



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

MARIANA DE VASCONCELOS

**Estudo da Influência de PPAR γ na Conversão Fenotípica de
Células Estreladas Hepáticas – Linhagem GRX**

Porto Alegre, 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

MARIANA DE VASCONCELOS

**Estudo da Influência de PPAR γ na Conversão Fenotípica de
Células Estreladas Hepáticas – Linhagem GRX**

Trabalho de conclusão do curso de graduação
como requisito parcial para obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Costa Rodrigues
Guma

Porto Alegre, 2013

AGRADECIMENTOS

À professora Fátima Costa Rodrigues Guma, pela orientação precisa.

Aos colegas do laboratório 310 do Depto. de Bioquímica, que não só cederam o espaço e os aparelhos necessários para a realização de parte deste trabalho, mas também contribuíram muito para o meu aprendizado em técnicas de Biologia Molecular.

Aos colegas do laboratório 21 do Depto. de Bioquímica, em especial ao Leo Meira, pelo conhecimento que me transmitiu e pela atenção que teve comigo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e ao Roberto Moreira, pelo carinho e pela compreensão dedicados a mim em todos os momentos desta jornada.

RESUMO

A fibrose hepática é uma característica comum de muitas doenças crônicas do fígado e foi definida pelo acúmulo de proteínas de matriz extracelular como resposta a danos crônicos ao órgão. As células estreladas hepáticas (*Hepatic Stellate Cells* - HSC), além de serem responsáveis pelo armazenamento de gotas lipídicas ricas em ésteres de retinol, são as principais produtoras de colágeno no fígado, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática. Nesta condição, as HSC passam a apresentar alterações no conteúdo e no arranjo do citoesqueleto, aumento na taxa de proliferação, desequilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular e, ainda, perda na capacidade de armazenamento de gotas lipídicas, passando de um estado quiescente lipocítico a um estado ativado miofibroblástico. A linhagem celular GRX representa um modelo experimental com características de HSC ativadas. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (*Peroxisomes Proliferator-Activated Receptor* - PPAR) são um grupo de proteínas nucleares que atuam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipídios. Uma das isoformas existentes é o PPAR γ , envolvido na transcrição de proteínas lipogênicas que induzem o armazenamento de gordura por meio da diferenciação adipogênica. As HSC apresentam uma significativa diminuição da expressão de PPAR γ durante a transição para o fenótipo ativado miofibroblástico, o que está relacionado com a perda da capacidade de armazenar gotas lipídicas. Por outro lado, a indução do aumento de expressão do PPAR γ é suficiente para restabelecer diversos marcadores do fenótipo quiescente das HSC, sugerindo grande importância deste fator de transcrição na manutenção do fenótipo quiescente lipocítico. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo estabelecer uma linhagem estável de células GRX superexpressora de PPAR γ para mostrar a relevância deste fator de transcrição em estudos relacionados à fibrose hepática. Para isso, o cDNA de células GRX foi obtido por extração de RNA seguida de transcrição reversa. O gene de PPAR γ foi então amplificado com oligonucleotídeos específicos por PCR e ligado ao plasmídeo pcDNA 3.1. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transfectar células GRX, utilizando-se o reagente Lipofectamine. Os resultados mostraram aumento da expressão de PPAR γ e acúmulo de lipídios nas células transfectadas.

ABSTRACT

Liver fibrosis is a common feature of many chronic liver diseases and was defined by the accumulation of extracellular matrix proteins in response to chronic damage of the organ. The hepatic stellate cells (HSC), besides being responsible for the storage of vitamin A-rich lipid droplets, are the main producers of collagen in the liver and play an important role in the development of liver fibrosis. In this condition, the HSC exhibit changes in content and arrangement of the cytoskeleton, increased rate of proliferation, imbalance between synthesis and degradation of extracellular matrix, and loss of the capacity to storage lipid droplets, switching from a quiescent vitamin A-rich phenotype to a myofibroblastic phenotype, referred as activated HSC. The GRX cell line represents an experimental model with features of activated HSC. Peroxisomes proliferator-activated receptor (PPAR) are a group of nuclear proteins that act as transcription factors regulating the expression of genes involved in lipid metabolism. PPAR γ is one of the isoforms and is involved in the transcription of lipogenic proteins that induce fat storage. HSC show a significant decrease in the expression of PPAR γ during the transition to the activated phenotype, which is related to the loss of the ability to store lipid droplets. On the other hand, the induction of increased expression of PPAR γ restores various markers of the HSC quiescent phenotype, suggesting importance of this transcription factor in the maintenance of quiescent phenotype. Therefore, this study aimed to establish a stable GRX cell line that superexpresses PPAR γ to show the relevance of this transcription factor in studies related to liver fibrosis. For this, the GRX cell cDNA was obtained by extraction of RNA followed by reverse transcription. The PPAR γ gene was then amplified with specific primers by PCR and inserted into pcDNA 3.1 plasmid. The recombinant plasmid was used to transfect GRX cells, using the reagent Lipofectamine. The results showed increased expression of PPAR γ and lipid accumulation in transfected cells.

SUMÁRIO

1.Introdução	07
1.1 Fibrose Hepática e as Células Estreladas Hepáticas (HSC)	07
1.2 Linhagem Celular GRX	10
1.3 PPAR γ : Caracterização e Relação com a Transição Fenotípica das HSC	10
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. Metodologia	13
3.1 Linhagem Celular GRX	13
3.2 Obtenção da Linhagem GRXP γ	13
3.2.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA	13
3.2.2 Ligação do Gene de PPAR γ ao Plasmídeo pcDNA TM 3.1/V5-His TOPO [®] TA	14
3.2.3 Transformação de Células Competentes com o Plasmídeo Recombinante pcDNA-PPAR γ e Análise dos Clones Recombinantes	15
3.2.4 Purificação do Plasmídeo Recombinante pcDNA-PPAR γ	16
3.2.5 Sequenciamento Automático de DNA Plasmidial Recombinante pcDNA-PPAR γ	16
3.2.6 Transfecção de Células GRX	16
3.3 Análise de Morfologia	17
3.4 Expressão da Proteína PPAR γ	17
3.5 Análise do Acúmulo de Lipídios.....	17
3.6 Análises Estatísticas	18
3.7 Descarte de Material Contaminado	18
4. Resultados	19
4.1 Amplificação do Gene de PPAR γ por PCR	19
4.2 Obtenção do Plasmídeo Recombinante pcDNA-PPAR γ e Transformação de Bactérias <i>E. coli</i> JM109	19
4.3 Análises do Sequenciamento Automático de DNA Plasmidial Recombinante pcDNA-PPAR γ	20

4.4 Análise das Células GRX e GRXP γ por Microscopia Óptica	24
4.5 Imunoquantificação de PPAR γ por Western Blot	25
4.6 Análise do Acúmulo de Lipídios	25
5. Discussão	26
6. Conclusão	27
7. Financiamento	28
8. Referências	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIBROSE HEPÁTICA E AS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS (HSC)

As doenças do fígado representam um grande problema de saúde com morbidade e mortalidade significativas. Fibrose e cirrose são consequências da cicatrização hepática em resposta a danos crônicos causados por hepatite viral (especialmente as hepatites B e C), abuso de álcool ou drogas, doenças metabólicas, sobrecarga de ferro ou de cobre, doenças autoimunes ou anomalias congênitas (Friedman, 2003).

Em danos agudos ao fígado, o tecido hepático pode se regenerar por meio de reposição dos hepatócitos. Este processo é associado a uma resposta inflamatória e a uma deposição limitada de matriz extracelular. Quando os danos ao fígado são continuados ou crônicos, ocorre um processo de cicatrização que configura a fibrose hepática (Bataller e Brenner, 2005). A cirrose hepática, estágio final decorrente da fibrose, caracteriza-se pela formação de nódulos e pela função hepática comprometida (Tsukada *et al.*, 2006).

