

1. Enquadramento

1.1. O fígado e os ácidos biliares

O fígado é o único órgão do corpo humano com elevada capacidade regenerativa. Ao contrário do que acontece noutros órgãos, como a pele e o intestino delgado, a capacidade regenerativa do fígado é mediada através da proliferação de células diferenciadas – os hepatócitos (Michalopoulos, 2007).

Os ácidos biliares (ABs) são os principais constituintes da bília, contribuindo para a absorção intestinal de gorduras, vitaminas lipossolúveis e nutrientes. No entanto, nos últimos anos, os ABs têm vindo a ser mais estudados relativamente às suas propriedades sinalizadoras, como a ativação específica de recetores nucleares e de vias de sinalização celular. Por fim, os ABs têm sido ainda caracterizados como alvos terapêuticos no desenvolvimento de medicamentos para doenças colestáticas e hepáticas, diabetes, obesidade e síndrome metabólico (Chiang, 2009; Hylemon *et al.*, 2009).

Os ABs produzidos pelos hepatócitos são chamados de ABs primários, como o ácido cólico (CA) e o ácido quenodesoxicólico (CDCA). Estes são conjugados com moléculas hidrofílicas, como a glicina e a taurina, de forma a poderem ser libertados na bília. Posteriormente, sofrem biotransformação pelas bactérias intestinais em ABs secundários, como o ácido desoxicólico (DCA) e o ácido litocólico (LCA), moléculas mais hidrofóbicas, que em altas concentrações induzem a morte celular dos hepatócitos (Perez and Briz *et al.*, 2009).

Por outro lado, ABs mais hidrofílicos, como o ácido ursodesoxicólico (UDCA), apresentam geralmente um efeito citoprotetor, incluindo na apoptose induzida por ABs mais hidrofóbicos (Rodrigues *et al.*, 1998; Perez and Briz *et al.*, 2009). Nos humanos, os ABs endógenos maioritários são o CA, o CDCA e o DCA, na proporção de 40:40:20 (Li and Chiang, 2012).

1.2. Propriedades do DCA em células hepáticas

O DCA tem sido descrito como um forte indutor de morte celular nos hepatócitos. A sua acumulação no interior dos hepatócitos, aquando da colestase, tem sido relacionada com a maioria dos problemas fisiológicos que resultam desta doença. Foi demonstrado que o DCA e outros ABs hidrofóbicos provocam lesões celulares em hepatócitos isolados, hepatócitos em cultura e em fígados inteiros (Perez and Briz *et al.*, 2009). No entanto, ainda não se chegou a uma conclusão definitiva de qual o(s) seu(s) mecanismo(s) de ação. Na verdade, é muito provável que o DCA e outros ABs

semelhantes atuam simultaneamente por vários mecanismos. Têm sido descritos processos de formação de radicais livres de oxigénio (ROS), de rutura da membrana citoplasmática (através da sua atuação como detergentes), de ativação de recetores de morte celular (via extrínseca da apoptose) e da permeabilização da membrana mitocondrial (via intrínseca da apoptose) (Rodrigues *et al.*, 1998a; Rodrigues *et al.*, 1998b; Rodrigues *et al.*, 1999; Perez and Briz *et al.*, 2009). Curiosamente, a rutura da membrana plasmática isoladamente não pode explicar as lesões celulares, uma vez que em doentes colestáticos os ABs apresentam-se em concentrações insuficientes (Amaral *et al.*, 2009).

O DCA ativa a via extrínseca da apoptose ao promover a agregação e o aumento de expressão de recetores de morte celular, mais especificamente o recetor de morte 5 ou DR5 (*death receptor 5*), também designado *tumor necrosis factor-related, apoptosis inducing ligand-receptor 2* (TRAIL-R2). O DCA não é o único AB a ativar estes recetores, mas é o mais potente (Higuchi *et al.*, 2004). Foi demonstrada também a ativação do recetor Fas, com o recrutamento do *Fas-associated death domain* (FADD). Neste caso, ocorre o desenrolar de uma cascata de proteases com início na caspase 8 e com aumento na atividade da catepsina B e proteína Bid, assim como de outras caspases efetoras. A ativação do recetor Fas pode dever-se, também, ao stress oxidativo causado pelo DCA, que pode gerar um mecanismo multifactorial com a ativação de várias proteínas como as *c-Jun-N-terminal kinases* (JNKs), a *protein kinase C* (PKC) e o recetor acoplado á proteína G (TGR5), que vão estimular a translocação e oligomerização do recetor Fas (Amaral *et al.*, 2009; Perez and Briz *et al.*, 2009; Baptissart *et al.*, 2012).

Como é normal, sempre que a proteína Bid é ativada, existe a possibilidade da via extrínseca da apoptose comunicar e ativar a via intrínseca, através de alterações na mitocôndria. Os ABs hidrofóbicos podem também desencadear a via intrínseca diretamente, através da formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e da indução da permeabilidade transitória mitocondrial (MPT), que torna a membrana mitocondrial permeável a solutos de baixo peso molecular. Trata-se de um evento crítico no desenrolar da apoptose, pois permite a libertação do citocromo c mitocondrial, que irá ativar a cascata apoptótica (Amaral *et al.*, 2009; Perez and Briz *et al.*, 2009).

Finalmente, apesar do DCA possuir características pró-apoptóticas bem marcadas em hepatócitos normais, apresenta-se como um forte promotor do aparecimento de lesões na hepatocarcinogénese (Cameron *et al.*, 1982; Baptissart *et al.*, 2012).

1.3. microRNA-21: biogénese, funções fisiológicas e patológicas

Os microRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs não-codificantes, compostos por apenas 21 a 26 nucleótidos, e que têm sido descritos como tendo um papel fundamental na regulação da expressão génica eucariótica, através da sua atuação nos RNAs mensageiros (mRNAs). Em particular, os miRNAs ligam-se aos mRNAs presentes no citoplasma evitando a sua tradução ou promovendo a sua degradação (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). A investigação destes reguladores celulares tem crescido bastante nos últimos anos, sendo que já foram identificados cerca de 1000 miRNAs humanos até à data. Os miRNAs não são específicos dos mRNAs, uma vez que a cada miR podem ligar-se a vários mRNAs diferentes. Este facto leva a crer que a maioria dos mRNAs humanos é regulada pelos miRNAs (Avraham and Yarden, 2012).

