por exemplo, a formação de esfingolípidios (JAKOBSSON, et al., 2006). Os esfingolipídios são componentes estruturais da membrana celular, necessária para a formação de barreiras, transporte e processos sensoriais das células, fornecem várias funções importantes na fisiologia dos mamíferos, por exemplo, sinalização celular (OHNO et al., 2010 e ZALBA e HAGEN, 2017).

Além disso, Tamura et al., (2009), demostraram que ELOVL7 é superexpresso em células de câncer de próstata. De acordo com os dados de expressão gênica de células de câncer de próstata e outros órgãos, o ELOVL7 foi expresso no mais alto nível nas células de câncer de próstata, podendo levar à especulação de que o ELOVL7 poderia estar envolvido em vias metabólicas específicas de ácidos graxos de cadeia longa e outros

lipídeos que poderiam desempenhar alguns papéis importantes na carcinogênese da próstata (TAMURA et al., 2009). A Figura 20 apresenta os resultados obtidos para as ELOVLs em nossos grupos celulares, aonde se observa um aumento muito significativo na expressão relativa de RNAm ELOVL1 e ELOVL7, nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico quando comparado à condição controle. Também foram observados aumentos significativos, entretanto, menos expoentes que os níveis encontrados nas culturas transfectadas com o miR-149-3p inibidor. Essas análises sugerem que o aumento da expressão do miR-149-3p mímico, indica a necessidade da célula em sintetizar ácidos graxos de cadeia muito longa, reforçando a atuação do metabolismo lipídico no equilíbrio celular e sugerindo a sua atuação na migração celular em SK-HEP-1. E por fim, pode-se concluir que a transfecção causa um desequilíbrio metabólico intracelular, que canaliza processo inflamatório, gasto energético e migração celular.

Figura 20: Níveis de expressão dos RNAms de genes correlatos a elongases, no metabolismo de lipídeos: ELOVL1 e ELOVL7, respectivamente. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em SK-HEP-1. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05, **p≤0.01 e ***p≤0.001.



Reforçando nossas análises realizadas, um estudo de Ding et al., (2016), mostrou que após o jejum de 24 horas, o tecido adiposo subcutâneo de camundongos adquiria propriedades-chave da gordura visceral. Durante essa "visceralização" o estudo apontou a atuação do miR-149-3p nesse mecanismo por atuar sobre uma proteína co-reguladora, chave necessária para a modificação da gordura branca em marrom, PRDM16. Camundongos deficientes do miR-149-3p apresentam um aumento no gasto energético de todo o corpo, com aumento da termogênese. Esses resultados indicam que, além da capacidade de metabolizar a gordura branca para marrom que protege da hipotermia

durante a exposição ao frio, o depósito adiposo subcutâneo também é capaz de modificar novamente a gordura marrom em branca para energia durante o jejum, presumivelmente para manter o equilíbrio energético, via regulação do miR-149-3p mediada de PRDM16 (DING et al., 2016). Esse estudo mostra que o miR-149-3p está ligado a processos envolvendo metabolismo de lipídeos e regulação da expressão gênica, indicando a relevância do seu estudo na sustentação do metabolismo tumoral e sua co-regulação com a metástase.

Em nossas análises foi possível observar que o miR-149-3p não está intimamente relacionado com o controle dos processos migratórios em SK-HEP-1, no entanto, há evidências de que ele esteja envolvido no metabolismo de lipídeos, atuando sobre os fatores de transcrição, que são elementos chaves que interferem em muitos mecanismos celulares, incluindo proliferação e migração, e síntese de lipídeos como suprimento de energia celular.

5. Síntese dos resultados obtidos para SK-HEP-1

Baseado nos resultados, pode-se inferir que a proteína *AAMP* não é o elemento central na regulação do processo de migração celular em SK-HEP-1. Pois mesmo frente aos mecanismos de RNAi desencadeados pelo miR-149-3p mímico, ocorre migração celular. Além disso, pode-se sugerir que o miR-149-3p atua na modulação do metabolismo de lipídeos, pelo aumento da expressão de elementos centrais na ativação desse metabolismo.

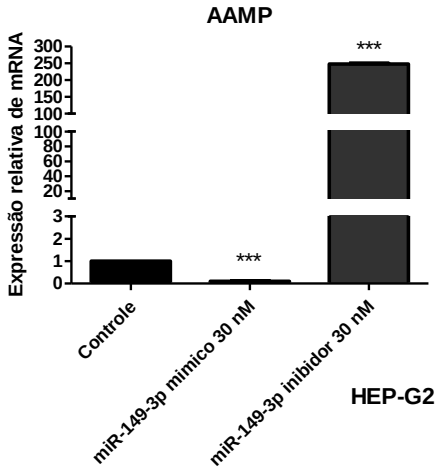
6. CAPITULO II – LINHAGEM CELULAR HEP-G2

6.1 Análises iniciais: os efeitos moleculares do miRNA-149-3p na expressão do gene da proteína *AAMP*

Para avaliar o efeito do miR-149-3 nas células HEP-G2, considerando as análises preliminares do nosso grupo de pesquisa, o nível de expressão do RNAm *AAMP* foi avaliado nos diferentes grupos celulares de HEP-G2 em estudo. Os respectivos controles experimentais, utilizando-se somente a lipofectamina RNAiMAX também foram

realizados, mas não demonstraram alterações significativas em relação a condição controle experimental (culturas crescidas sob condições regulares). Esses resultados não são apresentados nas figuras abaixo. A Figura 21 apresenta os resultados, aonde são observadas particularidades de atuação de diferentes concentrações do miR-149-3p na modulação da expressão do gene *AAMP* nas células em análise. Assim, como nas análises realizadas com as células SK-HEP-1 a concentração de 30 nM do miR-149-3p mímico e do seu inibidor foram selecionadas para serem utilizadas nos ensaios envolvendo as culturas HEP-G2.

Figura 21: Níveis de expressão relativa dos RNAm *AAMP* nas células hepáticas HEP-G2 crescidas em 10% de SBF. As diferentes culturas foram transfectadas independentemente, com diferentes concentrações dos hsa-miR-149-3p com diferentes concentrações dos hsa-miR-149-3p mímico (30 nM) ou do inibidor (30nM). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real, os resultados normalizados com o gene β-actina. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde ***p<0,0005, utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.

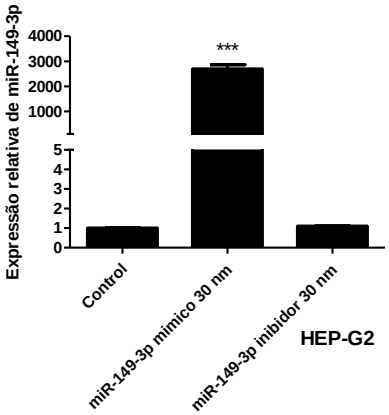


Os resultados apresentados apontam expressão diferencial do gene de *AAMP* nas células transfectadas com a concentração de 30 nM do miR-149-3p mímico. Nessa concentração de miRNAs mímicos, a expressão do RNAm *AAMP* nas células HEP-G2 é extremamente baixa, o que sugere a existência do bloqueio transcricional frente o efeito sistêmico do miR em estudo, ou mesmo a ativação de mecanismo de RNAi por uma interação miR-149-3p mímico: RNAm *AAMP*, considerando-se que esse RNAm apresenta sítios de interação ao miRNA em estudo (SILVA et al., 2016). Por outro lado, a transfecção celular como o miR-149-3p inibidor induz a um abrupto aumento da

expressão de RNAm *AAMP*, sugerindo que a sequência exógena está complementando a sequência do miR-149-3p endógeno, não permitindo a interrupção da expressão do RNAm *AAMP*.

Uma vez padronizadas as concentrações a serem utilizadas nos ensaios, foram avaliados os níveis do miR-149-3p nos diferentes grupos celulares investigados. A Figura 22 apresenta os resultados e demonstra um aumento nos níveis do miR-149-3p nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico (30 nM), quando comparado com a condição controle como esperado, houve aumento da sequência exógena do miRNA em estudo nesta condição. Paralelamente, nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor, foi observado uma diminuição nos níveis do miR-149-3p; considerando-se que a sequência inibitória exógena se complementa com a sequência do miR-149-3p endógeno, o duplex de RNA formados desencadeia mecanismos de degradação das mesmas (CHRISTOPHER et al., 2016; JONAS; IZAURRALDE, 2015), como visto em SK-HEP-1.

Figura 22: Nível de expressão relativa do miRNA hsa-miR-149-3p em células HEP-G2 crescidas até a confluência, na ausência (Controle) e presença do miR-149-3p mímico e inibidor. A expressão gênica relativa apresentada nos gráficos foi normalizada em relação ao gene *U6*. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. ***$p \leq 0.01$.