O processo de cicatrização é caracterizado pela deposição excessiva de matriz extracelular, que é composta por três grandes famílias de proteínas: glicoproteínas, proteoglicanos e colágenos. Os colágenos do tipo I e III são os mais comumente associados ao desenvolvimento dessa patologia (Tsukada *et al.*, 2006). O desequilíbrio entre a produção e a degradação de matriz extracelular provoca o acúmulo destas proteínas e gera modificações na arquitetura normal do fígado, o que altera sua funcionalidade (Lotersztajn *et al.*, 2005).

Nos últimos 20 anos, os conhecimentos acerca destas doenças hepáticas têm se desenvolvido muito. Tal evolução reflete o aumento do entendimento sobre a etiologia das doenças crônicas do fígado, sobre os métodos para sua detecção e sobre os mecanismos moleculares que as envolvem (Friedman, 2003). Embora tratamentos antifibróticos eficazes ainda não estejam disponíveis, vários ensaios clínicos têm identificado e avaliado moléculas a partir dos esforços conjuntos de muitos pesquisadores. Além disso, os recentes avanços na fisiopatologia da fibrose hepática estão pavimentando o caminho para a concepção de novas moléculas que interferem em vias regulatórias de células fibrogênicas (Lotersztajn *et al.*, 2005).

A descoberta de que as células estreladas hepáticas (do inglês, *Hepatic Stellate Cells* – HSC) eram as principais produtoras de colágeno no fígado foi o ponto de partida para uma nova etapa de estudo sobre a patogênese, diagnóstico e terapias para a fibrose hepática (Soyer

et al., 1976). As HSC desempenham um papel importante no metabolismo do retinol e na homeostase da matriz extracelular hepática, constituindo uma população celular heterogênea que difere na capacidade de armazenamento de gotas lipídicas contendo ésteres de retinol, na expressão e na organização de filamentos do citoesqueleto e no potencial para produção de matriz extracelular. Atualmente é bastante conhecido o papel das HSC como as principais células produtoras de colágeno nos casos de insultos hepáticos crônicos, o que permite relacioná-las estreitamente com a fibrose hepática (Li *et al.*, 2008).

As HSC estão localizadas no espaço de Disse, sob a camada de células endoteliais do fígado, apresentando longos processos citoplasmáticos que circundam as células endoteliais, fazendo contato com os hepatócitos. Estas células apresentam a capacidade de expressar dois fenótipos. No fígado saudável, as HSC apresentam um fenótipo quiescente, isto é, armazenam gotas lipídicas ricas em vitamina A e apresentam uma baixa taxa de proliferação e de síntese de colágeno do tipo I (Figura 1A). Após uma lesão hepática crônica de qualquer etiologia, as HSC adquirem um fenótipo ativado, diferenciando-se em células miofibroblastóides fibrogênicas e contráteis com alta capacidade de proliferação e de síntese de proteínas de matriz extracelular, perdendo a capacidade de armazenar gotas lipídicas (Figura 1B) (Hautekeete e Geerts, 1997; Friedman, 2000).

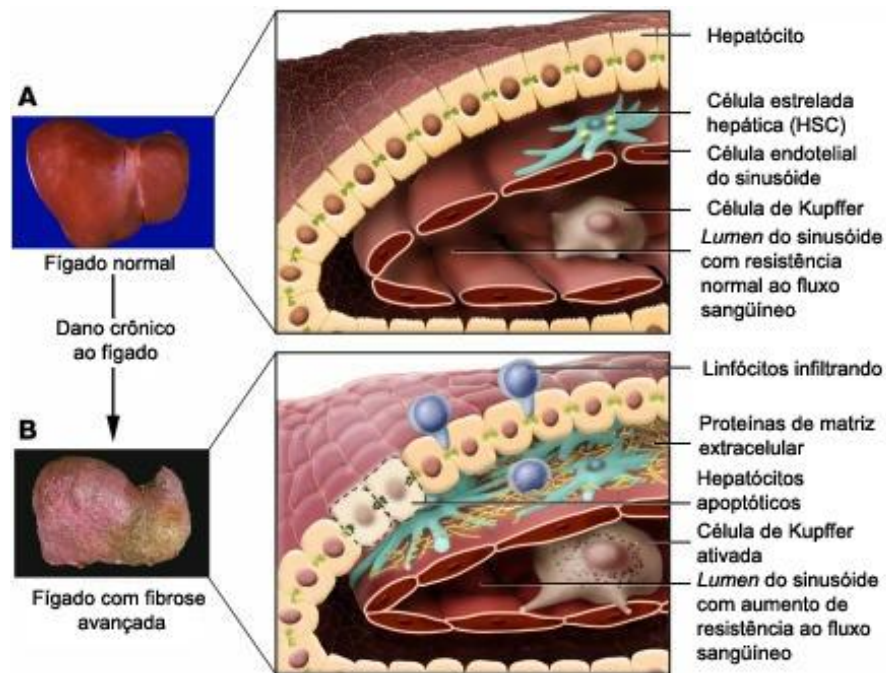


Figura 1: Mudanças da arquitetura hepática associadas ao avanço da fibrose hepática. O processo inflamatório, a ativação das células de Kupffer e a apoptose de hepatócitos liberam fatores de ativação das HSC (Traduzido de Bataller e Brenner, 2005).

A ativação das HSC é uma resposta molecular que pode ser dividida em duas etapas: iniciação e perpetuação (Figura 2). A fase de iniciação corresponde às primeiras mudanças na expressão gênica e no fenótipo celular. Estas alterações respondem a estímulos parácrinos dos tipos celulares vizinhos que incluem os hepatócitos, as células endoteliais, as células de Kupffer, linfócitos e demais leucócitos. A infiltração e ativação das células de Kupffer contribuem para a ativação das HSC, estimulando a produção de matriz extracelular e a liberação de retinóides através da ação de citocinas e da ação de lipoperóxidos, estes últimos, provenientes da geração de espécies reativas de oxigênio (Friedman, 2000; Li *et al.*, 2008).

A fase de perpetuação envolve mudanças no comportamento das HSC, que amplificam seu estado de ativação em resposta aos mesmos estímulos parácrinos da fase de iniciação e a estímulos autócrinos. Tais alterações se referem ao estímulo da proliferação e da produção de matriz extracelular, ao aumento da migração (quimiotaxia), ao aumento de contratilidade (possivelmente relacionado ao aumento da resistência portal durante a fibrose hepática), à alteração na capacidade de degradação de matriz extracelular e à perda das gotas de vitamina A (Friedman, 2000; Li *et al.*, 2008).