O miRNA-21 (miR-21) é um miRNA expresso na maioria dos tecidos humanos e, particularmente, em neoplasias. Foi também um dos primeiros miRNAs cuja estrutura foi determinada (Fujita *et al.*, 2008). Está bastante expresso nas células hepáticas, tendo sido já relacionado com fenómenos de regeneração hepática (Castro *et al.*, 2010). O gene que codifica para o miR-21 está localizado no cromossoma 17q23-1, em sobreposição com o gene TMEM49, um homólogo humano de uma proteína de membrana de rato (VMP-1) (Cai *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2011). Tal como os restantes miRNAs, o miR-21 é inicialmente sintetizado no núcleo como um transcripto primário longo, sofrendo depois uma série de processamentos até originar o miRNA maturo (Figura 1)

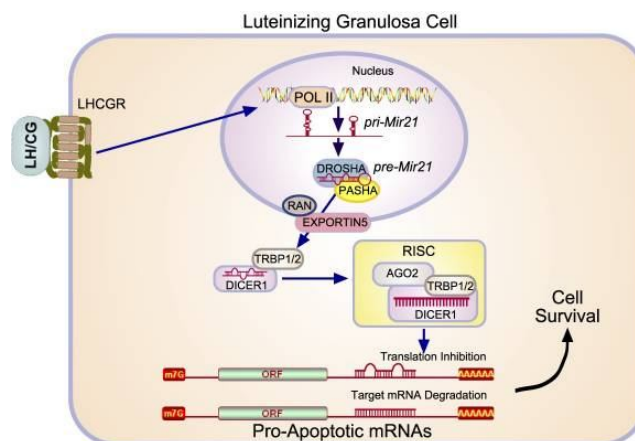


Figura 1 – Mecanismo de síntese do miR-21 (Hennebold, 2010)

Como afirmado anteriormente, o miR-21 está presente na maior parte dos tipos celulares, sendo geralmente considerado como um fator anti-apoptótico. Nas células normais, o miR-21 está bem estudado e caracterizado nas células hepáticas onde, devido a sua ação anti-apoptótica, tem um papel importante na regeneração hepática

após hepatectomia (Castro *et al.*, 2010). Foi demonstrado que o miR-21 é transcrito em resposta ao *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) e *activation protein 1* (AP-1), proteínas cuja expressão aumenta nas fases iniciais da regeneração hepática (Fujita *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). Na regeneração, o miR-21 parece ter como alvos diretos as proteínas *Pellino 1* e *Cyclin D1* (Marquez *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2012).

Mais do que nas células normais, a expressão e função do miR-21 tem sido exaustivamente estudada nas células neoplásicas, onde a sua constante sobreexpressão justificou a denominação de oncomir, uma vez que promove o crescimento, migração e sobrevivência tumoral (Qi *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2012). Em particular, a sua expressão aumentada foi já descrita no carcinoma hepatocelular, inversamente à expressão das proteínas PTEN, PDCD4 e RECK (Liu *et al.*, 2010). Também nos gliomas e nos glioblastomas a expressão do miR-21 aparece elevada, sendo que uma expressão aberrante contribui para um fenótipo ainda mais agressivo (Chan *et al.*, 2005; Corsten *et al.*, 2007). O miR-21 é, ainda, responsável pela ativação da proteína TORC1 durante a proliferação e invasão do cancro do rim (Dey *et al.*, 2012). Finalmente, o miR-21 está também bastante aumentado no cancro da mama e no cancro gástrico inibindo, neste último, a tradução da proteína *Serpini1* (Qi *et al.*, 2009; Yamanaka *et al.*, 2012).

1.4. Proteína *programmed cell death 4* (PDCD4)

A proteína PDCD4 foi identificada como um novo gene supressor de tumores e aparece pouco expressa em células de vários tipos de cancro. Tem sido apresentada como interligada ao miR-21, pois este parece ser o principal fator responsável pela sua baixa expressão. De facto, um estudo recente mostrou que quando se diminui a expressão de PDCD4 em células MCF-7 sob efeito da inibição do miR-21, a apoptose pouco aumenta, revelando tratar-se de uma importante proteína pro-apoptótica. Alguns estudos mostraram, ainda, que a PDCD4 tanto pode estar no núcleo como no citoplasma. No entanto, ainda não se conseguiu encontrar uma correlação entre a sub-localização celular da PDCD4 e as suas funções (Qi *et al.*, 2009).

A PDCD4 parece ter como funções regular a tradução de proteínas através da ligação ao EIF4A, inibir o crescimento celular tumoral através da modulação do AP-1 e p21 e inibir a invasão celular, através da regulação do u-PAR e do MMP-2 (Liu *et al.*, 2010).

2. Objetivos do projeto

Estudos anteriores do grupo mostraram que uma alimentação suplementada com DCA promove a diminuição da regeneração hepática e o aumento da morte celular, em ratos sujeitos a hepatetomia parcial (Kren *et al.*, 2001). Em estudos *in vitro*, mais recentes, mostrou-se que a toxicidade e indução de apoptose pelo DCA parece estar associada com o facto deste ácido biliar diminuir a expressão do miR-21. Em particular, foi demonstrado que 100 μ M de DCA promovem a diminuição do miR-21 em cerca de 10 a 50%, após a sua incubação por 4 a 48 h, respetivamente, em hepatócitos primários de rato (Figura 2). Além disso, após 24 h de incubação, esta concentração de DCA reduz a viabilidade e aumenta a morte dos hepatócitos, em cerca de 20 e 50%, respetivamente (Castro *et al.*, 2010 e Figura 3). Sabe-se, também, que a proteína pro-apoptótica PDCD4 é um dos principais alvos do miR-21. Em estudos preliminares, observou-se um aumento na expressão da PDCD4 em hepatócitos primários de rato incubados com DCA, expressão essa que diminuiu após sobreexpressão simultânea do miR-21 (Castro *et al.*, resultados não publicados). Desta forma, pensa-se que o DCA possa aumentar a expressão da PDCD4 via miR-21, contribuindo esta via para um aumento de morte celular.

Ainda assim, esta via não está totalmente caracterizada. Este trabalho vai-se focar nesta caracterização, tendo como objetivos principais a determinação da expressão do miR-21 e PDCD4 em hepatócitos primários de rato, incubados com diferentes concentrações de DCA (25, 50, 100, 200 ou 400 μ M) durante diferentes tempos (24, 48 e 72 h).