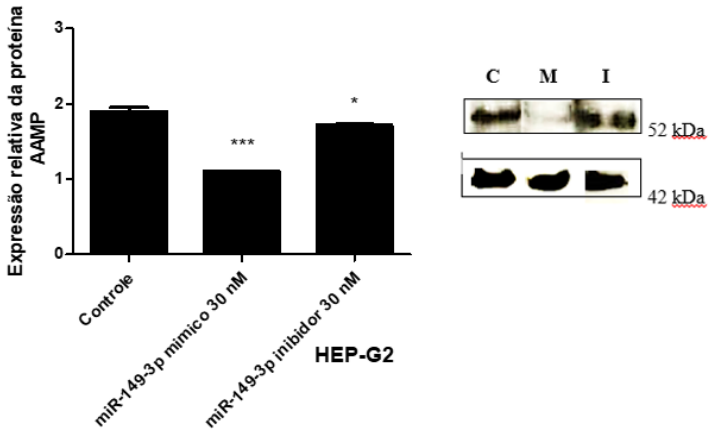
6.1.2 Análise da expressão de proteína AAMP

Baseado nos resultados obtidos e também para validarmos o efeito funcional do miR-149-3p na proteína AAMP, análises de *Western blot* foram realizadas. Como

reportado anteriormente (item 4.1.2), AAMP é uma proteína celular associada a migração e angiogênese e está amplamente distribuída em muitos tipos de células com potencial migratório.

A Figura 23 é representativa, e apresenta os resultados da expressão da proteína AAMP, que foram normalizados com a utilização da proteína endógena β-actina. Vê-se uma redução expressiva da proteína AAMP nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico e aumento significativo de AAMP nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor (30 nM). Os resultados estão em acordo com o observado na Figura 21 que apresenta os níveis transcricionais de AAMP. Em conjunto os resultados sugerem a interação RNAm miR-149-3p; quando da transfecção com o mímico, este pode desencadear um mecanismo de RNAi pós-transcricional como observados em Silva et al., (2016), levando a degradação da molécula mensageira. Por outro lado, a presença do miR-149-3p inibidor, bloqueia a atividade metabólica do miR endógeno, colaborando com o aumento dos seus níveis transcricionas e traducionais nas células.

Figura 23: Análise dos níveis proteicos de *AAMP* (52 kDa) e β-actina (42 kDa) por *western blot* nas condições estudadas. As bandas estão representas como Controle **(C),** miR-149-3p mímico 30 nM **(M)** e miR-149-3p inibidor 30 nM **(I)**. Os gráficos foram construídos utilizando-se o *software Graph Pad Prism 5* e as análises estatísticas foram calculadas utilizando-se ANOVA. *p<0,05 e ***p<0.001.

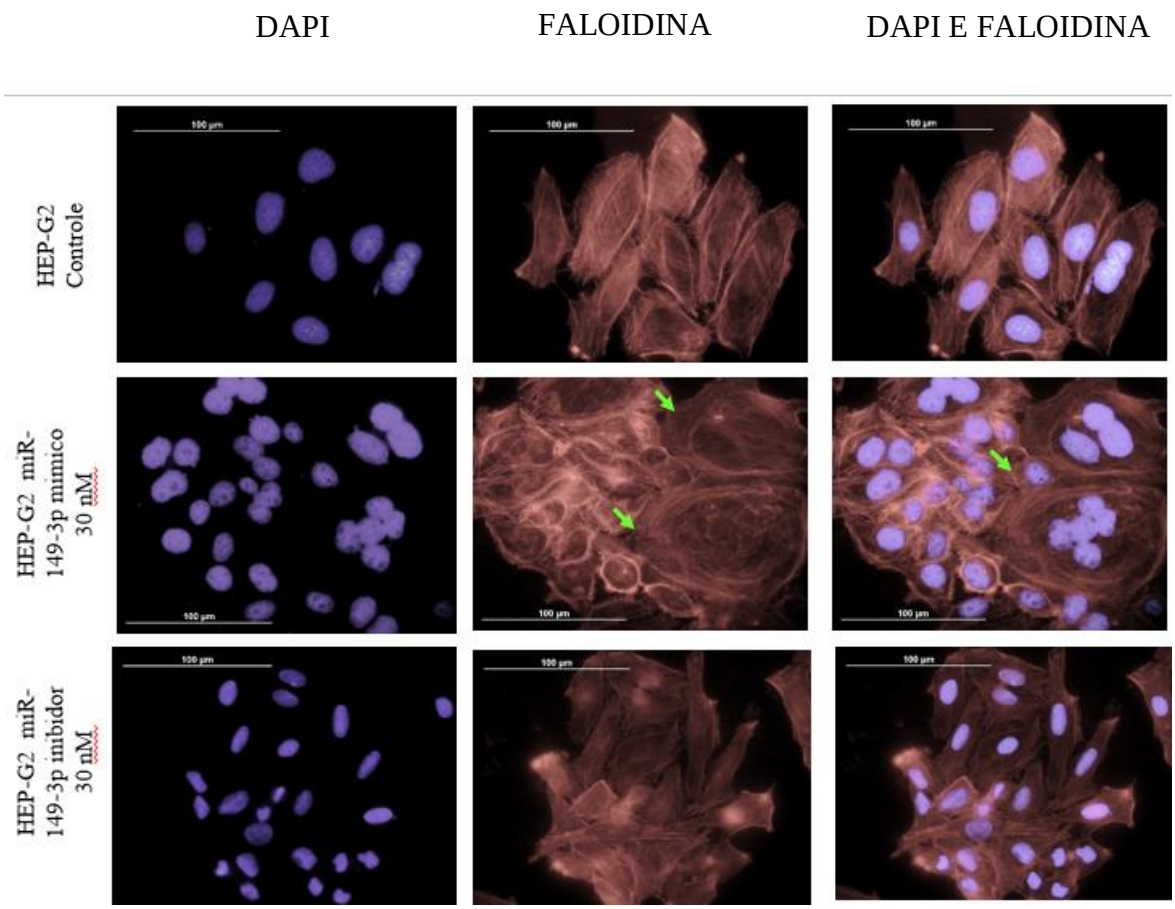


6.1.3 Ensaio de microscopia de fluorescência

Para se observar os efeitos funcionais dos miRNAS mímicos e inibidores na morfologia do núcleo e do citoesqueleto celular, análises de microscopia de fluorescência foram realizadas. A Figura 24 apresenta os resultados e pelas análises, observou-se que a

transfecção das células HEP-G2 com o miR-149-3p mímico modula as interações célula-célula, induzindo a formação de estruturas tipo lamelipódios (MITRA e SCHLAEPFER, 2006), que interligam as células vizinhas. Por outro lado, a transfecção celular com o miR-149-3p inibidor não altera a morfologia geral das culturas que se parecem fenotipicamente às células controle.

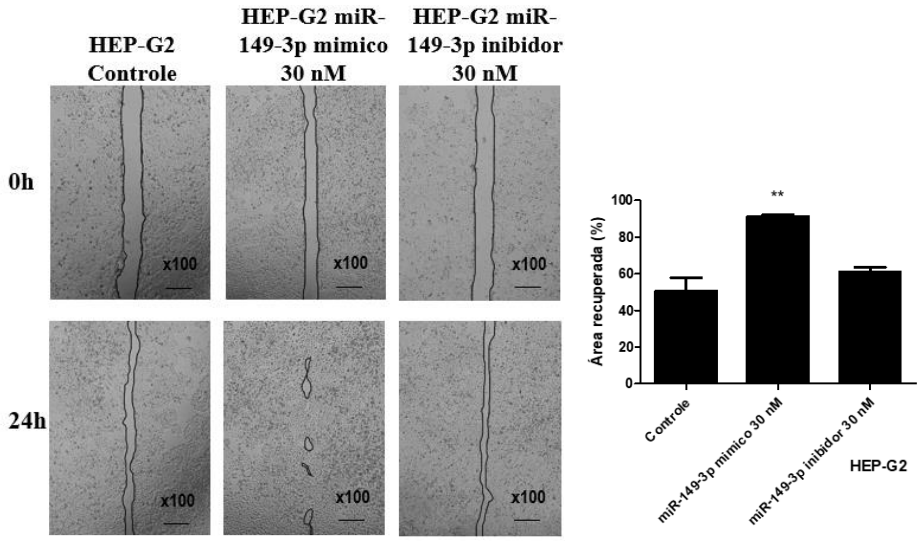
Figura 24: Microscopia de florescência de células HEP-G2. Diferentes condições celulares com HEP-G2 foram cultivadas em lamínulas e depois corados com faloidina-TRITC (filamentos de actina) e DAPI (núcleos) para investigar alterações morfológicas nos grupos celulares. As setas apontam os lamelipódios.



6.1.4 Ensaio de migração celular – ensaio da ferida (*wound healing*)

Considerando as alterações morfológicas observadas (item 6.1.3), o ensaio da ferida (*wound healing*) foi realizado para avaliar os efeitos das transfecções nas linhagens celulares na migração e/ ou proliferação celular. A Figura 25 apresenta os resultados obtidos nos ensaios da ferida nas células HEP-G2. Pela análise dos resultados pode-se sugerir que as alterações morfológicas das células, mediadas pelas transfecções (Figura 24), podem estar influenciando na migração das mesmas, o que é significativo, considerando-se que as células HEP-G2 não se caracterizam como células metastáticas e, portanto, não apresentam características de migração marcantes (HSIEH et al., 2012). Como se pode ver, a transfecção com a molécula mimetizadora conduz o fechamento quase que completo da injúria em 24 horas. Por outro lado, o miR-149-3p inibidor não altera o padrão de fechamento da ferida, quando em comparação com o controle. Pelo conjunto das análises até aqui, podemos pensar que em CHC o miR-149-3p atua acelerando a metástase e piorando o quadro clínico, e que talvez possa ser considerado um marcador do estadiamento dessa patologia. Entretanto, maiores análises devem ser realizadas.