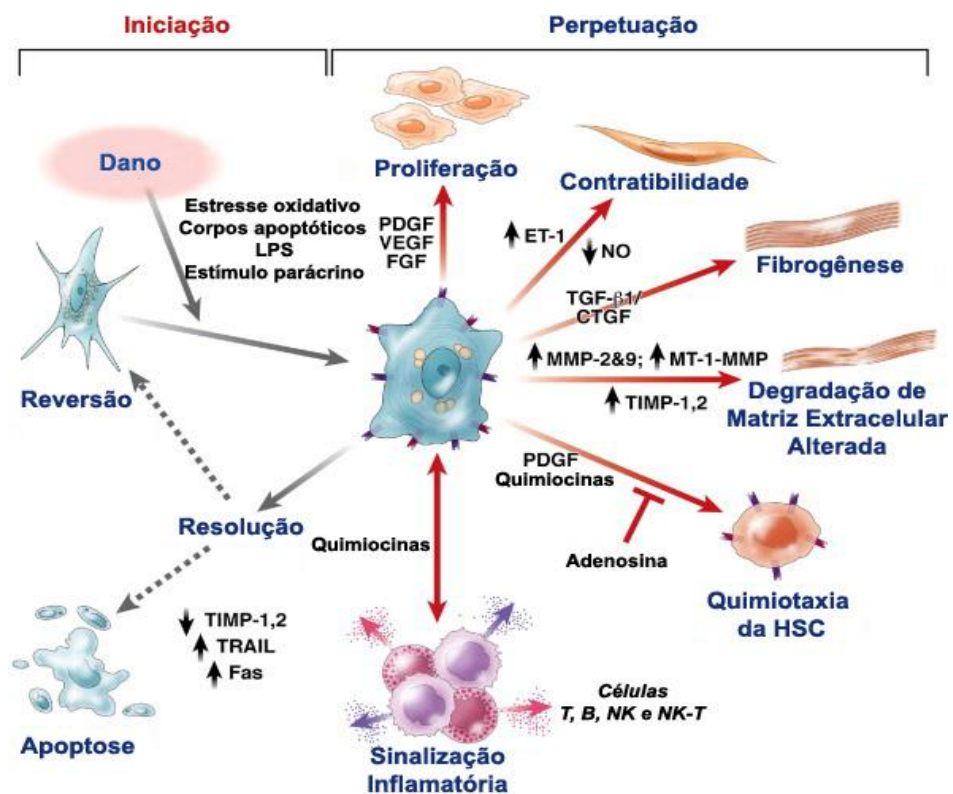


Figura 2: Vias de ativação das HSC. Os aspectos envolvidos na ativação das HSC são distintos nas fases de iniciação e de perpetuação (Traduzido de Friedman, 2008).

Até o momento, não há um tratamento padrão para as doenças relacionadas à fibrose hepática, sendo a remoção do agente causador a intervenção mais efetiva no tratamento da doença. Contudo, nos últimos anos, o crescimento do conhecimento sobre a fibrose hepática revelou alvos potenciais para o tratamento desta patologia. Tais alvos incluem a reversão das células ativadas para o fenótipo quiescente por meio da neutralização das respostas proliferativas, fibrogênicas e contráteis das HSC ou o estímulo à apoptose (Albanis e Friedman, 2006; Li *et al.*, 2008).

1.2 LINHAGEM CELULAR GRX

A linhagem celular GRX foi estabelecida a partir de granulomas induzidos em fígado de camundongos C3H/HeN infectados com *Schistosoma mansoni*. A cultura primária de células desses granulomas gerou esta linhagem celular com características de HSC ativadas (Borojevic *et al.*, 1985).

Esta linhagem celular apresenta características miofibroblastóides e secreta uma complexa matriz extracelular *in vitro*. As células GRX podem ser induzidas a acumular gotas lipídicas por tratamento com retinol ou com indometacina e insulina, adquirindo um fenótipo semelhante às HSC quiescentes (Margis e Borojevic, 1989; Borojevic *et al.*, 1990). Por outro lado, já foi demonstrado que na presença de mediadores inflamatórios, a GRX responde se transformando em um miofibroblasto mais ativado (Da Silva *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2006).

Devido às propriedades mencionadas acima, a linhagem celular GRX é considerada um bom modelo para o estudo dos processos envolvidos no desenvolvimento da fibrose hepática.

1.3 PPAR γ : CARACTERIZAÇÃO E RELAÇÃO COM A TRANSIÇÃO FENOTÍPICA DAS HSC

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (do inglês, *Peroxisomes Proliferator-Activated Receptor* – PPAR) são um grupo de fatores de transcrição que atua regulando a expressão de muitos genes envolvidos com o metabolismo de lipídios e a homeostase da glicose. Trata-se de proteínas ativadas por ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa das quais se conhecem as isoformas PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ . O PPAR γ é

expresso em tecido adiposo e promove a transcrição de proteínas lipogênicas que induzem o armazenamento de gordura por meio da diferenciação adipogênica (Tavares *et al.*, 2007; Desvergne, 2008).

PPAR α é a isoforma mais abundante no fígado, porém as HSC são conhecidas por expressarem a isoforma PPAR γ em que sua inativação pode contribuir para a ativação das HSC e a predisposição à fibrose hepática. Por este motivo, as HSC apresentam uma significativa redução da expressão de PPAR γ durante a transição para o fenótipo ativado miofibroblástico, o que está relacionado com a perda da capacidade de armazenar gotas lipídicas. De maneira oposta, a indução do aumento da expressão de PPAR γ é suficiente para restabelecer diversos marcadores do fenótipo quiescente das HSC, sugerindo um papel de grande importância deste fator de transcrição na manutenção do fenótipo quiescente lipocítico (Reeves e Friedman, 2002; Guimarães *et al.*, 2007).

Souza *et al.* demonstraram que o tratamento com resveratrol (RSV), uma fitoalexina relacionada à prevenção de várias patologias, provocou parada de ciclo celular e apoptose em células GRX. Esse resultado sugere que o RSV, por induzir a morte das HSC ativadas, atue como coadjuvante na resolução da fibrose hepática. Também já foi verificado que, em células GRX induzidas ao fenótipo lipocítico com retinol na presença de RSV, a expressão de PPAR γ e a síntese *de novo* de triglicerídeos foram significativamente reduzidas (Souza, 2009). Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que polifenóis como o RSV podem ativar direta ou indiretamente a proteína SIRT1, envolvida, entre outros processos fisiológicos, na redução de lipogênese através da repressão de PPAR γ (Chung *et al.*, 2010), fato que pode estar relacionado com os efeitos desta fitoalexina nas células GRX.

A descoberta de que a expressão de PPAR γ é modulada durante a ativação das HSC sugere que este fator de transcrição exerce efeitos antifibróticos e ressalta seu envolvimento no desenvolvimento da fibrose hepática (Miyahara *et al.*, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a importância exercida por PPAR γ na manutenção do fenótipo quiescente das HSC, este trabalho teve por objetivo estabelecer uma linhagem estável de células GRX superexpressora de PPAR γ (GRXP γ). Uma vez estabelecida, esta nova linhagem pode ser um modelo importante para futuras pesquisas que busquem esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da fibrose hepática. Além disso, a linhagem estabelecida poderá ser utilizada para avaliar a capacidade do PPAR γ como alvo molecular do tratamento terapêutico desta doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma linhagem estável que superexpresse PPAR γ (GRXP γ);
- Quantificar a proteína PPAR γ nas linhagens GRX e GRXP γ ;
- Induzir a linhagem GRXP γ para o fenótipo lipocítico e comparar a quantidade de triglicerídeos acumulados com relação à linhagem GRX.

3 METODOLOGIA

3.1 LINHAGEM CELULAR GRX

A linhagem celular GRX foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (HUCFF, UFRJ, RJ) e cultivada em DMEM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

3.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM GRXP_γ

3.2.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA

A clonagem do gene de PPAR_γ foi realizada a partir do RNA de células GRX. O RNA total foi extraído com 0,75 mL de Trizol-LS (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA). As amostras foram incubadas com Trizol-LS a temperatura ambiente e, após 5 minutos, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio. Após vigorosa agitação e incubação por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, a fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida a um novo tubo. O RNA foi então precipitado com 0,5 mL de álcool isopropílico e, após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 x g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C e, finalmente, ressuspensas em 10 µL de H₂O Milli-Q livre de RNases (H₂O-DEPC).

A síntese de cDNA por transcrição reversa foi realizada com a enzima transcriptase reversa M-MLV (200 unidades/µL, Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA), utilizando-se 1 µL de oligo-dT₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) e 1 µL de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP, 10 mM) em H₂O destilada estéril até 12 µL, com posterior incubação a 65 °C por 5 minutos. A seguir, as amostras foram resfriadas, e foram então acrescentados todos os reagentes necessários para a transcrição reversa, incluindo 4 µL de tampão 5x (Tris-HCl 250 mM (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNase OUT (40 unidades/µL) e 1 µL de M-MLV. A reação foi realizada em termociclador por 50 minutos a 37 °C. Posteriormente, a enzima foi inativada a 70 °C por 15 minutos. Finalmente, o cDNA foi incubado com 1 µL (2

unidades/ μL) de RNase H por 20 minutos a 37 °C para a degradação da fita de RNA no híbrido DNA-RNA.