Os objetivos podem ser sintetizados nos seguintes pontos:

- Investigar se o DCA induz morte celular, de modo dose-dependente, em células hepáticas;
- Avaliar se a modulação do miR-21 pelo DCA varia consoante a concentração de ácido biliar;
- Investigar se a expressão da PDCD4 está relacionada com a concentração de DCA, via miR-21.

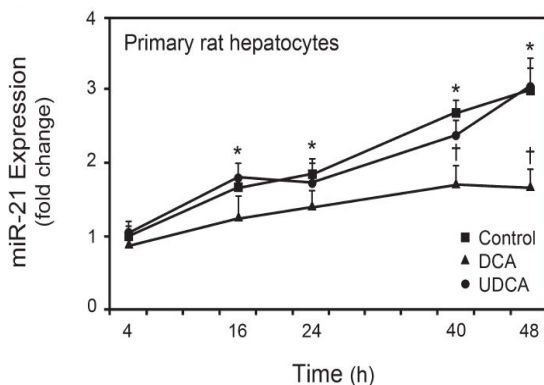


Figura 2 – Os ABs modulam a viabilidade celular em hepatócitos primários de rato. Hepatócitos primários de rato foram incubados com 100 μ M de DCA, UDCA ou sem adição (controlo) durante 4, 16, 24, 40 ou 48 h e a morte celular avaliada através do ensaio da LDH (Castro *et al.*, resultados não publicados).

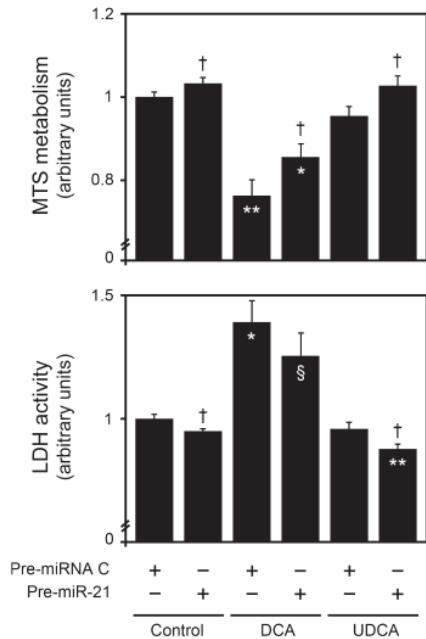


Figura 3 - Os ABs modulam a viabilidade celular em hepatócitos primários de rato através do miR-21. Os hepatócitos primários foram transfetados com um precursor do miR-21 (Pre-miR-21) ou um controle (Pre-miRNA C) e incubados com 100 μ M de DCA, UDCA ou sem adição (controle). A morte celular foi avaliada através do ensaio da LDH e a viabilidade através do ensaio MTS (Adaptado de Castro *et al.*, 2010)

3. Metodologia aplicada

3.1. Isolamento de hepatócitos primários de rato

Hepatócitos primários de rato foram isolados a partir de ratos Sprague-Dawley machos (100-150 g) através de uma perfusão com colegenase. Os ratos foram anestesiados com fenobarbital de sódio (100 mg kg⁻¹ de peso corporal) injetado dentro da cavidade peritoneal. Depois da administração de heparina (200 unidades kg⁻¹ de peso corporal) na veia da cauda, o abdômen dos animais foi aberto e a veia porta exposta e canulada. O fígado foi então perfundido a 37°C *in situ* com *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) livre de cálcio por aproximadamente 10 minutos e depois com 0.05% colegenase tipo IV em HBSS na presença de cálcio, durante 10 minutos. Os hepatócitos em suspensão foram obtidos pela passagem dos fígados digeridos com colegenase através de gaze 125 μ m e lavagem em meio de cultura (*William's E medium* - Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) suplementado com 26 mM de bicarbonato de sódio, 23 mM de HEPES, 0.01 unidades mL⁻¹ de insulina, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de dexametasona, 100 unidades mL⁻¹ de penicilina e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Os hepatócitos primários de rato viáveis foram enriquecidos por uma centrifugação de baixa velocidade (200 g) durante 3 minutos. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão do azul de tripano e foi tipicamente de 80-85%.

3.2. Culturas celulares, tratamentos e ensaio de viabilidade

Depois do isolamento, os hepatócitos foram ressuspensos em meio *Complete William's E* suplementado como anteriormente e plaqueados em placas Primaria™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a 5×10^4 células/cm² para os ensaios de viabilidade e detecção de apoptose ou 2.5×10^4 células/cm² para as restantes experiências. As células foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ durante 6 horas, para permitir a sua ligação às placas. As placas foram então lavadas com meio para remover as células mortas e incubadas em meio completo com 25, 50, 100, 200 ou 400 µM de DCA (Sigma-Aldrich Corp.), ou sem adição (controlo) durante 24, 48, ou 72 horas antes de proceder ao ensaio de viabilidade celular da lactato desidrogenase (LDH) (Sigma-Aldrich Corp.), de acordo com as instruções do fabricante. Nos mesmos tempos (24, 48 e 72 horas), os hepatócitos foram recolhidos e processados para a extração das proteínas totais ou para a extração do RNA total .

3.3. Análise da expressão de PDCD4

3.3.1. Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais, as amostras foram primeiramente tratadas com partes iguais do Tampão de proteínas citoplasmáticas, contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM KAc, 2 mM DTT e inibidor de proteases/fosfatases (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), e do Tampão de proteínas totais, contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Nonidet P-40 e inibidor de proteases/fosfatases. Depois de vortexadas, as amostras foram incubadas em gelo durante 30 minutos. As células foram então sonicadas em ultrassons durante 30 segundos com 80:20 on/off *pulse* a 100% de amplitude. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 3100 *g* durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante, que contém o extrato de proteínas totais, foi recolhido e guardado a -80°C.

3.3.2. Quantificação de proteínas

A concentração em proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford usando um Kit Bio-Rad (Bio-Rad). Albumina bovina a 10 mg mL⁻¹ foi usada como padrão (Biolabs Inc., New England, USA). A absorvência foi medida num espectrofotómetro UNICAM UV/Vis 2 a 595 nm e as concentrações de proteína determinadas depois de elaborada uma curva de regressão linear.