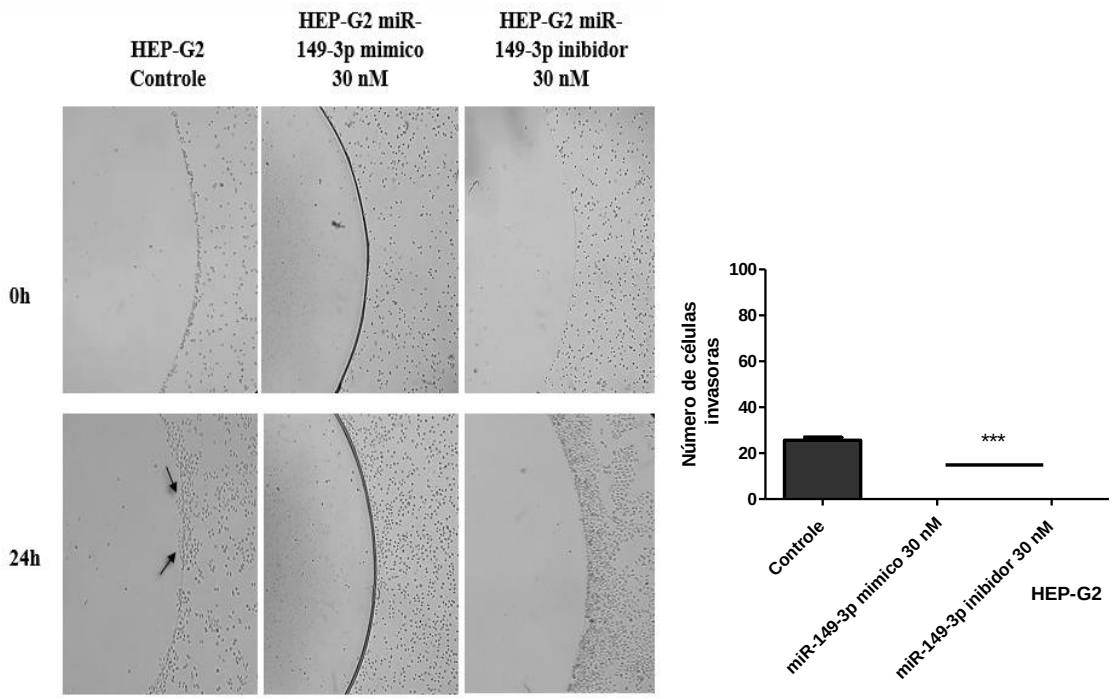
Figura 25: Ensaio da ferida (*wound healing*) em células HEP-G2 transfectadas ou não com o miR-149-3p. Diferentes grupos de células HEP-G2 foram cultivadas em placas de 6 poços. Sob confluência, a migração celular foi examinada por meio de um ensaio de cicatrização de feridas. As imagens são de microscopia (x100). O gráfico mostra a quantificação da recuperação das áreas lesionadas após um período de 24 horas.



6.1.5 Ensaio de invasão celular

Para se complementar as análises dos ensaios da ferida (item 6.1.4) foram realizados ainda, análise do potencial invasivo das células HEP-G2 em cada um dos grupos estudados pelo ensaio da gota de agarose. Para tal, adaptou-se a metodologia descrita por Wiggins; Rappoport (2010) como descrito anteriormente. Os resultados estão apresentados na Figura 26 e demonstram a invasão/ migração das células nas gotas contendo SBF após um intervalo de 24 horas da semeadura. Entretanto, considerando-se as características das células HEP-G2 que apresentam um baixo potencial metastático (HSIEH et al., 2012), o que se verifica é a não invasão das gotas de agarose pelas células transfectadas.

Figura 26: Ensaio de Invasão Celular. Análise do potencial invasivo de células HEP-G2 dos grupos controle, e transfectados com o miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, através do ensaio de gota de agarose. Imagens de microscopia (x100) das células HEP-G2 migrando por debaixo das gotas de agarose diluídas em MEM 10% SFB; as imagens foram adquiridas nos períodos de 0 e 24 horas. As setas apontam para um grupo de células invasoras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *Two-Way* ANOVA. ***p≤0.001.

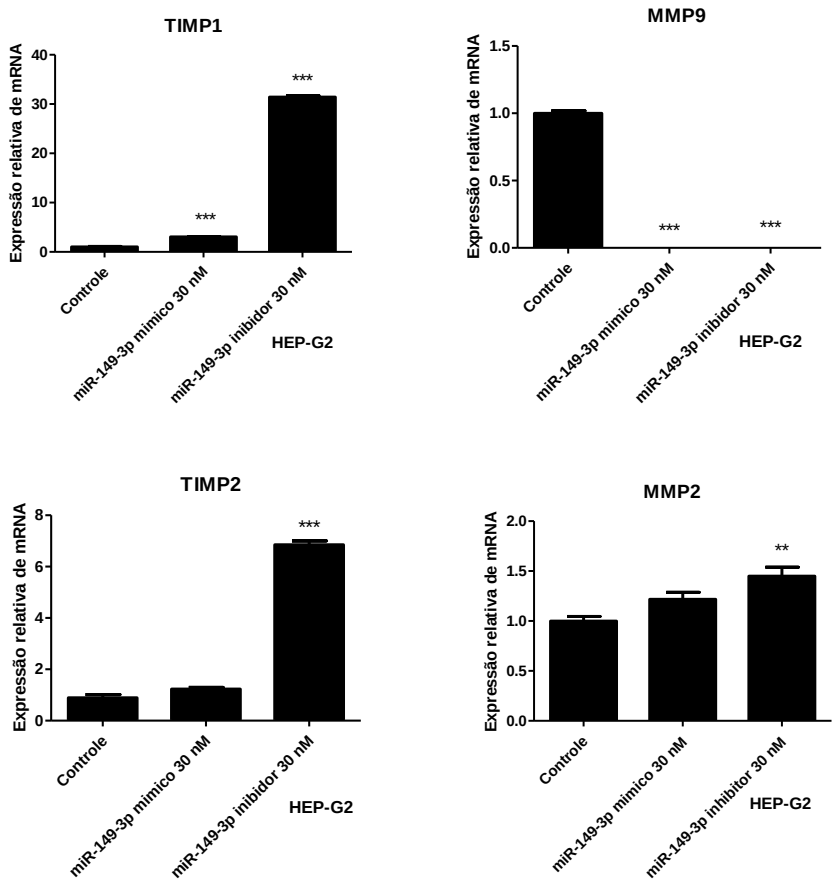


6.1.6 Expressão de genes correlatos ao processo de adesão/ migração celular

A expressão e a atividade das MMPs aumentam em quase todos os tipos de cânceres humanos e estão associadas ao estágio avançado do tumor e à baixa sobrevida (CATHCART et al., 2015; CHENG et al., 2006). As atividades de MMPs que incluem colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas e MMPs tipo membrana estão sob controle rígido através da inibição por TIMPs. Como anteriormente descrito, um equilíbrio bem ajustado entre os níveis de MMPs e TIMPs controla a extensão da degradação local da MEC na periferia das células e, assim, influencia os processos celulares, como migração, proliferação e sobrevivência (RIES, 2014).

A Figura 27 apresenta os resultados das análises de mensuração de expressão gênica de TIMPS e MMPs nas culturas de células HEP-G2. Os resultados apontam que nos níveis de TIMP1 aumentam com maior intensidade nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor. Opostamente, a expressão relativa do RNAm MMP9 reduz nas culturas transfectadas tanto com o miR-149-3p mímico como o miR-149-3p inibidor. Continuamente, em relação à expressão de TIMP2, apenas nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor é observada considerável aumento na transcrição gênica quando comparados aos níveis observados nas culturas controle e não transfectadas. Resumidamente, os resultados apontam que o inibidor atua tentando inibir as MMPs e controlar a migração, isso justifica o aumento da expressão de TIMPs nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor. Entretanto, a linhagem celular HEP-G2 não é uma célula com características de metástase (HSIEH et al., 2012) e por isso os efeitos sistêmicos do miR-149-3p não são tão expoentes nessas células, embora os mecanismos intracelulares dessa linhagem se prepare para controlar a migração frente os efeitos do miR- 149-3p.

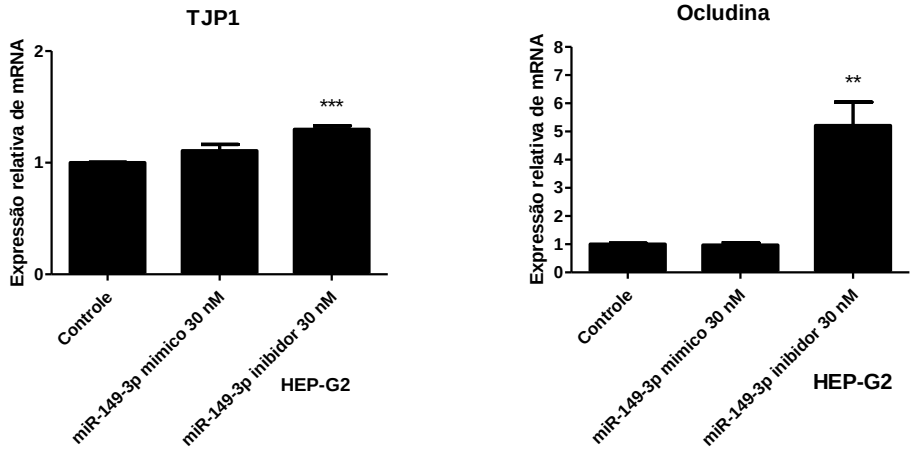
Figura 27: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à degradação da matriz extracelular (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs). Expressão relativa dos genes MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em ambas as linhagens celulares (HEP-G2). Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. ***p≤0.001.