3.2.2 Ligação do Gene de PPAR γ ao Plasmídeo pcDNATM3.1/V5-His TOPO®TA

O gene de PPAR γ (número de acesso no banco de dados *GenBank*: NM_011146.3) foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador, utilizando-se 16,9 μL de H₂O Milli-Q, 2,5 μL de tampão 10x (Tris-SO₄ 600 mM (pH 8.9), sulfato de amônio 180 mM), 1 μL de MgSO₄, 1 μL de dNTP 5 mM, 1 μL de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para as sequências de PPAR γ (*primer* direto (PPAR γ D): 5'-TATGGGTGAAACTCTGGGAG-3' e *primer* reverso (PPAR γ R): 5'-CTAATACAAGTCCTTGTAGATC-3'), 0,1 μL de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) e 2,5 μL de cDNA obtido de células GRX (1:10), totalizando um volume final de 25 μL sob as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 51 °C por 1 minuto e 20 segundos, 68 °C por 2 minutos e, finalmente, uma última etapa de 68 °C por 7 minutos.

Após eletroforese, o fragmento de 1769 pb correspondente a PPAR γ foi purificado a partir de gel de agarose (0,8%), por meio do *kit* PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA), e ligado ao plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His TOPO®TA (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) através da seguinte reação: 1 μL de plasmídeo, 2,32 μL do fragmento de PPAR γ , 1 μL de solução salina (NaCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM) e 0,68 μL de H₂O Milli-Q, totalizando um volume final de 5 μL , na proporção de 3:1 (inserto:veter), submetidos à 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e posterior incubação *overnight* a -20 °C (Figura 3).

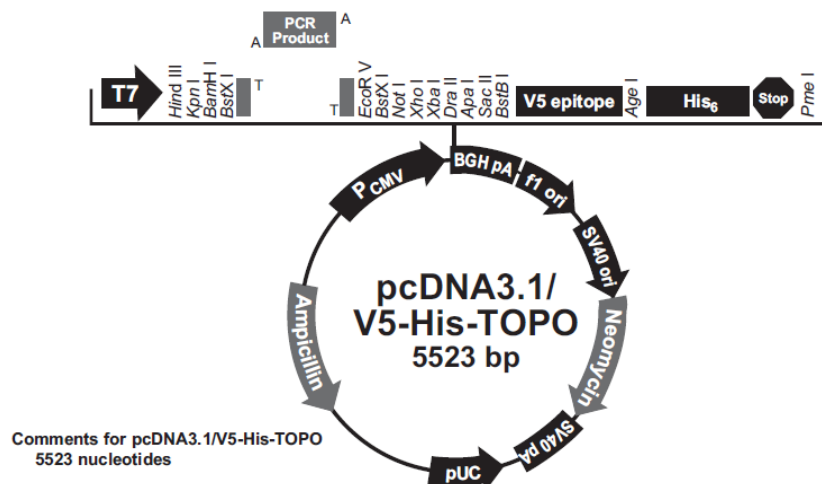


Figura 3: Representação esquemática do plasmídeo pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA. Em destaque na figura, encontram-se os principais elementos do vetor: promotor T7 que permite a expressão gênica do inserto em células de mamíferos, genes de resistência à ampicilina e à geneticina (análoga à neomicina) para seleção de células transformadas e transfectadas, respectivamente, e origem derivada de pUC que proporciona a replicação com alto número de cópias em *Escherichia coli*.

3.2.3 Transformação de Células Competentes com o Plasmídeo Recombinante pcDNA-PPAR γ e Análise dos Clones Recombinantes

Obtido o plasmídeo recombinante pcDNA-PPAR γ , este foi amplificado através de transformação por choque térmico de células competentes de *Escherichia coli* JM109. Para a realização da transformação, foram utilizados dois tubos contendo 100 μ L de células competentes de *E. coli* JM109 armazenados a -80 °C. As células foram descongeladas em banho de gelo durante 30 minutos e uma alíquota de 2 μ L de pcDNA-PPAR γ foi adicionada a cada tubo. Os tubos foram incubados em gelo por 30 minutos. Após este período, os tubos foram submetidos a choque térmico a 42 °C por 2 minutos e imediatamente incubados em gelo. Foram então adicionados 250 μ L de meio S.O.C (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) a cada tubo para recuperação das células, que foram então incubadas por uma hora em estufa a 37 °C com agitação de 200 rpm. Após esta etapa, foram semeados 125 μ L de células em placas de LB Agar contendo ampicilina (50 μ g/ml) para seleção de colônias transformadas, tendo em vista que o plasmídeo utilizado apresenta um gene de resistência a este antibiótico (Figura 3). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

Cada uma das colônias crescidas de *E. coli* JM109 foi coletada e transferida para 30 μ L de meio LB Broth acrescido de ampicilina (50 μ g/mL) com incubação em estufa a 37 °C sob agitação de 200 rpm por uma hora. Após esta etapa, as células bacterianas foram lisadas com auxílio de vórtex por 2 minutos. O diagnóstico das colônias crescidas foi realizado por

PCR, através da seguinte reação realizada para cada uma das colônias: 16,9 µL de H₂O Milli-Q, 2,5 µL de tampão 10x (Tris-HCl 200 mM (pH 8,4), KCl 500 mM), 1 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP 5 mM, 0,5 µL de oligonucleotídeo iniciador específico para a sequência direta do promotor T7 (*primer* T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') presente no plasmídeo, 0,5 µL de *primer* PPAR γ R, 0,1 µL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) e 2,5 µL do lisado bacteriano. O resultado das reações de PCR foi analisado em gel de agarose (1%).

3.2.4 Purificação do Plasmídeo Recombinante pcDNA-PPAR γ

Uma das colônias obtidas foi escolhida aleatoriamente e crescida em meio LB Broth acrescido de ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C sob agitação de 200 rpm *overnight*. Após esta etapa, o DNA plasmidial recombinante foi purificado, utilizando-se o *kit* PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Biofotômetro Eppendorf).

3.2.5 Sequenciamento Automático de DNA Plasmidial Recombinante pcDNA-PPAR γ

Para a confirmação da sequência original do gene de interesse inserida no plasmídeo, excluindo-se a ocorrência de mutações, uma alíquota de 1 µL (248 ng) de DNA plasmidial recombinante purificado foi enviada para sequenciamento automático com o equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. Foram utilizados os *primers* T7 e PPAR γ D.

3.2.6 Transfecção de Células GRX

O plasmídeo recombinante pcDNA-PPAR γ foi utilizado para transfectar células GRX em duas concentrações diferentes, 0,3 e 0,4 µg, por meio de lipofecção. Para isso, as células foram semeadas em placa de 24 poços em uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, visando-se obter confluência entre 60 e 80% no dia da transfecção. Após 24 horas, as células receberam 0,3 ou 0,4 µg de DNA plasmidial recombinante e 2 µL do reagente Lipofectamine (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) diluídos em 200 µL de DMEM livre de SFB e de

antibióticos. Após 5 horas, foram acrescentados 200 µL de DMEM suplementado com 10% de SFB. Células GRX não transfectadas foram utilizadas como controle. Após 72 horas, as culturas transfectadas receberam o antibiótico geneticina (G418) na concentração inicial de 1000 µg/mL durante a fase de seleção, enquanto as células não transfectadas foram mantidas em DMEM suplementado com 5% de SFB. A partir da quarta semana de cultura, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm², e a concentração de G418 foi reduzida à metade (500 µg/mL) e mantida assim durante toda a cultura. Para os experimentos posteriores, foram utilizadas as células GRX transfectadas com 0,3 µg de DNA plasmidial recombinante (GRXPγ).