3.3.3. Western blot

Os níveis de PDCD4 foram avaliados por Western Blot. Todas as amostras sujeitas a eletroforese foram usadas na mesma concentração, depois de misturadas

com um *cracking buffer* consistindo numa solução de Tris-HCl a 0.5 M, pH 6.8 e 0.4% *sodium dodecyl sulfate* (SDS), 0.2 M DTT, 0.04% de azul de bromofenol e 2% SDS, pH 6.8. As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e imediatamente colocadas no gelo durante mais 5 minutos de forma a evitar a renaturação das proteínas. Para a separação de proteínas, um gel de poliacrilamida/SDS a 8% com uma espessura de 1.5 mm foi usado num sistema vertical de mini-gel. Resumidamente, a bis/acrilamida (Ultrapure-Protogel; Nacional Diagnostics, Manchester, UK), o tampão 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 e 0.4% SDS foram misturados com a adição de 10% de persulfato de amónia e 0.67 M de TEMED para a polimerização do gel. As amostras e o marcador de pesos moleculares (Rainbow® Marker; Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL, USA) foram carregados, antes da aplicação de um campo eléctrico de 140 V, que induziu a migração das proteínas durante 90 minutos. Um tampão de corrida consistindo em 0.025 M Tris-Base, 0.19 M de glicina e 10% de uma solução de SDS foi usado. A seguir à separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England), durante 1 hora a 300 mA, num tampão composto por 95 mM Tris-HCl, 0.73 M glicina e 20% de metanol. Depois da transferência, uma coloração transitória da membrana com *Pouceau S* (Merck, Darmstadt, Germany) foi efectuada para visualizar se houve transferência das proteínas e se o carregamento foi uniforme. As membranas foram então primeiramente incubadas com 5% de leite num tampão TBS, consistindo em 0.02 Tris-Base e 0.1 M NaCl, pH 7.4, durante 3 horas á temperatura ambiente. A seguir a 3 lavagens de 5 minutos com tampão TBS contendo 0.2% de Tween 20 (Sigma-Aldrich Corp.), as membranas foram incubadas durante a noite a 4° C com um anticorpo reativo monoclonal primário para a PDCD4 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), á diluição de 1:100. Finalmente, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-IgG secundário conjugado com a peroxidase horseradish (Bio-Rad) durante 3 horas á temperatura ambiente. As membranas foram tratadas com o *SuperSignal® System* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) para visualizar as proteínas de interesse através de quimiluminescência. A β -actina (Sigma-Aldrich Corp.) foi usada como controlo interno.

3.3.4. Densitometria

A intensidade relativa das bandas de proteínas foi determinada usando a análise densitométrica do programa Quantity One Version 4.6 (Bio-Rad).

3.4. Análise da expressão do miR-21

3.4.1. Extração do RNA total e RT-PCR em tempo real

Para a extração do RNA total, usou-se 0.5 ml do reagente TRIZOL (Invitrogen Corp.), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA das amostras foi determinada usando um kit de fluorimetria (Qubit, Invitrogen Corp). A expressão do miR-21 foi quantificada por RT-PCR em tempo real, usando-se o snRNA U87 como controlo de normalização. Um *primer*, específico para o miR-21 e para o controlo, foi hibridado com a molécula de miRNA correspondente. Esta foi depois transcrita pela transcriptase reversa MultiScribe da Applied Biosystems. De seguida, os produtos obtidos na transcrição reversa foram quantificados usando-se um PCR TaqMan convencional, de acordo com as especificações do fabricante.

Todas as reações foram realizadas em duplicado. O CT (*threshold cycle*) foi definido como o número do ciclo no qual a fluorescência passa o limite estabelecido. A expressão do miR-21 foi calculada de acordo com o Método Comparativo ($\Delta\Delta CT$). Para tal, calculou-se a média dos vários ensaios e aplicaram-se as seguintes fórmulas: $\Delta CT = \text{Média CT (miR-21)} - \text{Média CT (U64)}$; $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{21} - \Delta CT_C$ e $2^{-\Delta\Delta CT}$ onde o PCR avalia a sobreexpressão ou inibição do miR-21.

3.5. Ensaio da luciferase

Para avaliar a inibição da PDCD4 via miR-21 foi usado o promotor da PDCD4 contendo uma região de ligação ao miR-21 a montante do gene da luciferase - wild-type-PDCD4-3'UTR-luciferase (Asangani *et al.*, 2008). Foi também usada só a região de ligação ao miR-21 denominada 3'UTR miR-21 (Frankel *et al.*, 2008). Os hepatócitos primários foram transfectados com 200 ng destes plasmídeos reporter, ou com um *reporter* controlo (PGL3), usando o reagente de transfeção Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Corp.) de acordo com as instruções do método. As células foram ainda transfectadas com o *reporter renilla* para controlo da eficiência de transfeção. Passadas 6 horas, as placas foram lavadas com meio e incubadas com 25, 50, 100, 200 ou 400 μM de DCA (Sigma-Aldrich Corp.), ou não adição (controlo). Os ensaios *reporter* foram realizados 24, 48 e 72h após a incubação com DCA, usando o Sistema Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega Corp.) de acordo com as especificações do fabricante.

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada usando o teste do t-Student em Microsoft Office Excel 2007. Valores de $p < 0.05$ são considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Modulação dose-dependente da viabilidade de hepatócitos primários de rato pelo DCA

Para estudar o papel modulador do DCA na via do miR-21/PDCD4, começou-se por investigar se a morte celular induzida pelo DCA era dose-dependente. Para tal, hepatócitos primários de rato foram incubados com concentrações de DCA de 25 a 400 μM , durante 24 a 72 h, para análise da citotoxicidade celular através do ensaio da LDH.

Os resultados obtidos às 24 h mostram que existe um aumento significativo de morte celular a partir de doses de DCA de 100 μM , comparativamente ao controlo ($p < 0.05$) (Figura 4). Estes resultados surgem condicentes com estudos em células tumorais, onde o DCA só tem um efeito pró-apoptótico acima dos 100 μM (Milovic *et al.*, 2002).

Quer os resultados obtidos às 48 h, quer os resultados após 72 h de incubação, continuam a mostrar um aumento de morte celular a partir dos 100 μM de DCA, não sendo, no entanto, da mesma ordem de grandeza dos observados para as 24 h (Figura 4). Além disso, após 72 de incubação, a aumento de toxicidade só é significativo para doses de DCA superiores a 200 μM . Isto deve-se, provavelmente, ao facto de estarmos a avaliar a morte celular em comparação com o valor controlo e não devido á diminuição da morte celular ao longo do tempo. Ou seja, os resultados podem ser explicados se tivermos em conta que a quantidade de células a sofrer apoptose, necrose ou outros fenómenos de morte celular, aumenta ao longo do tempo em condições controlo nos hepatócitos (Elaut *et al.*, 2005).