Considerando-se elementos relevantes nos processos de migração e adesão, temos as junções apertadas, que são importantes estruturas juncionais entre os hepatócitos (SCHMITT et al., 2004). Ocludina está envolvida na diferenciação epitelial. A proteína Ocludina da junção transmembrana é de crucial importância na regulação da função adesão célula-célula. Apesar de seu fenótipo maligno, as células HEP-G2 formam contatos juncionais estreitos célula-célula (SCHMITT et al., 2004; VOLKSDORF et al., 2017). As análises de expressão gênica desses elementos são apresentadas na Figura 28, o que evidenciam o papel funcional do miR-149-3p mímico na modulação gênica, quando em comparação com os níveis de expressão das moléculas TJP1 e Ocludina nas demais condições investigadas. Nas células HEP-G2 transfectadas com a molécula inibidora os níveis transcricionais dos genes em questão apresentaram um aumento estatístico

significativo, em relação ao controle e mesmo em relação aos efeitos da transfecção do miR-149-3p mímico. Esses resultados sugerem que ao inibir o miR-149-3p nos hepatócitos, ocorre aumento dessas moléculas de adesão, reforçando o contato célula-célula, isto reforça a menor migração celular no ensaio da ferida (Figura 25) nesta condição. Quanto maior a adesão entre elas, maior é a dificuldade em degradar matriz extracelular, se desagregar e migrar (BYRON; FRAME, 2016), observação corroborada pelas análises dos efeitos do inibidor no ensaio da ferida (Figura 25). Nessas análises a transfecção com o miR-149-3p mímico não exerce alterações relevantes no equilíbrio celular, considerando-se que a expressão dos genes em análise se manteve próximo com o controle.

Figura 28: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesão celular Ocludina (OCLDN) e *Tight Junction Protein 1* (TJP1). Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em HEP-G2. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. **p≤0.01 e ***p≤0.001.

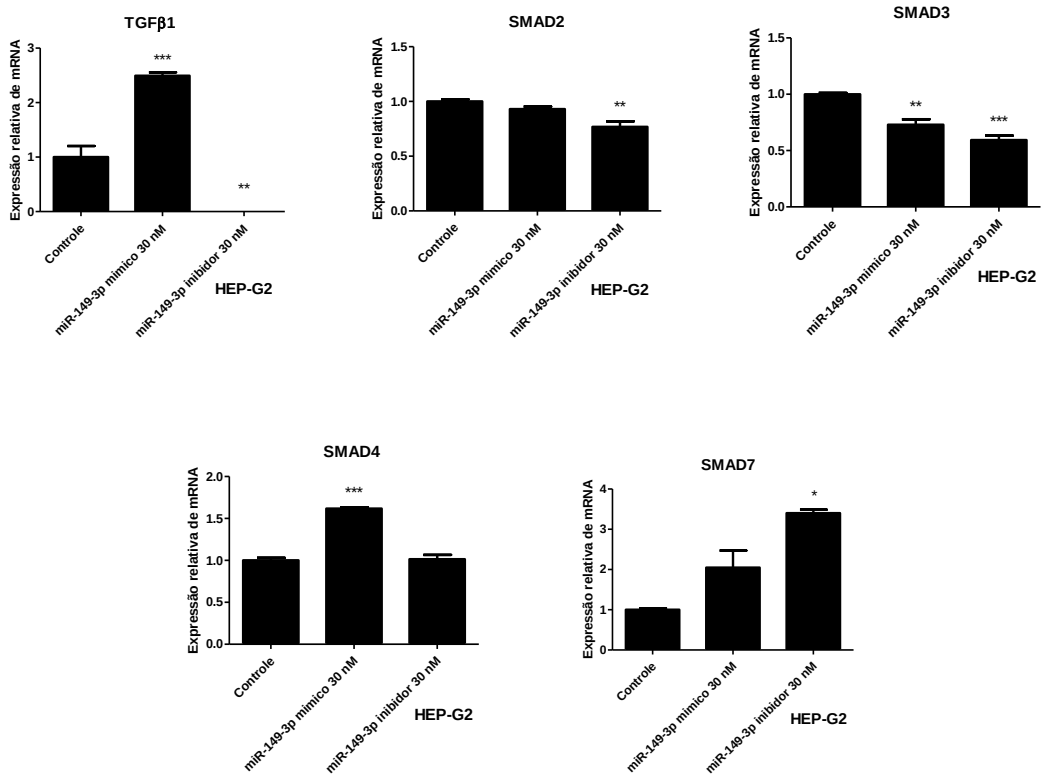


Como reportado anteriormente, estudos recentes enfatizam a possibilidade de envolvimento da família SMADs na patogênese das doenças do CHC e descobriram o papel ativo da sinalização do TGF-β1 tanto na supressão tumoral quanto na oncogênese. Na Figura 29, pode-se observar que houve aumento da expressão do RNAm TGF-β1 em relação à condição controle, juntamente com o aumento nos níveis de SMAD4 (que atua diretamente na translocação do complexo SMAD2/ SMAD3 para o núcleo celular). O decréscimo nos níveis de SMAD2 e SMAD3, proteínas relevantes para o equilíbrio celular, que contêm putativos alvos de interação com o miR-149-3p, podem estar favorecendo o aumento das SMAD4 para garantir a translocação do complexo SMAD2/

SMAD3 em quantidades suficientes para se garantir a homeostasia. Por sua vez, para se evitar um desbalanço intracelular, ocorre um aumento nos níveis de SMAD7 que sugere a atuação da mesma nesse controle intra-celular, uma vez que SMAD7, procura impedir a translocação do complexo SMAD2/ SMAD3 do citoplasma para o núcleo.

Pela análise dos resultados pode-se sugerir que a modulação celular causada pela transfecção das moléculas mimetizadoras e inibidoras do miR-149-3p, favorecem a translocação do complexo SMAD2/ SMAD3, nas células transfectadas com o mímico e consequentemente favorecem o aumento da expressão de TGF-β1, o que favoreceu a migração e o crescimento celular visualizado na Figura 25.

Figura 29: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à sinalização do fator de crescimento transformador (TGF-β1) e SMADs. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em HEP-G2. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05, **p≤0.01 e ***p≤0.001.

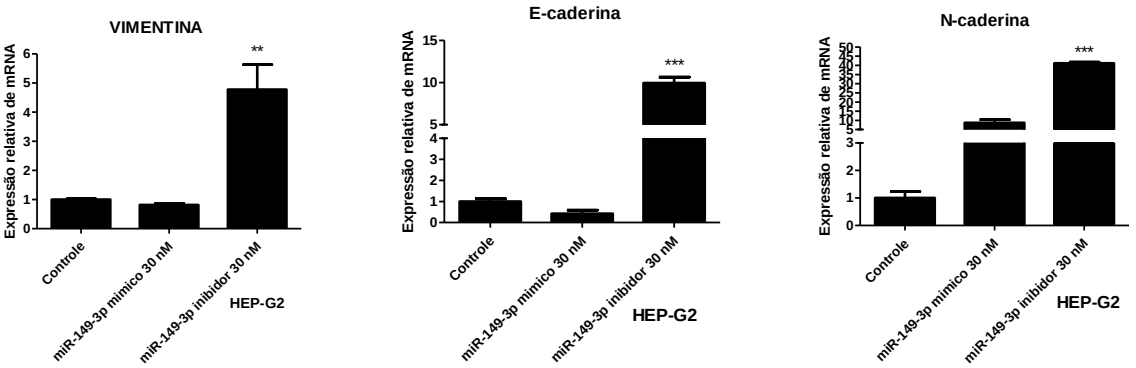


A expressão da Vimentina correlaciona-se com o aumento do potencial metastático e o mau prognóstico do paciente na maioria dos tipos de tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, próstata e mama; no entanto, pouco se sabe sobre como a

vimentina funciona para promover a cascata metastática (SALGUEIRO et al., 2015). Ao analisar a expressão relativa do RNAm Vimentina vê-se uma maior expressão nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor, em relação ao controle e ao miR-149-3p mímico, que estão praticamente com o mesmo nível de expressão, sabendo que a Vimentina é um indicador de potencial metastático, é possível inferir que ao inibir o miR-149-3p as células tentam adquirir esse fenótipo, porém, ainda é insuficiente, pois no inibidor ela migram menos comparado ao mímico (ver Figura 30).

Outros elementos relevantes a serem investigados no contexto da migração e adesão são as caderinas clássicas. Na Figura 30, observa-se uma baixa expressão do RNAm E-caderina nas células controle e nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico. No entanto, ocorre um aumento da expressão relativa nas células tranfectadas com o miR-149-3p inibidor, que pode estar correlacionado com o não fechamento da ferida nas células transfectadas com o inibidor, demonstrado na Figura 25. Essa colocação é posta, uma vez que a E-caderina é responsável pela adesão célula-célula e pela transição epitélio-mesenquimal. Paralelamente, ao analisar a expressão relativa do RNAm N-caderina é possível observar que nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico e/ou inibidor sua expressão é altíssima, comparada ao controle, inferindo uma possível progressão tumoral. Segundo HAZAN et al., (2000) o aumento da expressão de E-caderina em linhagens celulares de carcinoma invasivo reduziu sua capacidade de invasão celular *in vitro*, apoiando ainda mais o papel da E-caderina na manutenção de células em estado epitelial e suprimindo o potencial invasivo de células malignas; já, a expressão de N-caderina em células de câncer de mama (MCF-7) não reduziu a expressão endógena ou a função adesiva da E-caderina, mas ainda conferiu propriedades invasivas e metastáticas (HAZAN et al., 2000). No caso da HEP-G2, por se tratar de uma linhagem maligna, o aumento da expressão de N-caderina no inibidor não interferiu na perda da adesividade celular como mostra a expressão de E-caderina, também no inibidor, dificultando a migração celular.