3.3 ANÁLISE DE MORFOLOGIA

Após a transfecção e a seleção das células transfectadas, culturas de células GRX e GRXPγ foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TE300), em aumento de 200 e 400 vezes, para a análise de morfologia.

3.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PPARγ

A imunoquantificação da expressão de PPARγ foi realizada por Western Blot. Células GRX e GRXPγ foram cultivadas em placas de 6 poços durante 5 dias para atingir a confluência máxima. Após esse período, as amostras foram preparadas em tampão Laemmli e aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS (12%). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas *overnight* com anticorpo específico para PPARγ (Santa Cruz Biotechnology) diluído em tampão de bloqueio na concentração de 1:200. Posteriormente, as membranas foram incubadas por duas horas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A visualização foi realizada por sistema de quimioluminescência (ECL, PerkinElmer). A proteína β-actina foi utilizada como controle constitutivo nas análises.

3.5 ANÁLISE DO ACÚMULO DE LIPÍDIOS

O conteúdo intracelular de lipídios foi avaliado utilizando-se a sonda fluorescente AdipoRed (Lonza Walkersville). Células GRX e células GRXPγ foram induzidas ou não à

diferenciação lipogênica por tratamento com indometacina 13 μM diluída em DMEM suplementado com 5% de SFB. Após 5 dias de cultura, as células foram incubadas com AdipoRed por 30 minutos. A fluorescência foi quantificada em leitor de placas (M5 Molecular Device) com excitação de 485 nm e emissão de 572 nm conforme instruções do fabricante. A dosagem de proteínas foi realizada conforme descrito por Peterson (Peterson, 1979) para a normalização dos dados, e o resultado final foi apresentado em unidades relativas de fluorescência.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Estabelecidos os grupos de análise, foram calculados, quando necessário, a média e o erro padrão para cada um destes. Para estabelecer a comparação entre os grupos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post hoc* Duncan para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou valores de *p* menores ou iguais a 0,05. O software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 18.0 para Windows foi utilizado como ferramenta computacional para a análise estatística.

3.7 DESCARTE DE MATERIAL CONTAMINADO

As placas de cultura contendo resíduos microbiológicos foram devidamente autoclavadas e descartadas em lixo apropriado para materiais infectantes, tendo em vista que não perderam as características de material de laboratório após o procedimento de esterilização. Os demais materiais utilizados como ponteiros e tubos plásticos foram esterilizados em hipoclorito e, posteriormente, descartados em lixo para materiais infectantes.

4 RESULTADOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE PPAR γ POR PCR

O ponto de partida para o desenvolvimento do presente trabalho foi a amplificação de um único fragmento de 1769 pb correspondente ao gene de PPAR γ por PCR realizado a partir do cDNA obtido de células GRX (Figura 4). O fragmento foi então purificado de gel de agarose (0,8%) e utilizado na ligação ao vetor de clonagem e expressão.

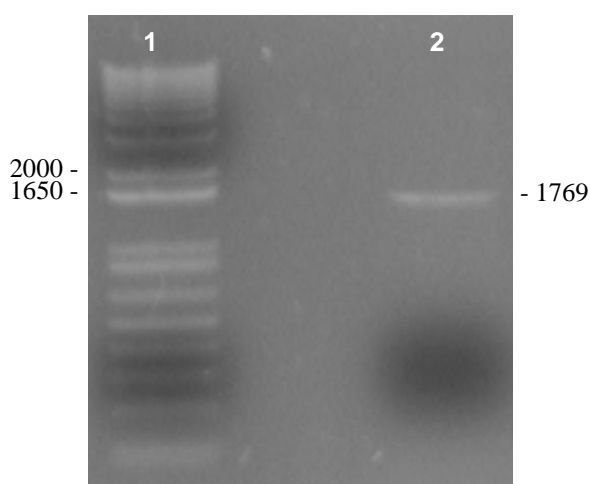


Figura 4: Gel de agarose (0,8%) corado com Sybr Safe e observado sob luz ultravioleta. (1) Marcador de peso molecular (1 kb Plus). (2) Produto de PCR de 1769 pb correspondente ao gene de PPAR γ .

4.2 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pcDNA-PPAR γ E TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *E. coli* JM109

Após a ligação do fragmento correspondente ao gene de PPAR γ ao plasmídeo utilizado como vetor de clonagem e expressão, o plasmídeo recombinante pcDNA-PPAR γ foi clonado por transformação de bactérias *E. coli* JM109. Para se verificar o sucesso da transformação, foi realizado o diagnóstico das colônias selecionadas positivamente em LB Agar contendo ampicilina por PCR, utilizando-se os *primers* T7 e PPAR γ R. Verificou-se a presença de uma banda correspondente à parte da sequência do plasmídeo ligada ao inserto de PPAR γ , na orientação correta em todas as colônias obtidas (Figura 5).