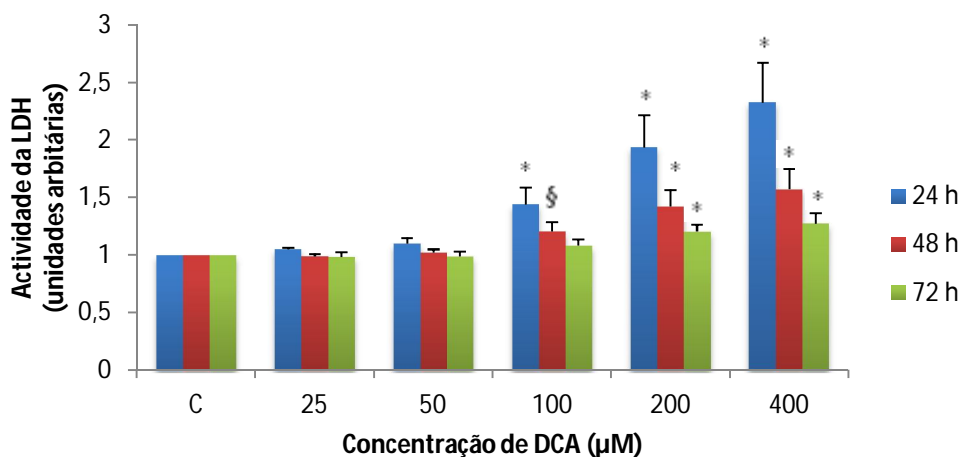


Figura 4 – O DCA diminui a viabilidade celular de hepatócitos primários de rato. As células foram incubadas com 25, 50, 100, 200 ou 400 μM de DCA, ou sem adição (C – controlo), durante 24, 48 e 72 h e a morte celular avaliada através do ensaio da LDH.

Uma outra explicação para o facto de haver uma aparente diminuição da morte celular com o tempo é a possibilidade de se ter ultrapassado o limite de deteção do método. O ensaio da LDH é um método onde se mede a absorvência de um substrato catalisado pelo LDH e, portanto, como todos os métodos que envolvam a medição espectral da absorvência, existem valores a partir dos quais o método perde a linearidade (Ponsoda *et al.*, 1991).

4.2. Modulação dose-dependente do miR-21 pelo DCA

4.2.1. Avaliação por RT-PCR em tempo real

De forma a avaliar se o miR-21 é modulado pelo DCA de uma forma dependente da dose, foi efetuado um RT-PCR em tempo real e quantificou-se a expressão do miR-21. Já foi anteriormente demonstrado pelo nosso grupo que hepatócitos primários de rato, tratados com 100 μM de DCA, apresentam uma expressão diminuída de miR-21, em relação ao controlo (Figura 2 e Castro *et al.*, 2010).

Devido à existência de um aumento de morte celular em todos os tempos em estudo, como foi observado no ensaio da LDH, procedeu-se á determinação da expressão do miR-21 por RT-PCR em tempo real às 48 h.

Os resultados mostram um aumento de expressão do miR-21 em células tratadas com a concentração mais baixa de DCA (25 μM), embora não significativo, assim como uma diminuição do miR-21 com doses superiores a 50 μM , sendo esta diminuição significativa ($p < 0.05$) para concentrações superiores a 100 μM de DCA (Figura 5).

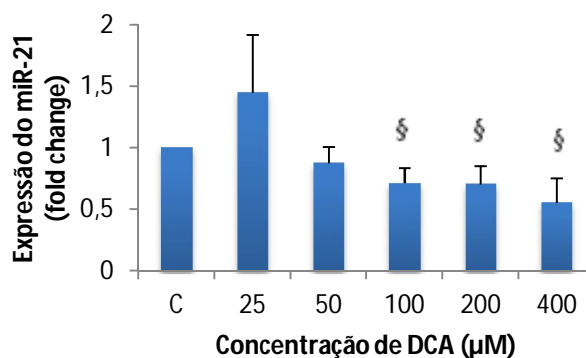


Figura 5 – O DCA modula a expressão do miR-21 em hepatócitos primários de rato. As células foram incubadas com 25, 50, 100, 200 ou 400 μM de DCA, ou sem adição (C – controlo), durante 48 h. A expressão do miR-21 foi analisada por RT-PCR em tempo real.

A diminuição da expressão do miR-21 a partir dos 100 μM de DCA vai de encontro aos dados obtidos com o ensaio da LDH, uma vez que o miR-21 é um

conhecido fator anti-apoptótico. Logo, a diminuição da sua expressão pelo DCA poderá ter um papel no aumento da morte celular verificado para as mesmas concentrações.

Como já foi dito o DCA só promove a morte celular a partir dos 100 μM em células tumorais, sendo que nesse mesmo estudo, concentrações baixas de DCA tiveram um efeito anti-apoptótico (Milovic *et al.*, 2002). Os nossos resultados sugerem que mecanismos semelhantes possam também estar a ocorrer em hepatócitos primários de rato, uma vez que existe uma tendência para aumentar a expressão do miR-21 em concentrações baixas de DCA. Estes resultados sugerem que o DCA, em baixas concentrações, ativa vias proliferativas e/ou de sobrevivência, provavelmente numa tentativa de compensar o seu potencial efeito tóxico, vias essas incapazes de evitar a morte celular para concentrações superiores a 100 μM de DCA.

4.2.2. Avaliação com ensaios com plasmídeos repórter

Como a PDCD4 é um dos alvos principais conhecidos do miR-21 (Asangani *et al.*, 2008) e como já tinha sido mostrado que a expressão do miR-21 é diminuída na presença de DCA (Figura 2 e Castro *et al.*, 2010), decidimos explorar a hipótese do DCA modular a expressão de PDCD4, via miR-21. Para isso, executámos ensaios repórter (luciferase), onde os hepatócitos foram transfetados com um plasmídeo com um sítio de ligação para o miR-21 ou com um plasmídeo controlo. Foram usados dois plasmídeos diferentes. O primeiro tratou-se de um plasmídeo *wild-type*-PDCD4-3'UTR-luciferase, com a sequência promotora do PDCD4 ligada ao gene da luciferase. Esta sequência contém o sítio de ligação do miR-21 (Asangani *et al.*, 2008) (Figura 6). O segundo plasmídeo contém apenas a região de ligação do miR-21 e é denominado 3'UTR miR-21 (Frankel *et al.*, 2008). Os ensaios repórter foram efetuados após 24, 48 ou 72 h de incubação, com as diferentes concentrações de DCA.