Figura 30: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à adesividade celular (E-caderina, N-caderina e Vimentina). Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em HEP-G2. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05, **p≤0.01 e ***p≤0.001.



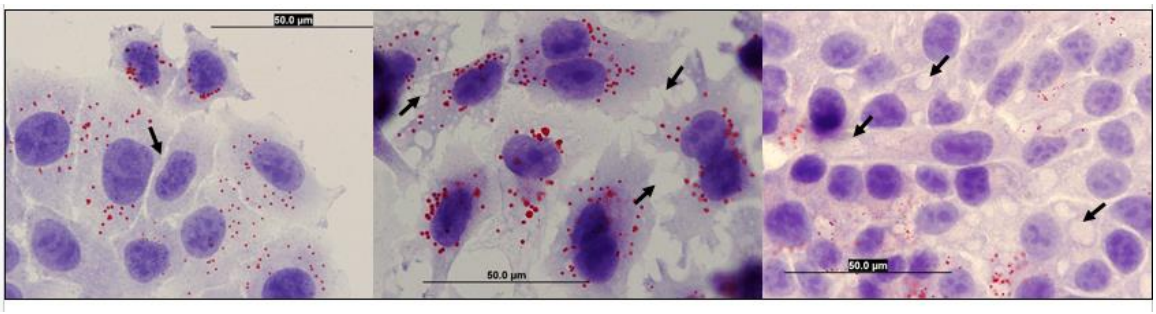
6.1.7 Análise de gotículas lipídicas pelo ensaio de *Oil Red O*

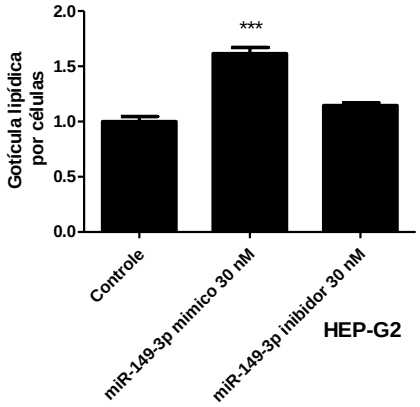
Muitos organismos vivos armazenam lipídeos em suas células para produzir energia metabólica, no caso de fontes de energia insuficientes. Esses tipos de lipídeos são depositados em gotículas lipídicas (CZAJA, 2016; WALTHER; FARESE 2009).

Para se avaliar a distribuição das gotículas lipídicas nos diferentes grupos celulares e o efeito modulador do miR-149-3p, análise de microscopia foram realizadas. A Figura 31 apresenta os resultados aonde é observado um aumento no número de gotículas lipídicas nas células transfectadas com o miR-149-3p mímico, quando comparado ao controle. A transfecção celular com o miR-149-3p inibidor não induziu alterações significativas do número de gotículas/ células, em relação ao controle experimental. Esses resultados demonstram que efetivamente o miR-149-3p altera a homeostase celular. Por outro lado, a transfecção celular com a molécula inibidora induz a formação de grandes vacúolos citoplasmáticos (indicado pelas setas), o que possivelmente se trate de um processo de estresse celular ou indução de apoptose (QIAN e YANG, 2009), reforçando a observação sobre a relevância do miR-149-3p no equilíbrio celular.

Figura 31. Análise de gotículas lipídicas em microscopia de campo claro em células HEP-G2 e quantificação relativa de gotículas lipídicas. Análise estatística realizada em One way *ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde ***p ≤ 0.0005, **p ≤ 0.005 e *p ≤ 0.05.

Controle **miR-149-3p mímico 30 nM** **miR-149-3p inibidor 30 nM**

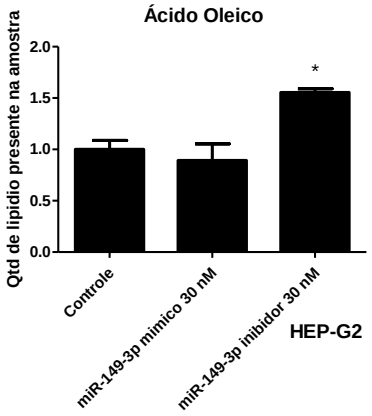




6.1.8 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/ EM) – análise de ácidos graxos

A síntese lipídica descreve os processos que convertem os carbonos derivados de nutrientes em ácidos graxos. Esses ácidos graxos podem ser usados para gerar muitos tipos diferentes de lipídeos como, diacilglicerídeos, triacilglicerídeos que são usados principalmente para armazenamento de energia na forma de gotículas lipídicas. Inicialmente, os resultados oriundos da cromatografia gasosa/ espectrometria de massa não apresentaram nenhum resultado significativo, com exceção do ácido oleico como pode ser visto na Figura 32, aonde houve diferença estatística nas células transfectadas com o miR-149-3p inibidor, apresentando maior quantidade de ácido oleico em relação ao controle e ao miR-149-3p mímico.

Figura 32: Quantidade de Ácido Oleico presente nas amostras. Quantidade relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em HEP-G2. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05.



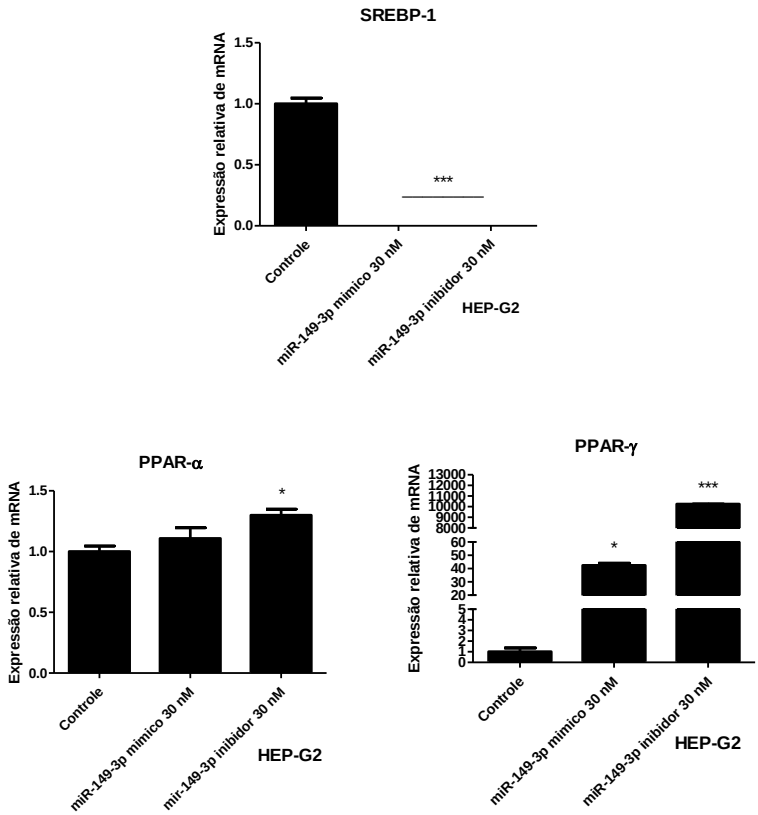
6.1.9 Expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos

Como visto anteriormente (item 4.1.9) SREBP1 é um fator de transcrição que induz a lipogênese *de novo* principalmente em resposta ao aumento da insulina e regula a síntese e absorção de colesterol e ácidos graxos em células animais (OH et al., 2005). A Figura 33, apresenta baixíssimos níveis de expressão do gene analisados nas células transfectadas. Pode-se sugerir, portando que o desbalanço no nível do miR149-3p, quer pelo aumento de seus níveis quer pela sua inibição, inviabilizarão a atuação do fator de transcrição SREBP1 nas células HEP-G2.

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são receptores nucleares conhecidos por modularem as funções celulares e as vias de transdução, tais como proliferação, diferenciação, metabolismo celular (VELLA et al., 2017). De acordo com a Figura 33 é possível observar um aumento significativo, estatisticamente, na expressão do RNAm PPAR-α nas culturas transfectadas com o miR-149-3p inibidor, reforçando a atuação funcional do miR-149-3p no metabólismo lipídico. As análises da expressão de PPAR-γ apontam aumentos significativos na expressão do gene investigado nas células transfectadas, com maior destaque para as células transfectadas com o miR-inibidor, quando da comparação com os níveis de expressão encontrados na condição controle sugerindo uma possível mudança no metabolismo celular, devido a falta do miR-149-3p.

Essa diferença também foi vista em SK-HEP-1, isso reforça que a alteração homeostática dos níveis do miR-149-3p exerce relevante papel no controle dos níveis de fatores de transcrição que estão envolvidos no metabolismo de lipídeos.