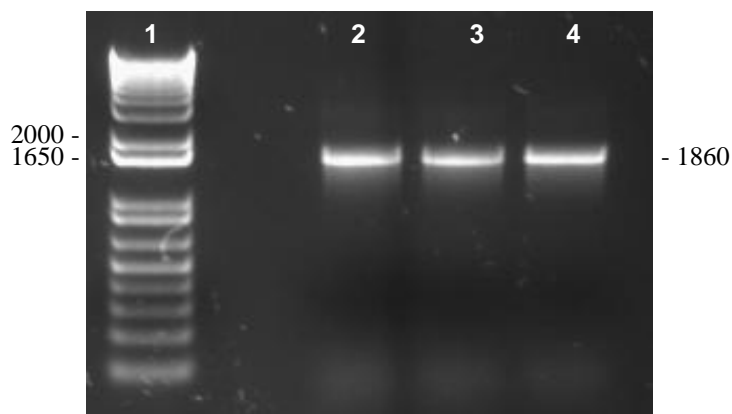


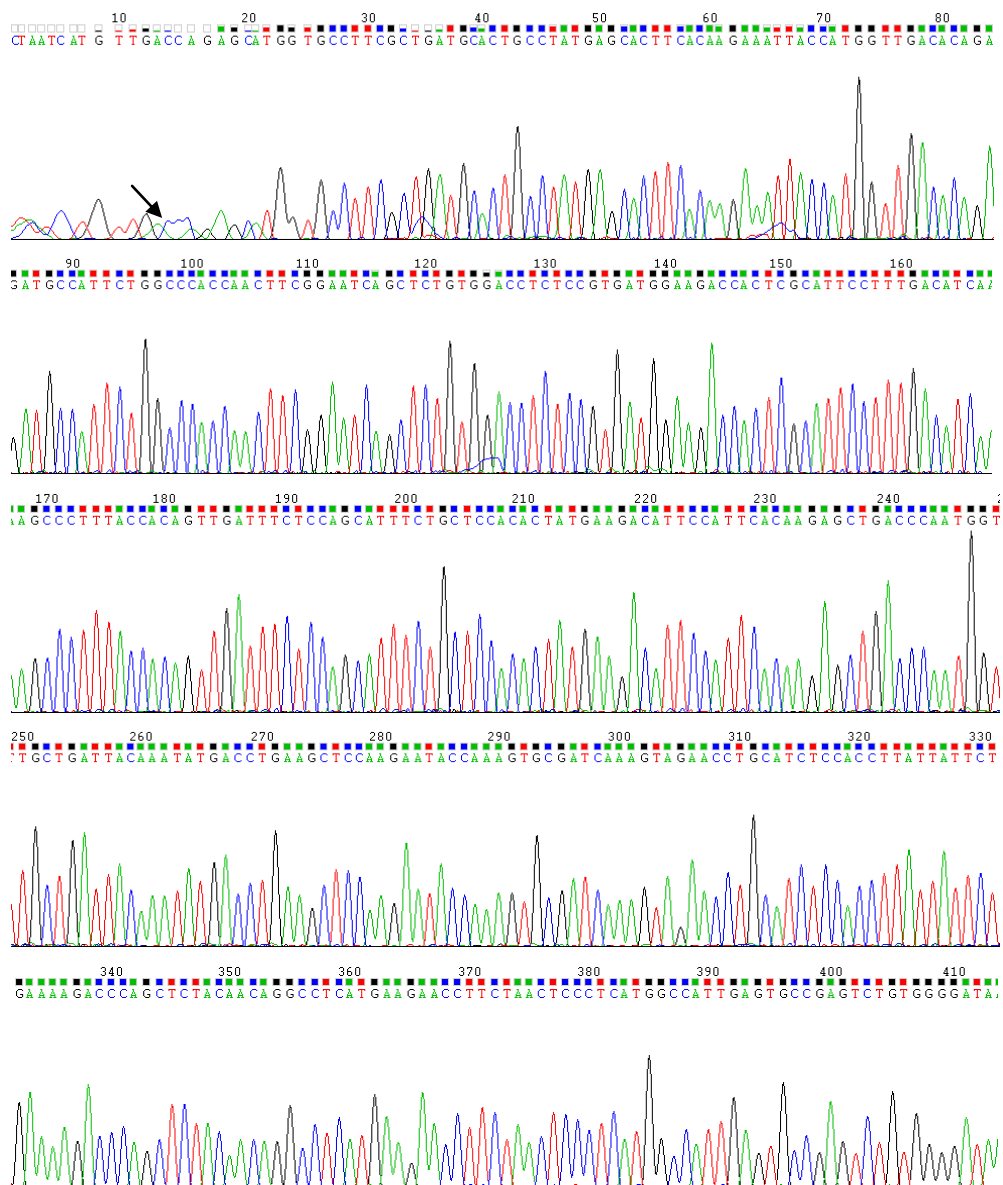
Figura 5: Gel de agarose (1%) corado com Sybr Safe e observado sob luz ultravioleta. (1) Marcador de peso molecular (1 kb Plus). (2, 3, 4) Resultado das reações de PCR referentes às três colônias transformadas com o plasmídeo recombinante pcDNA-PPAR γ contendo uma banda de 1860 pb correspondente à parte da sequência do plasmídeo ligada à sequência do inserto.

4.3 ANÁLISES DO SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE DNA PLASMIDIAL RECOMBINANTE pcDNA-PPAR γ

Para determinar se a sequência do gene PPAR γ havia sido clonada corretamente, foi realizado o sequenciamento automático de uma amostra do DNA plasmidial recombinante purificado, utilizando-se os *primers* PPAR γ D e T7. Os resultados obtidos por sequenciamento automático estão representados tanto na forma de eletrofluorograma, assim como no código de quatro letras A, C, G, T referentes às bases nitrogenadas Adenina, Citosina, Guanina e Timina (Figuras 6 e 7).

Comparando-se a sequência de 763 bases obtida utilizando-se o *primer* PPAR γ D à sequência publicada no banco de dados *GenBank* (número de acesso: NM_011146.3), constatou-se similaridade de 99% com apenas duas deleções e duas bases alteradas a partir da oitava base sequenciada. A ausência de uma citosina entre uma adenina (A13) e outra citosina (C14) observada na leitura do sequenciamento em formato de código, pode não ser de fato uma deleção, tendo em vista que no eletrofluorograma referente a este sequenciamento há um pequeno pico correspondente à base citosina que pode não ter sido capturado pelo aparelho. Com relação à troca de uma guanina por uma adenina (A706) entre uma timina (T705) e uma citosina (C707) observada na sequência obtida em texto, é possível observar a presença de um pico referente à base guanina no eletrofluorograma correspondente e não um pico referente à base adenina, podendo assim se tratar de um erro de leitura do aparelho. Observa-se ainda a troca de uma base timina por uma citosina (C746), e a deleção de uma guanina entre o que deveria ser uma base guanina, que aparece como adenina (A706) no resultado em formato de código, e uma citosina (C707).

Quanto à sequência de 771 bases obtida utilizando-se o *primer* T7, foi constatada a presença de bases específicas para a sequência de PPAR γ somente a partir da sexagésima oitava base sequenciada, tendo em vista que as bases iniciais correspondiam à sequência específica do plasmídeo utilizado como vetor de clonagem e expressão. Por este motivo, a similaridade em relação à sequência publicada no banco de dados *GenBank* (número de acesso: NM_011146.3), foi reduzida para 91%, detectando-se apenas a deleção de uma base adenina entre uma outra adenina (A766) e uma citosina (C767). As bases 70, 71 e 72 correspondem ao códon de iniciação ATG do gene de PPAR γ .