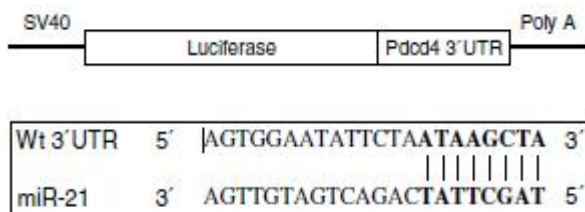


Figura 6 – Estrutura do plasmídeo *wild-type*-PDCD4-3'UTR-luciferase, contendo o promotor da PDCD4 com um sítio de ligação ao miR-21 (adaptado de Asangani *et al.*, 2008).

Os resultados das 24 h foram de encontro aos resultados obtidos previamente nos ensaios da LDH e RT-PCR. Ou seja, contendo os plasmídeos uma região de ligação ao miR-21, o gene repórter (luciferase) só vai ser transcrito se essa ligação não ocorrer. Portanto, quanto menor for a expressão do miR-21, maior vai ser a transcrição da PDCD4 e, conseqüentemente, do gene da luciferase. Às 24 h, os dados

mostram um aumento na atividade da luciferase, com o aumento da concentração de DCA acima dos 50 μM . No caso da incubação com 25 μM de DCA, existe uma ligeira diminuição na atividade da luciferase, o que sugere que concentrações baixas de DCA deverão estar a aumentar a expressão do miR-21, resultados que já tinham sido demonstrados no RT-PCR. Os resultados são relativamente equivalentes, quer se trate do plasmídeo com o promotor da PDCD4 contendo os locais de ligação do miR-21, quer do plasmídeo só com a região 3'UTR miR-21 (Figura 7).

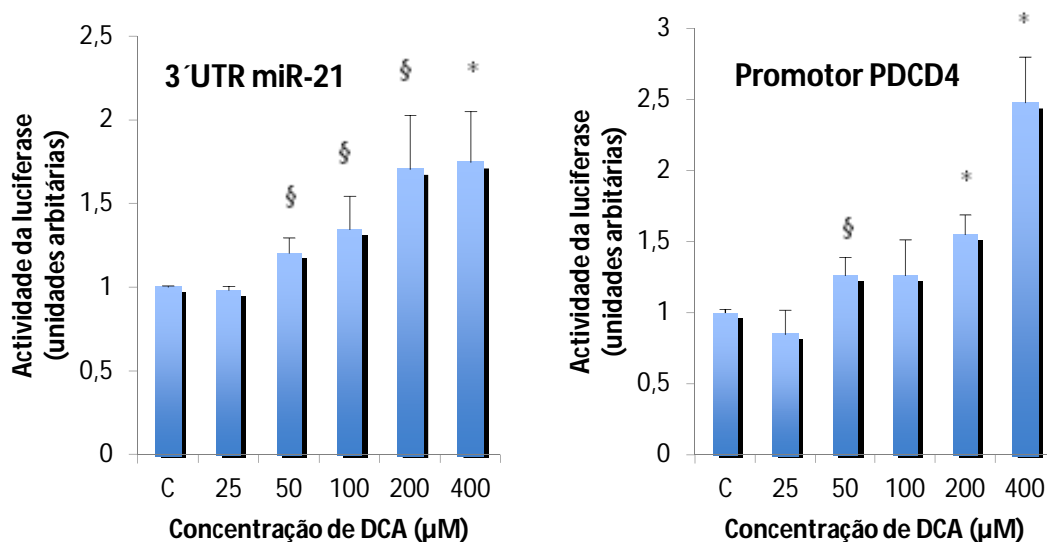


Figura 7 – Modulação da expressão do miR-21 pelo DCA em hepatócitos primários de rato, após 24 h de incubação, avaliada por ensaios *reporter* (luciferase). As células foram transfetadas com o plasmídeo com a região 3'UTR miR-21 (esquerda) ou com o plasmídeo wild-type-PDCD4-3'UTR-luciferase (direita), ou com o plasmídeo PGL3 (controlo). Seis horas depois, as células foram incubadas com 25, 50, 100, 200 ou 400 μM de DCA, ou sem adição (C – controlo), durante 24 h e avaliadas através do ensaio da luciferase.

Curiosamente, quer os resultados das 48 h, quer os das 72 h, não estão condicentes com a ideia de que o DCA promove a morte celular via inibição do miR-21 (dados não mostrados). Atendendo que nos resultados obtidos no RT-PCR após 48 h de incubação com o DCA, ficou demonstrado que concentrações crescentes de DCA diminuem progressivamente a expressão do miR-21, esperar-se-ia que estes ensaios refletissem o oposto. Uma possível explicação para esta discrepância é o facto do ensaio da luciferase ser efetuado com as células aderentes (células vivas ou numa fase inicial do processo de morte celular). Atendendo a que estamos a avaliar uma via molecular que promove a morte celular, é provável que as células que mais expressam esses fatores pró-apoptóticos morram e sejam, progressivamente, dispersas no sobrenadante, pelo que os resultados obtidos poderão ser considerados como estando por defeito. Este efeito é maior às 48 h e, ainda mais, às 72 h,

correlacionando-se com uma maior quantidade de células mortas ao longo do tempo. Ao contrário do ensaio da luciferase, o RT-PCR em tempo real foi efetuado com as células aderentes e com aquelas que estavam presentes no sobrenadante. De forma a validar esta hipótese explicativa dos valores do ensaio da luciferase, voltou-se a fazer um RT-PCR utilizando apenas as células aderentes em cultura, para analisar se continuava a haver diminuição da expressão do miR-21 com concentrações crescentes de DCA. De facto, nestas condições, os resultados mostraram que não existem diferenças significativas entre as células controlo e as células que permanecem aderentes nas caixas incubadas com as várias concentrações de DCA, num padrão concordante com o obtido através do ensaio da luciferase para o mesmo tempo de incubação (Figura 8).