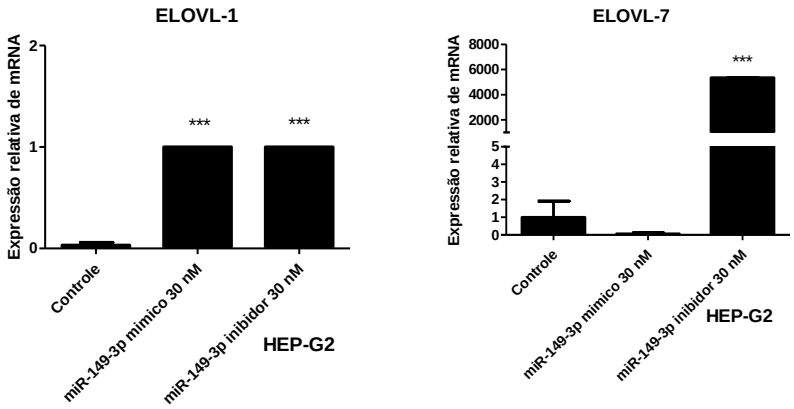
Figura 33: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos à fatores de transcrição, no metabolismo de lipídeos: SREBP-1, PPAR-α e PPAR-γ respectivamente. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em HEP-G2. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05 e ***p≤0.001.



Paralelamente, na Figura 34 é possível observar um aumento significativo em ELOVL1 nas transfecções com o miR-149-3p mímico e inibidor, comparado ao controle. Como já relatado, ELOVL1 é importante na síntese de esfingolipídeos, enquanto que ELOVL7 estão envolvidos no alongamento de ácidos graxos monoinsaturados com as atividades mais altas em direção aos C18 (ácido oleico e linoleico) (OHNO et al.,2010 e KIHARA, 2012). Sendo assim, pode-se inferir que RNAm ELOVL1 esteja superexpresso para a produção de elementos da membrana plasmática, seja para a migração celular (mímico) ou para aderência célula-célula (inibidor). Em relação a ELOVL7 houve uma expressão extremamente baixa na cultura transfectada com o miR-149-3p mímico, sem

diferença estatística em relação ao controle, porém, na transfecção com o miR-149-3p inibidor essa expressão aumenta significativamente, sugerindo a ocorrência de alongamento de cadeia de ácidos graxos para suprimento energético necessário, como pode ser visto também na Figura 32, o aumento da quantidade de ácido oleico nesta condição.

Figura 34: Níveis de expressão dos RNAm de genes correlatos elongases, no metabolismo de lipídeos: ELOVL-1 e ELOVL-7. Expressão relativa nos grupos celulares: controle e transfectados com miR-149-3p mímico 30 nM e miR-149-3p inibidor 30 nM, em HEP-G2. Para a análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA. *p≤0.05, **p≤0.01 e ***p≤0.001.



7. Síntese dos resultados obtidos para HEP-G2

De acordo com os resultados discutidos observou-se que a proteína *AAMP*, como observado na linhagem SK-HEP-1, não é a proteína principal que modula o processo de migração celular. A inibição da tradução da proteína AAMP não interferiu no processo de migração celular, como reportado em células de linhagem tumoral (HU et al., 2016). O miR-149-3p promoveu a diminuição da expressão relativa de RNAm dos genes de adesão, facilitando a desagregação celular. Porém a falta desse miRNA estimula a expressão dos genes de adesão celular, como pode ser visto por TJP1, Ocludina, Vimentina, E-caderina, e N-caderina. Além disso, genes como ELOVL7, PPAR-α e PPAR-γ são superexpressos ao inibir o miR-149-3p, inferindo no recrutamento de fontes energéticas para que a célula desempenhe suas atividades. As análises com HEP-G2 sugerem uma forte interação do miR-149-3p no metabolismo energético, devido a característica mais metabolizadora da linhagem em estudo. No entanto, em relação a

migração celular, o miRNA também não interferiu, sugerindo o fato de que essa célula não possua natureza metastática.

8. DISCUSSÃO COMPARATIVA E CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados, reforça a importância das duas linhagens celulares, SK-HEP-1 e HEP-G2, para a execução do trabalho. Sendo a SK-HEP-1 uma linhagem metastática perfeita para estudos de migração celular e HEP-G2 uma linhagem tumoral bastante metabolizadora, sendo um bom modelo para responder a tratamentos moleculares, como expressão gênica e o estudo de microRNAs.

Em SK-HEP-1 têm-se o aumento da expressão de RNAm *AAMP* tanto nas transfecções com o mímico quanto no inibidor do miR-149-3p, porém a tradução da proteína só ocorre na transfecção com o inibidor, mostrando que o microRNA regula a tradução da proteína, e, ao inibi-lo ocorre o processo de tradução de *AAMP* normalmente. Para SK-HEP-1 identificou-se que não é AAMP a proteína principal, responsável pelo controle da migração.

Ao analisar HEP-G2 observa-se a baixa expressão de RNAm *AAMP* na transfecção com o mímico e sua alta expressão no inibidor. Porém a expressão da proteína é expressa somente ao inibir o miRNA, inferindo que, como para SK-HEP-1, AAMP não é a proteína que controla o processo de migração, ainda que HEP-G2 não possua tal característica.

Ao analisar a expressão dos genes correlatos ao processo de migração e adesão celular, observa-se que a SK-HEP-1 apresenta, num panorama geral, o aumento desses genes na transfecção com o miR-149-3p mímico e também um aumento na expressão dos fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de lipídeos, inferindo que este microRNA potencializa e garante energia para as células desempenharem suas atividades, influenciando no processo de migração celular. Diferentemente, em HEP-G2, onde a expressão dos genes correlatos ao processo de migração e adesão celular aumenta ao inibir a atuação desse microRNA, inferindo que naturalmente ele já favorece os mecanismos que promovem a agressividade do tumor, no entanto, ao inibi-lo isso acarreta num desbalanço homeostático celular, culminando na superexpressão desses genes, inclusive *AAMP*. Em relação aos fatores de transcrição, o miR-149-3p mostrou-se um modelo interessante no estudo do metabolismo energético e suas consequências fisiológicas no metabolismo celular, como visto em CURRIE et al., (2013), porém, isso ainda não foi detalhado e não está claro na literatura. O que se pode observar até aqui é

que os fatores de transcrição também superexpressam ao inibir o miR-149-3p, interferindo no metabolismo energético celular.

Por fim, é importante ressaltar que no caso das duas linhagens de trabalho, obteve-se resultados opostos ao proposto por Silva et al., (2016), em que o miR-149-3p atuou como modulador do processo de migração celular em células de câncer de pulmão (A549), e neste caso obteve maior relevância no metabolismo de lipídeos. A importância desse trabalho se destaca, uma vez que, o tratamento clínico com microRNAs ainda precisa de muita atenção, dedicação e pesquisa, pois como visto, talvez o microRNA recomendado para um tratamento terapêutico em câncer de pulmão não pode ser usado da mesma maneira para um tratamento terapêutico de hepatocarcinoma. É necessária maior atenção neste aspecto e um envolvimento maior de pesquisas nesse âmbito.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, M., Basheer, H. A., Ayuso, J. M., Ahmet, D., Mazzini, M., Patel, R., & Afarinkia, K. (2017). Agarose spot as a comparative method for in situ analysis of simultaneous chemotactic responses to multiple chemokines. Scientific Reports, 7(1), 1075.

Arredondo-Valdez, et al., (2016). Use of micro RNAs in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer (CCR). Gac Med Mex, 152, 347-56.

Baffy, G., Brunt, E. M., & Caldwell, S. H. (2012). Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. Journal of hepatology, 56(6), 1384-1391.

Barca-Mayo, O., & Lu, Q. R. (2012). Fine-tuning oligodendrocyte development by microRNAs. Frontiers in neuroscience, 6.

Bartel DP: MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. Cell. 136:215–233. 2009.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell, 116(2), 281-297.

Bengoechea-Alonso, M. T., & Ericsson, J. (2007). SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. Current opinion in cell biology, 19(2), 215-222.

Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. Physiol. Rev. 94(1):235–263, 2014.

Bonci, et. al. A microRNA code for prostate cancer metastasis. Oncogene, 35(9), 1180–1192. http://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1038/onc.2015.176. 2016.

Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nature reviews Molecular cell biology, 15(12), 786.

Busuttil, R. W., & Klintmalm, G. B. (2014). Transplantation of the Liver E-Book. Elsevier Health Sciences.

Byron, A., & Frame, M. C. (2016). Adhesion protein networks reveal functions proximal and distal to cell-matrix contacts. Current opinion in cell biology, 39, 93-100.

Campbell, H. K., Maiers, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. Experimental cell research, 358(1), 39-44.

Cao et al. (2016). 18β-glycyrrhetinic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. Oncotarget, 7(44), 71960–71973. http://doi-org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.18632/oncotarget.12443

Cavallaro, U., & Christofori, G. (2001). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1552(1), 39-45.

Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nature Reviews Cancer, 4(2), 118.

Chavarro, et al (2013) Blood levels of saturated and monounsaturated fatty acids as markers of de novo lipogenesis and risk of prostate cancer. Am J Epidemiol 178, 1246–1255.

Cheng, J. C., Chou, C. H., Kuo, M. L., & Hsieh, C. Y. (2006). Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-κB signal transduction pathway. Oncogene, 25(53), 7009.

Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., & Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: discovering novel targets and developing specific therapy. Perspectives in clinical research, 7(2), 68.

Cortez, et al. (2011). MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. Nature reviews Clinical oncology, 8(8), 467-477.