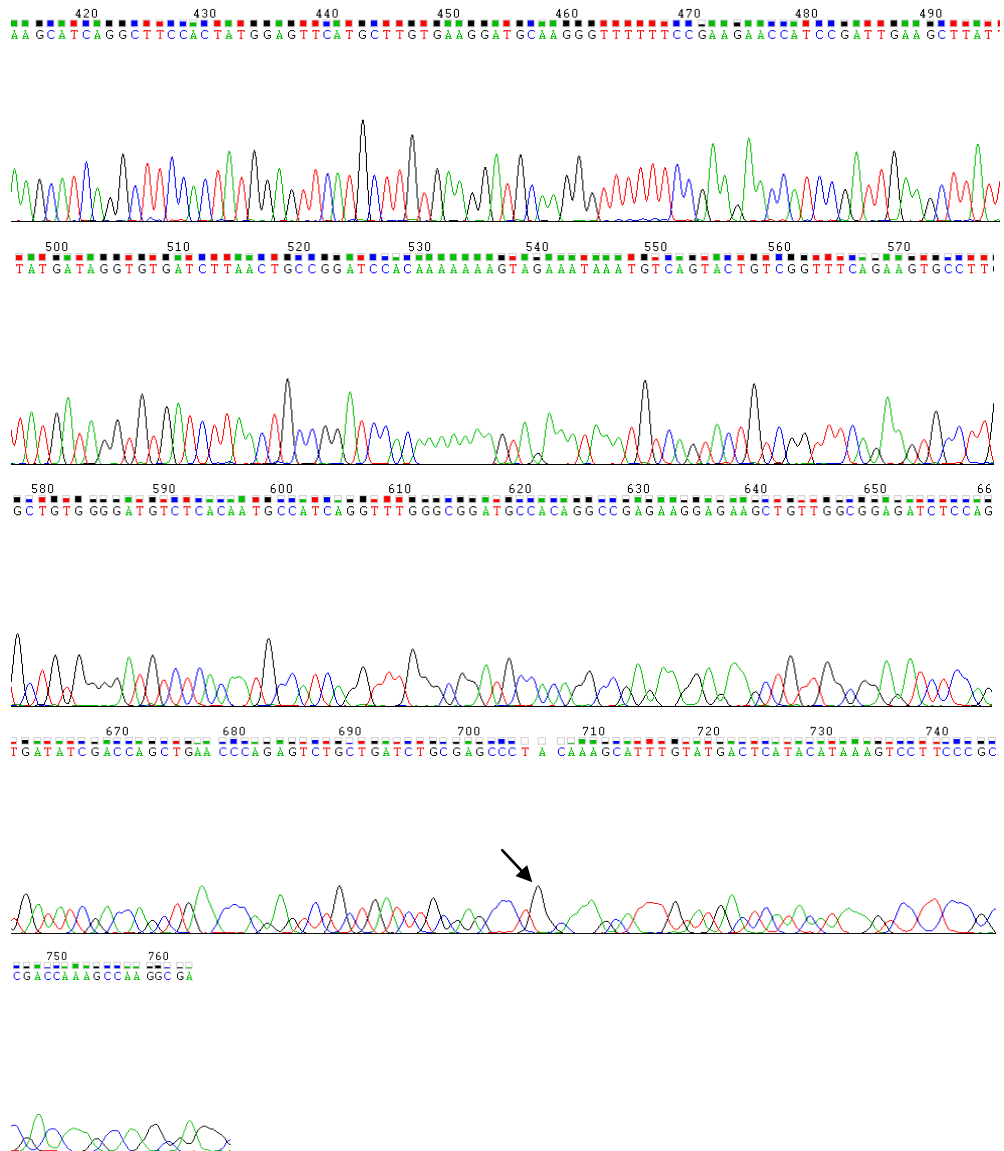
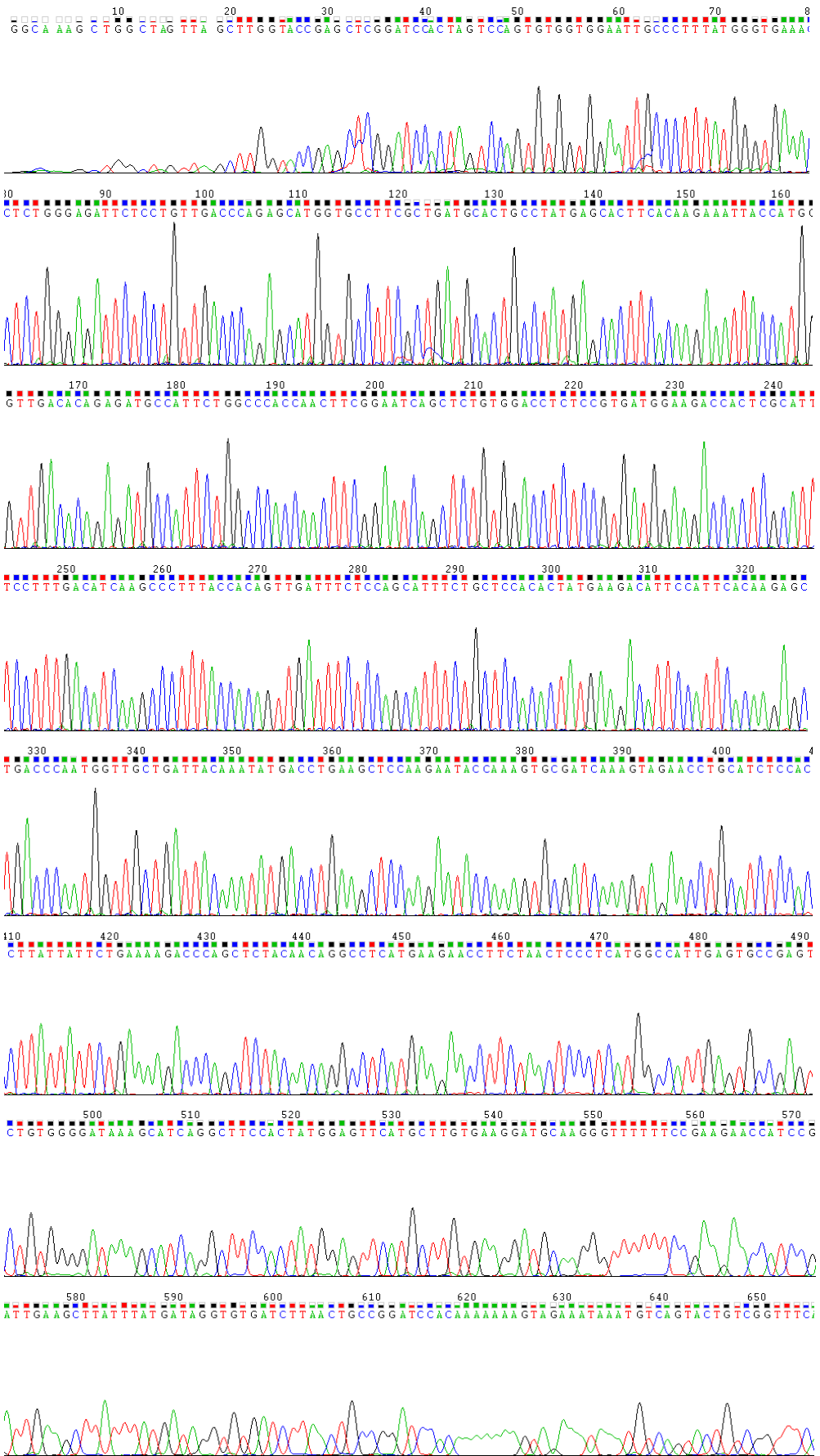


Figura 6: Sequência obtida pelo método de sequenciamento automático utilizando-se o *primer* PPAR γ D em que picos verdes correspondem a adenina, picos azuis correspondem a citosina, picos pretos correspondem a guanina e picos vermelhos correspondem a timina. Por comparação à sequência publicada no banco de dados *GenBank*, foram sequenciadas mais de 750 bases corretas. A primeira seta aponta para um pequeno pico correspondente a uma base citosina ausente na leitura do sequenciamento em formato de código, enquanto a segunda seta aponta para um pico correspondente a uma base guanina que no resultado em formato de código foi trocada por uma base adenina.



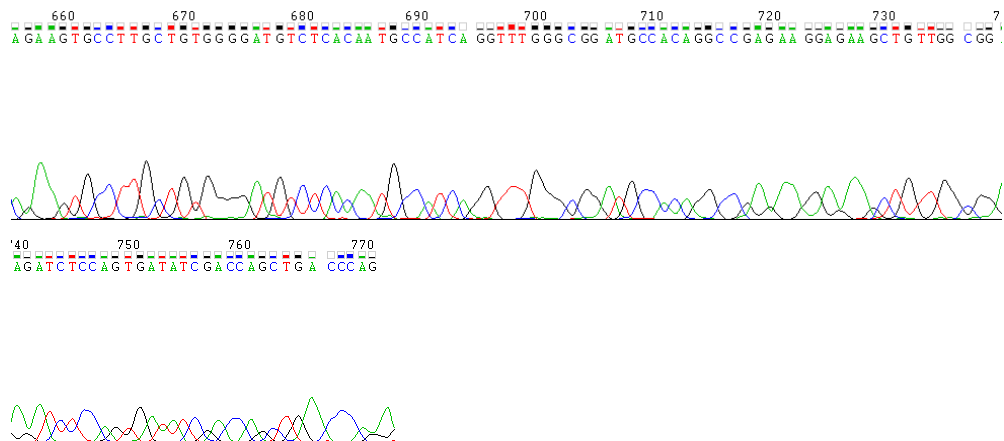


Figura 7: Sequência obtida pelo método de sequenciamento automático utilizando-se o *primer* T7 em que picos verdes correspondem a adeninas, picos azuis correspondem a citosinas, picos pretos correspondem a guaninas e picos vermelhos correspondem a timinas. Neste sequenciamento foi detectada tanto a presença de bases específicas do plasmídeo utilizado quanto do inserto de PPAR γ .

4.4 ANÁLISE DAS CÉLULAS GRX E GRXP γ POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Culturas de células GRX e GRXP γ foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico invertido em aumento de 200 e 400 vezes (Figura 8). As imagens obtidas mostraram que as células GRXP γ foram capazes de acumular lipídios espontaneamente, sem o uso de indutores, em relação às células GRX.