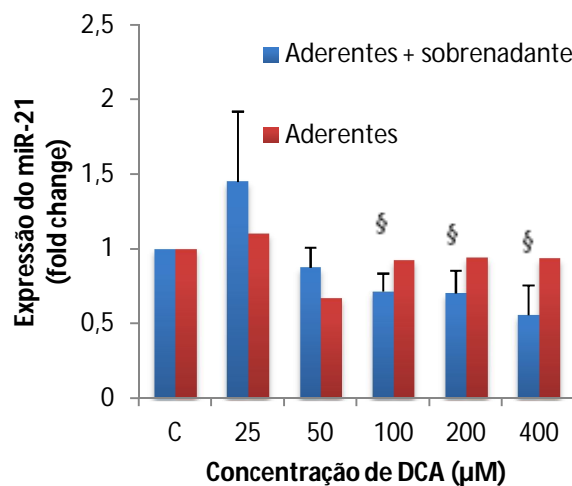


Figura 8 – Comparação da modulação do miR-21 por diferentes concentrações de DCA em hepatócitos primários de rato aderentes e em células totais (aderentes e libertas para o sobrenadante).

Apesar de algum cuidado nesta análise, uma vez que se trata ainda de uma única experiência, estes resultados sugerem que em ensaios da luciferase futuros será importante usar, em conjunto, as células aderentes mais as células mortas presentes no sobrenadante, uma vez que parece que as células com menor expressão de miR-21 serão aquelas que morrem mais rapidamente e se soltam para o sobrenadante. Em alternativa, um outro ponto a ter em atenção em futuros ensaios é efetuar a correção do valor final com a concentração de proteínas presente na amostra, para que os resultados não sejam afetados pelo número de células presentes em cada poço.

4.3. Modulação dose-dependente da expressão da PDCD4 pelo DCA

Um dos objetivos deste estudo era também avaliar se a expressão da PDCD4, um alvo direto do miR-21, era modulada pelo DCA de maneira dose-dependente, de acordo com os resultados obtidos para a expressão do miR-21.

Os resultados foram inicialmente normalizados usando como controlo interno a β -actina, que evita que os resultados sejam afetados por erros de pipetagem,

quantificação e outros. No entanto, foi previamente demonstrado que altas concentrações de DCA poderão promover uma diminuição na expressão da β -actina (Tuchweber *et al.*, 1990), o que está de acordo com os nossos resultados. Sendo assim, os valores de expressão proteica da PDCD4 finais foram corrigidos para erros de *loading* utilizando a coloração de Ponceau.

Dado os resultados anteriores, em termos de diferenças observadas na utilização de células aderentes ou incluindo células dos sobrenadantes, realizámos este ensaio também com os dois grupos experimentais. Atendendo a que a PDCD4 é uma proteína promotora da apoptose, os resultados foram de acordo com o que seria de esperar. A expressão de PDCD4 é visivelmente maior quando se utiliza as células aderentes mais as sobrenadantes. Pelo contrário a expressão de β -actina não parece sofrer grande variação entre os dois grupos, embora diminua progressivamente até a maior concentração de DCA (400 μ M). Já a coloração com o corante de Ponceau mostra uma quantidade significativamente maior de PDCD4 e de proteínas de peso molecular semelhante na utilização de células aderentes mais as sobrenadantes, provavelmente também elas envolvidas nas vias de morte celular (Figura 9).

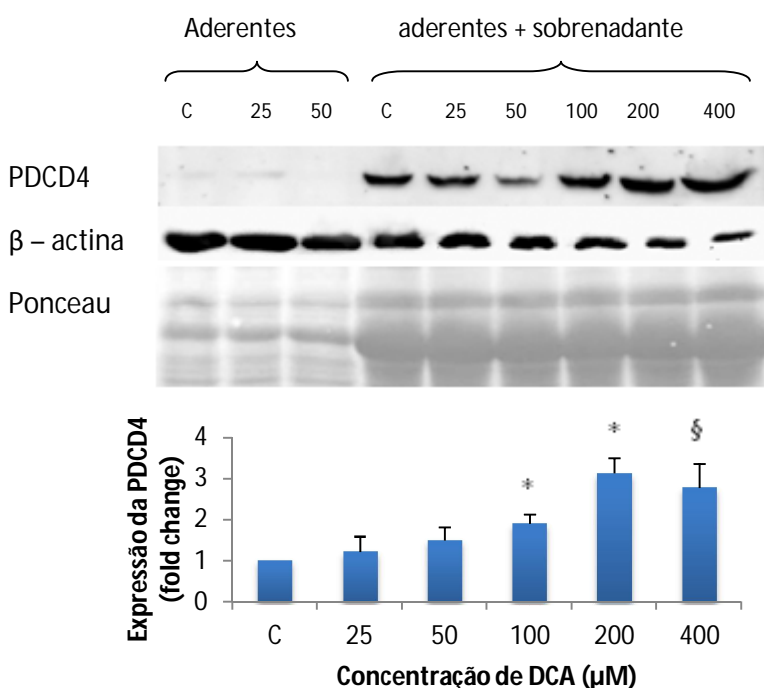


Figura 9. – Modulação da expressão da PDCD4 pelo DCA em hepatócitos primários de rato. As células foram incubadas com 25, 50, 100, 200 ou 400 μ M de DCA, ou sem adição (C – controlo), durante 48 h. Foi feita uma extração de proteínas totais e a expressão foi avaliada através de um Western Blot. As amostras foram normalizadas com o Ponceau e as vezes de variação calculadas através da análise densitométrica.

Em termos quantitativos comprova-se o aumento dos níveis proteicos da PDCD4, quando se aumenta a concentração de DCA. Estes resultados são significativos acima dos 100 μ M de DCA. Em baixas concentrações parece já haver um aumento dos níveis da PDCD4; no entanto esse aumento será, provavelmente, compensado pela ativação simultânea de vias proliferativas e/ou de sobrevivência.

5. Execução financeira

Este projeto teve um custo aproximado de 10.000 euros, tal como previsto, tendo sido desenvolvido em paralelo com outros projetos financiados, em curso no laboratório.. Não foi, ainda, possível fazer os estudos em células hepáticas de ratinhos *knockout* para o gene que codifica o miR-21, devido a um atraso no processo de acasalamento dos animais. Foram, no entanto, concluídos estudos exaustivos de otimização de metodologias e de avaliação de doses e vias de sinalização em células que expressam o gene normal que codifica para o miR-21.

6. Discussão e perspectivas futuras

Sabe-se já há bastante tempo que o DCA promove a apoptose em vários tipos celulares. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis por este facto são vários e muitos permanecem, ainda, desconhecidos ou pouco explorados. Provavelmente, a resposta mais correta passa por um mecanismo global que integra várias vias de sinalização celular. A via da ativação da proteína pro-apoptótica PDCD4 via miR-21 poderá representar uma das vias, até agora pouco explorada. Assim, neste trabalho pretendeu-se avaliar com mais pormenor a ativação da via miR-21/PDCD4 durante o mecanismo pro-apoptótico do DCA em hepatócitos primários de rato e, em particular, averiguar o seu papel funcional em resposta a diferentes concentrações deste ácido biliar.