Croce, C. M., & Calin, G. A. (2005). miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell, 122(1), 6-7.

Cui, H., Seubert, B., Stahl, E., Dietz, H., Reuning, U., Moreno-Leon, L., ... & Krueger, A. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. Oncogene, 34(28), 3640.

Currie, et al. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. Cell metabolism, 18(2), 153-161.

Czaja MJ. Function of autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. Dig Dis Sci. 2016;61:1304–13.

Da Silva, H. B., Amaral, E. P., Nolasco, E. L., de Victo, N. C., Atique, R., Jank, C. C., … Correa, R. G. (2013). Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. Prostate Cancer, 2013, 1–23. doi:10.1155/2013/920612.

Davis, G. L., Dempster, J., Meler, J. D., Orr, D. W., Walberg, M. W., Brown, B., ... & Goldstein, R. M. (2008, July). Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. In Baylor University Medical Center Proceedings (Vol. 21, No. 3, pp. 266-280). Taylor & Francis.

De Azambuja Ribeiro, R. I. M., Júnior, P. C. B., Cardoso, S. V., Candelori, I., Espíndola, F. S., Cassali, G. D., & Loyola, A. M. (2008). Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 44(2), 115-121.

Dhir, et al. A review and update of treatment options and controversies in the management of hepatocellular carcinoma. Annals of surgery, 263(6), 1112-1125. 2016.

Ding, H., Zheng, S., Garcia-Ruiz, D., Hou, D., Wei, Z., Liao, Z., ... & Zhang, C. Y. (2016). Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. Nature communications, 7, 11533.

Donato, A. J., Morgan, R. G., Walker, A. E., & Lesniewski, L. A. (2015). Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. Journal of molecular and cellular cardiology, 89, 122-135.

Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In Protocols in In Vitro Hepatocyte Research (pp. 77-93). Humana Press, New York, NY.

El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L., & Reddy, K. R. (2008). Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 134(6), 1752-1763.

Fan, et al. (2016). MicroRNA-22 is downregulated in clear cell renal cell carcinoma, and inhibits cell growth, migration and invasion by targeting PTEN. Molecular medicine reports, 13(6), 4800-4806.

Fang, et al. (2015). MicroRNA-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting FGF5 in hepatocellular carcinoma. Journal of hepatology, 63(4), 874-885.

Faqi, A. S. (Ed.). (2012). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development. Academic Press.

Feige, J. N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., & Wahli, W. (2006). From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. Progress in Lipid Research, 45(2), 120–159. doi:10.1016/j.plipres.2005.12.002.

Fuyuhiro, Y., Yashiro, M., Noda, S., Kashiwagi, S., Matsuoka, J., Doi, Y., ... & Hirakawa, K. (2010). Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. Anticancer research, 30(12), 5239-5243.

Gomes, Marcos António et al. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo. v. 59, n. 5, p. 514-524, Oct. 2013.

Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M. M., & Friedl, P. (2015). Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. Trends in Cell Biology, 25(9), 556–566. doi:10.1016/j.tcb.2015.06.003.

Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M. M., & Friedl, P. (2015). Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. Trends in cell biology, 25(9), 556-566.

Hao, Q., Li, T., Zhang, X., Gao, P., Qiao, P., Li, S., & Geng, Z. (2014). Expression and roles of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. Oncology reports, 32(6), 2471-2476.

Hao-Xiang, T., Qian, W., Lian-Zhou, C., Xiao-Hui, H., Jin-Song, C., Xin-Hui, F., ... & Long-Juan, Z. (2010). MicroRNA-9 reduces cell invasion and E-cadherin secretion in SK-Hep-1 cell. Medical oncology, 27(3), 654-660.

Heffelfinger, S. C.; Hawkins, H. H.; Barrish, J.; Taylor, L.; Darlington, G. J. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. In Vitro Cell Dev. Biol. 1992, 28A, 136-142.

Hsieh, S., Lin, P.-Y., Hsieh, C.-W., Li, I.-T., Hsieh, S.-L., Wu, C.-C., … Wu, D.-C. (2012). Probing the Adhesion of Hepatocellular Carcinoma HepG2 and SK-Hep-1 Cells. Journal of the Chinese Chemical Society, 59(8), 929–933.

Hu, J., Qiu, J., Zheng, Y., Zhang, T., Yin, T., Xie, X., & Wang, G. (2016). AAMP regulates endothelial cell migration and angiogenesis through RhoA/Rho kinase signaling. *Annals of biomedical engineering*, *44*(5), 1462-1474.

Hu, J., Qiu, J., Zheng, Y., Zhang, T., Yin, T., Xie, X., & Wang, G. (2016). AAMP regulates endothelial cell migration and angiogenesis through RhoA/Rho kinase signaling. Annals of biomedical engineering, 44(5), 1462-1474.

Hu, J., Qiu, J., Zheng, Y., Zhang, T., Yin, T., Xie, X., & Wang, G. (2015). AAMP Regulates Endothelial Cell Migration and Angiogenesis Through RhoA/Rho Kinase Signaling. Annals of Biomedical Engineering, 44(5), 1462–1474. doi:10.1007/s10439-015-1442-0.

Huang, C., & Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. International journal of molecular sciences, 16(1), 924-949.

Huang, J. C., Babak, T., Corson, T. W., Chua, G., Khan, S., Gallie, B. L. & Morris, Q. D. (2007). Using expression profiling data to identify human microRNA targets. Nature methods, 4(12), 1045-1049.

Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *The Journal of cell biology*, *176*(6), 779-786.

Jakobsson, A., Westerberg, R., & Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. Progress in Lipid Research, 45(3), 237–249. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004.

Janani, C., & Kumari, B. R. (2015). PPAR gamma gene–a review. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 9(1), 46-50.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., et. al. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61: 69–90. doi:10.3322/caac.20107. 2011.

Jeng, L.-B., Velmurugan, B. K., Hsu, H.-H., Wen, S.-Y., Shen, C.-Y., Lin, C.-H., … Huang, C.-Y. (2017). Fenofibrate induced PPAR alpha expression was attenuated by oestrogen receptor alpha overexpression in Hep3B cells. Environmental Toxicology, 33(2), 234–247. doi:10.1002/tox.22511.

Jhou, B.-Y., Song, T.-Y., Lee, I., Hu, M.-L., & Yang, N.-C. (2017). Lycopene Inhibits Metastasis of Human Liver Adenocarcinoma SK-Hep-1 Cells by Downregulation of NADPH Oxidase 4 Protein Expression. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(32), 6893–6903. doi:10.1021/acs.jafc.7b03036.

Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA- mediated gene silencing. Nature Reviews Genetics, 16(7), 421–433. doi:10.1038/nrg3965.

Kersten, S., & Stienstra, R. (2017). The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. Biochimie.

Krebs, A. M., Mitschke, J., Losada, M. L., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., ... & Brunton, V. G. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. Nature cell biology, 19(5), 518-529.

Kuerti, S., Oliveira-Ferrer, L., Milde-Langosch, K., Schmalfeldt, B., Legler, K., Woelber, L. Trillsch, F. VEGF-C expression attributes the risk for lymphatic metastases to ovarian cancer patients. Oncotarget, 8(26), 43218–43227. http://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.18632/oncotarget.17978. 2017.

Kwak PB, Iwasaki S and Tomari Y: The microRNA pathway and cancer. Cancer Sci. 101:2309–2315. 2010.

Lee, I. et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5′-UTR and 3′-UTR interaction sites. Genome Res.19, 1175–1183 (2009).

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. cell, 75(5), 843-854.

Liu, Hailan et al. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. International journal of biochemistry and molecular biology, v. 1, n. 1, p. 69, 2010.

Luo, X., Cheng, C., Tan, Z., Li, N., Tang, M., Yang, L., & Cao, Y. (2017). Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. Molecular cancer, 16(1), 76.

Malfettone, A., Soukupova, J., Bertran, E., Crosas-Molist, E., Lastra, R., Fernando, J., ... & Ramos, E. (2017). Transforming growth factor-β-induced plasticity causes a migratory stemness phenotype in hepatocellular carcinoma. Cancer letters, 392, 39-50.

Mannello, F. & Gazzanelli, G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. Apoptosis 6, 479–482 (2001).

Matsuo, S. E., Fiore, A. P. Z., Siguematu, S. M., Ebina, K. N., Friguglietti, C. U., Ferro, M. C., ... & Kimura, E. T. (2010). Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 54(4), 406-412.

Michalak, A., Mosińska, P., & Fichna, J. (2016). Polyunsaturated fatty acids and their derivatives: therapeutic value for inflammatory, functional gastrointestinal disorders, and colorectal cancer. Frontiers in pharmacology, 7, 459.

Nagai, T., Arao, T., Nishio, K., Matsumoto, K., Hagiwara, S., Sakurai, T., … Kudo, M. (2016). *Impact of Tight Junction Protein ZO-1 and TWIST Expression on Postoperative Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma. Digestive Diseases, 34(6), 702–707.*doi:10.1159/000448860

Nelson, David L.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Obenauf, A. C. et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. Nature 520, 368–372 (2015).

Oh, J., Choi, Y. S., Kim, J.-W., Park, J.-Y., Kim, S.-W., Park, K.-K., & Pak, Y. K. (2005). Inhibition of low density lipoprotein receptor expression by long-term exposure to phorbol ester via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Journal of Cellular Biochemistry, 96(4), 786–794. doi:10.1002/jcb.20551.