Estudos prévios do nosso grupo já tinham mostrado uma tendência para, em baixas concentrações, o DCA induzir um ligeiro aumento do miR-21, correspondendo à manutenção da expressão da PDCD4 e a uma baixa toxicidade celular. Isto poderá ser adicionalmente explicado pela ativação de outras vias de sobrevivência celular. Os resultados obtidos quer pelo RT-PCR em tempo real, quer pelo ensaio da luciferase às 24 h, confirmam esta tendência. Para altas concentrações de DCA, pelo contrário, há uma repressão significativa da expressão do miR-21, com um significativo aumento dos níveis de PDCD4, correlacionados com uma morte celular massiva e uma diminuição da proliferação. Ainda assim, como forma de tornar significativas as

conclusões obtidas através dos estudos levados a cabo neste projeto, será importante aumentar o número de experiências, a realizar futuramente.

Outro estudo complementar a estes resultados será a realização de ensaios da luciferase, englobando não só as células aderentes, mas também as células presentes no sobrenadante. Dever-se-á também proceder ao estudo de uma maior gama de concentrações de DCA. A longo prazo, será interessante continuar a caracterizar o papel funcional do DCA na regeneração hepática, um modelo de estudo onde existem fortes estímulos de proliferação celular por mecanismos que podem ser semelhantes aos indutores de carcinogénese.

Com este trabalho, podemos concluir que o DCA induz morte celular, ao mesmo tempo que induz uma repressão da expressão do miR-21 e um aumento da PDCD4, o que poderá, assim, constituir uma via de sobrevivência importante reprimida pelo DCA durante a indução de apoptose. No entanto, com estes ensaios não é possível garantir que esta é a única via molecular modulada pelo DCA, que promove a morte celular dos hepatócitos primários. Será importante realizar estes mesmos estudos utilizando ratinhos *knockout* para o gene que codifica o miR-21, que foram recentemente obtidos pelo nosso grupo, fruto de uma colaboração com a Universidade do Texas, EUA (Patrick *et al.*, 2010). Se os resultados desse estudo não concluírem que a via miR-21/PDCD4 é importante na indução da morte celular pelo DCA, pode-se direccionar o estudo para a caracterização de outras vias conhecidas, como a ativação do receptor de morte DR5 ou TRAIL-R2 (Higuchi *et al.*, 2004).

Será, ainda, importante caracterizar o papel modulador e funcional do DCA sobre a proteína de ativação 1 (AP-1), que parece ser um dos principais alvos da PDCD4. Curiosamente, foi demonstrado que a AP-1 induz a expressão do miR-21, o que a confirmar-se aponta para um mecanismo de *feedback* positivo da via miR-21/PDCD4/AP-1, que parece ter um papel relevante na carcinogénese (Talotta *et al.*, 2009).

7. Bibliografia

Amaral J.D. *et al.*, *Journal of Lipid Research*, 2009: 1721-1734.

Asangani I. A. *et al.*, *Oncogene*, 2008: 2128-2136.

Avraham R. and Yarden Y. *Biochemical Society*, 2012: 26-30

Baptissart M. *et al.*, *Biochimie*, 2012: 1-14.

Cai X. *et al.*, *RNA*, 2004: 1957-1966.

Cameron R. G. *et al.*, *Cancer Research*, 1982: 2426-2428.

Castro R. E. et al., *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 2010: G887-G897

Chan J. A. et al., *Cancer Research*, 2005: 6029-6033.

Chiang, J. Y.L., *Journal of Lipid Research*, 2009: 1955–1966

Corsten M. F. et al., *Cancer Research*, 2007: 8994-9000.

Dey N. et al., *Mechanism of Renal Tumorigenesis*, 2012: 1-16.

Elaut G. et al., *Biochemical Pharmacology*, 2005: 1829–1838.

Frankel L. B. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2008: 1026-1033.

Fujita S. et al., *Journal of Molecular Biology*, 2008: 492-504

Hennebold J. D., *Biology of Reproduction* 2010: 165-167

Higuchi H. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2004: 51–60

Hylemon P. B. et al., *Journal of Lipid Research*, 2009: 50, 1509-1520

Kren B. T. et al., *Liver Transplantation*, 2001: 321-324.

Li T. and Chiang J.Y.L., *Journal of Lipid Research*, 2012

Liu C. et al., *Journal of Hepatology*, 2012: 98-107.

Marquez R. T. et al., *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 2012: G535-G541

Michalopoulos, K. G., *Journal of Cellular Physiology*, 2007: 286-300

Milovic V., D. et al., *European Journal of Clinical Investigation*, 2002: 29-34

Ng R. et al., *Journal of Clinical Investigation*, 2012: 1097-1108.

Nielsen B. S. et al., *Clinical Experimental Metastasis*, 2011: 27–38

Patrick D. M. et al., *Journal of Clinical Investigation*, 2010: 3817-3822.

Perez M. J. et al., *World Journal of Gastroenterology*, 2009: 1677-1689.

Ponsoda X. et al., *Tissue Culture Association*, 1991: 21-24.

Rodrigues C. M. et al., *Journal Clinical Investigation* 1998a: 2790-2799.

Rodrigues C. M. et al., *Molecular Medicine*, 1998b: 165-178.

Rodrigues C. M. et al., *Cell Death and Differentiation* 1999: 842-854.

Song G. et al., *Hepatology*, 2010: 1735-1743.

Tuchweber B. et al., *Life Sciences* 1990: 1299-1307.

Valencia-Sanchez M. A. et al., *Genes and Development*, 2006: 515-524

Yamanaka S. et al., *Digestive and Liver Disease*, 2012: 589– 596

Yi R. et al., *Genes and Development*, 2003: 3011-3016.

8. Financiamento

O trabalho realizado neste projeto foi financiado pelos projetos PTDC/SAU-OSM/102099/2008, PTDC/SAU-ORG/111930/2009, e Pest-OE/SAU/UI4013/2011, da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e pela Bolsa Universidade de Lisboa/Fundação Amadeu Dias.

O Aluno

André Daniel Lopes Simão

A Tutora

Cecília M. P. Rodrigues

Lisboa, 30 de julho de 2012