Okato, A., Arai, T., Yamada, Y., Sugawara, S., Koshizuka, K., Fujimura, L., ... & Ichikawa, T. (2017). Dual Strands of Pre-miR-149 Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion through Targeting FOXM1 in Renal Cell Carcinoma. International journal of molecular sciences, 18(9), 1969.

Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., & Emre, S. D. (2017). Lipid droplets in health and disease. Lipids in health and disease, 16(1), 128.

Ortiz JL, Milara J, Lluch J, De Diego A, Sanz C, Cortijo J. Phosphodiesterase-4 inhibition improves corticosteroid insensitivity in pulmonary endothelial cells under oxidative stress. Allergy 2013; 68:64–73.

Osanai, M. Murata, N. Nishikiori, H. Chiba, T. Kojima and N. Sawada: Occludin-mediated premature senescence is a fail-safe mechanism against tumorigenesis in breast carcinoma cells. Cancer Sci, 98(7), 1027-34 (2007)

Pan, S. J., Zhan, S. K., Pei, B. G., Sun, Q. F., Bian, L. G., & Sun, B. M. (2012). MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. International journal of immunopathology and pharmacology, 25(4), 871-881.

Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martı´n, M., Castellanos, A., Attolini, C.S., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J.A., et al. (2017). Nature 541, 41–45.

Peglion, F., Llense, F., & Etienne-Manneville, S. (2014). Adherens junction treadmilling during collective migration. Nature Cell Biology, 16(7), 639–651. doi:10.1038/ncb2985.

Poulose, N., Amoroso, F., Steele, R. E., Singh, R., Ong, C. W., & Mills, I. G. (2018). Genetics of lipid metabolism in prostate cancer. Nature genetics, 1.

Qian, H., & Yang, Y. (2009). Alterations of cellular organelles in human liver-derived hepatoma G2 cells induced by adriamycin. Anti-cancer drugs, 20(9), 779-786.

Ray, U., & Roy, S. S. (2017). Aberrant lipid metabolism in cancer cells: the role of oncolipid-activated signaling. The FEBS Journal.

Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. Cellular and molecular life sciences, 71(4), 659-672.

Robertson, B., Dalby, A. B., Karpilow, J., Khvorova, A., Leake, D., & Vermeulen, A. (2010). Specificity and functionality of microRNA inhibitors. Silence, 1(1), 10.

Schmitt, M., Horbach, A., Kubitz, R., Frilling, A., & Häussinger, D. (2004). Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. Journal of Hepatology, 41(2), 274–283. doi:10.1016/j.jhep.2004.04.035.

Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M., & Cheresh, D. A. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. Trends in cell biology, 25(4), 234-240. 2015.

Sethi, G., Shanmugam, M. K., & Kumar, A. P. (2017). SREBP-1c as a molecular bridge between lipogenesis and cell cycle progression of clear cell renal carcinoma. Bioscience reports, 37(6), BSR20171270.

Shafiee, M. N., Mongan, N., Seedhouse, C., Chapman, C., Deen, S., Abu, J., & Atiomo, W. (2017). Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP1) gene expression is similarly increased in polycystic ovary syndrome and endometrial cancer. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 96(5), 556–562. doi:10.1111/aogs.13106.

Shih, W., & Yamada, S. (2012). N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix. Journal of Cell Science, 125(15), 3661–3670. doi:10.1242/jcs.103861.

Si, L., Xu, L., Yin, L., Qi, Y., Han, X., Xu, Y. & Peng, J. (2017). Potent effects of dioscin against pancreatic cancer via miR-149-3P-mediated inhibition of the Akt1 signalling pathway. British journal of pharmacology, 174(7), 553-568.

Silva, B. D. O., Lima, K. F., Gonçalves, L. R., da Silveira, M. B., & Moraes, K. C. MicroRNA profiling of the effect of the heptapeptide angiotensin-(1-7) in A549 lung tumor cells reveals a role for miRNA149-3p in cellular migration processes. PloS one, 11(9), e0162094. 2016.

Tabernero, J., Shapiro, G. I., LoRusso, P. M., Cervantes, A., Schwartz, G. K., Weiss, G. J., ... & Gounder, M. M. (2013). First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. Cancer discovery.

Tadokoro, A., Kanaji, N., Liu, D., Yokomise, H., Haba, R., Ishii, T., ... & Bandoh, S. (2016). Vimentin regulates invasiveness and is a poor prognostic marker in non-small cell lung cancer. Anticancer research, 36(4), 1545-1551.

Tamura, K., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kobayashi, T., Furihata, M., Chung, S., ... & Nakamura, Y. (2009). Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. Cancer research, 69(20), 8133-8140.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. Cell 2009;139:871–90.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature reviews. Cancer 2, 442-454.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. and Nieto, M. A. (2009). Epithelialmesenchymal transitions in development and disease. Cell 139, 871-890.

Vella, V., Nicolosi, M. L., Giuliano, S., Bellomo, M., Belfiore, A., & Malaguarnera, R. (2017). PPAR-γ agonists as antineoplastic agents in cancers with dysregulated IGF axis. Frontiers in endocrinology, 8, 31.

Vitsios, D. M., Davis, M. P., van Dongen, S., & Enright, A. J. Large-scale analysis of microRNA expression, epi-transcriptomic features and biogenesis. Nucleic acids research, 45(3), 1079-1090. 2017.

Volksdorf, T., Heilmann, J., Eming, S. A., Schawjinski, K., Zorn-Kruppa, M., Ueck, C., ... & Brandner, J. M. (2017). Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. The American journal of pathology, 187(6), 1301-1312.

Walther, T. C., & Farese, R. V. (2009). The life of lipid droplets. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1791(6), 459–466. doi:10.1016/j.bbalip.2008.10.009

Wang C, Song B, Song W, Liu J, Sun A, et al. Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. J GastroenterolHepatol 26: 1630–1637. 2011.

Weaver, A. (2017). Autocrine role of exosomes in cellular adhesion, migration, and invasion. Biophysical Journal, 112(3), 38a.

Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. and Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. Journal of cell science 121, 727-735.

Wiggins, H. L.; Rappoport, J. Z. An agarose spot assay for chemotactic invasion. BioTechniques, v. 48, n. 2, p. 121-124, 2010.

Wilmanski, T., Buhman, K., Donkin, S. S., Burgess, J. R., & Teegarden, D. (2017). 1α, 25-dihydroxyvitamin D inhibits de novo fatty acid synthesis and lipid accumulation in metastatic breast cancer cells through down-regulation of pyruvate carboxylase. The Journal of nutritional biochemistry, 40, 194-200.

Wong, C. M., Wei, L., Au, S. L. K., Fan, D. N. Y., Zhou, Y., Tsang, F. H. C., & Wong, C. C. L. (2015). MiR-200b/200c/429 subfamily negatively regulates Rho/ROCK signaling pathway to suppress hepatocellular carcinoma metastasis. Oncotarget, 6(15), 13658.

Yan, X., Liu, Z., & Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- signaling by Smad7. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 41(4), 263–272. doi:10.1093/abbs/gmp018.

Yang, D., Du, G., Xu, A., Xi, X., & Li, D. (2017). Expression of miR-149-3p inhibits proliferation, migration, and invasion of bladder cancer by targeting S100A4. American journal of cancer research, 7(11), 2209.

Yang, H., Wang, L., Zhao, J., Chen, Y., Lei, Z., Liu, X., ... & Zhang, H. T. (2015). TGF-β-activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer. Lung Cancer, 87(3), 249-257.

Yang, Y., Zhang, N., Lan, F., Van Crombruggen, K., Fang, L., Hu, G., ... & Bachert, C. (2014). Transforming growth factor-beta 1 pathways in inflammatory airway diseases. Allergy, 69(6), 699-707.

Ye, Q. H., Qin, L. X., Forgues, M., et al. Predicting hepatitis B virus–positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. Nature medicine, 9(4), 416-423. 2003.

Zaidi, N. et al. (2013) Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. Prog. Lipid Res. 52, 585–589. 9

Zalba, S., & ten Hagen, T. L. M. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. Cancer Treatment Reviews, 52, 48–57. doi:10.1016/j.ctrv.2016.10.008

Zhang HY, Wu QJ, Xie CH, et al. Long-term survival of patients with hepatocellular carcinoma with pulmonary and adrenal metastasis: A case report. ExpTherMed; 3:699-702. 2012.

Zhang X, Liu G, Kang Y, Dong Z, Qian Q, Ma X. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines. PLoS ONE 2013;8:e57692.

Zhang, Y., Huang, B., Wang, H. Y., Chang, A., & Zheng, X. S. (2017). Emerging role of MicroRNAs in mTOR signaling. Cellular and Molecular Life Sciences, 74(14), 2613-2625.

Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X and Wang Y: Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. Cell Biochem Funct 26: 571-577, 2008. 3

Zhou, Q., Zheng, X., Chen, L., Xu, B., Yang, X., Jiang, J., & Wu, C. (2016). Smad2/3/4 pathway contributes to TGF-β-induced miRNA-181b expression to promote gastric cancer metastasis by targeting Timp3. Cellular Physiology and Biochemistry, 39(2), 453-466.

Zihni, C., Balda, M. S., & Matter, K. (2014). Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. Journal of Cell Science, 127(16), 3401–3413. doi:10.1242/jcs.145029

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. Nature reviews Molecular cell biology, 17(9), 564.