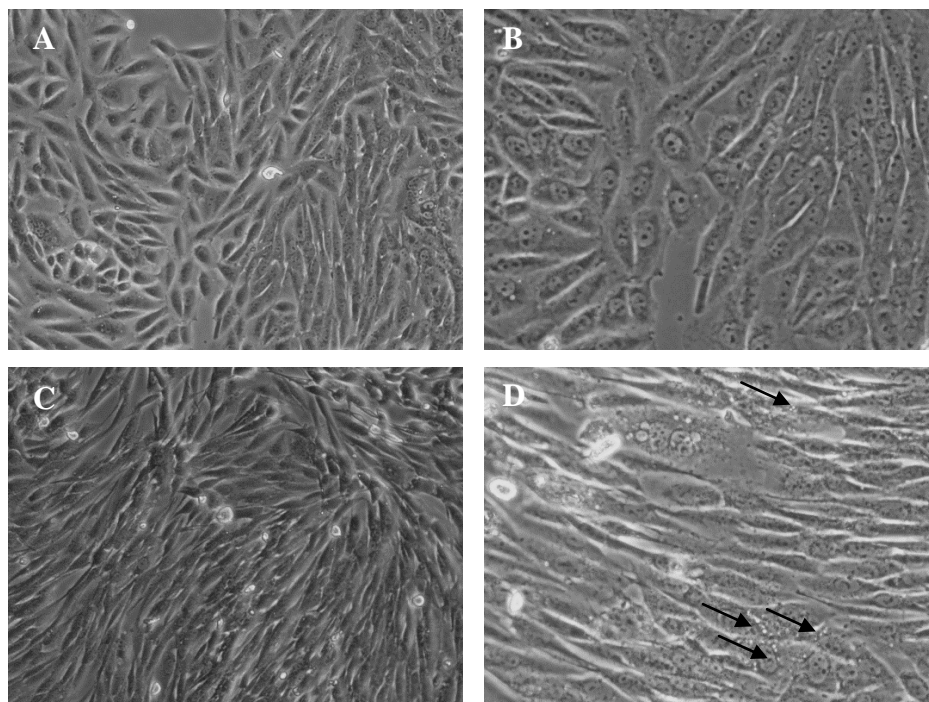


Figura 8: (A, B) Células GRX em aumento de 200 e 400 vezes, respectivamente. (C, D) Células GRXP γ em aumento de 200 e 400 vezes, respectivamente. Setas apontam gotas lipídicas.

4.5 IMUNOQUANTIFICAÇÃO DE PPAR γ POR WESTERN BLOT

A análise por Western Blot revelou um aumento de PPAR γ nas células GRXP γ em comparação às células GRX (Figura 9A). Utilizando-se o *software* AlphaEase FC (Alpha Innotech Corporation), foi obtido o valor de intensidade de pixels das bandas e, assim, calculada a razão entre PPAR γ e β -actina para ambos os grupos, confirmando um aumento de aproximadamente 30% na expressão de PPAR γ nas células GRXP γ .

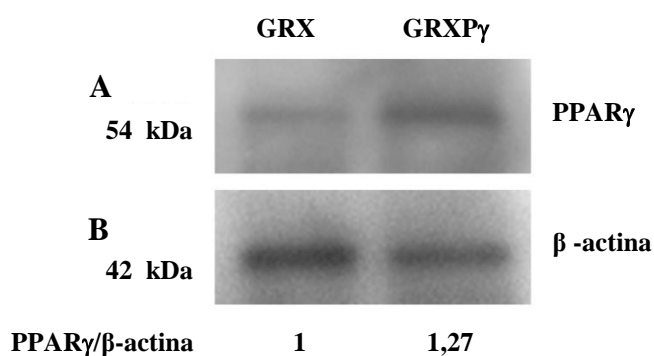


Figura 9: Imunoquantificação de PPAR γ e β -actina por Western Blot em células GRX e GRXP γ .

4.6 ANÁLISE DO ACÚMULO DE LIPÍDIOS

Através da avaliação do conteúdo intracelular de lipídios, utilizando-se a sonda fluorescente AdipoRed, foi possível observar, dentre os grupos analisados, um aumento significativo na formação de gotas lipídicas na linhagem GRXP γ tratada por 5 dias com indometacina em relação às células GRX (Figura 10).

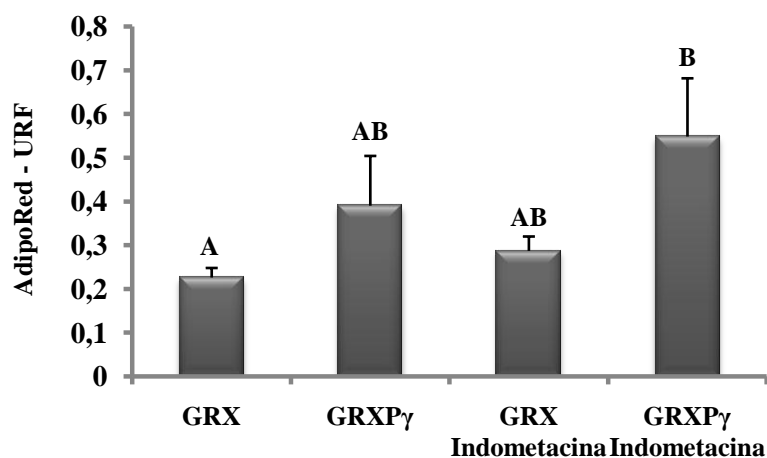


Figura 10: Média \pm erro padrão do acúmulo de lipídios avaliado utilizando-se a sonda fluorescente AdipoRed. Médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p < 0,05).

5 DISCUSSÃO

A introdução de DNA heterólogo em células eucarióticas possibilita uma série de aplicações, tais como: produção em alta escala de proteínas de interesse biológico; inserção de genes em células para que estas adquiram características desejadas, como, por exemplo, a imortalização de cultivos celulares primários a partir de inserção de um gene tumoral; para identificar elementos da sequência de DNA envolvidos no controle da expressão gênica; analisar a manutenção dos genes e sua expressão e a aplicação *in vivo*, como vacinas de DNA e terapias gênicas (Groll, 2003).

Neste trabalho, a partir do método de transfecção, foi possível obter-se a linhagem GRXP γ , superexpressora de um importante gene envolvido na manutenção do fenótipo quiescente em HSC, o gene PPAR γ . Em HSC ativadas, a expressão e a atividade de PPAR γ são reduzidas. Por outro lado, o tratamento com ligantes sintéticos de PPAR γ , como tiazolidinedionas, ou a expressão ectópica de PPAR γ , são suficientes para restabelecer marcadores do fenótipo quiescente e reduzir características relacionadas à fibrose hepática nestas células. Estas evidências sugerem que PPAR γ pode ser um alvo molecular na inibição do estado ativado em HSC (Guimarães *et al.*, 2007).

Hazra *et al.* demonstraram que a restauração de PPAR γ através de transdução mediada por adenovírus em HSC de ratos resulta no reaparecimento de características morfológicas de HSC quiescentes e inibe parâmetros funcionais para a ativação das HSC como o aumento da síntese de DNA e a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), de colágeno tipo I e de TGF β 1. Além disso, a expressão forçada de PPAR γ restaura a habilidade destas células de acumular ésteres de retinol, função específica das HSC quiescentes *in vivo*.

As células GRXP γ , de fato, apresentaram um aumento na expressão de PPAR γ visualizado por Western Blot. Este aumento de PPAR γ foi capaz de restaurar o acúmulo de lipídios nestas células, uma importante característica do fenótipo quiescente. Além disso, as células GRXP γ foram capazes de responder positivamente ao tratamento com indometacina, elevando ainda mais a formação de gotas lipídicas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a hipótese de que PPAR γ é essencial para a manutenção do fenótipo quiescente das HSC, sendo a linhagem GRXP γ uma importante ferramenta para demonstrar a importância deste fator de transcrição em estudos relacionados à fibrose hepática. Entre as perspectivas deste trabalho, encontram-se a realização de novos testes com as células GRXP γ para investigar os mecanismos envolvidos na atuação de PPAR γ na manutenção do fenótipo quiescente das HSC. Pretende-se quantificar os principais marcadores do fenótipo ativado, como colágeno tipo I e α -SMA, e avaliar a proliferação destas células, visando analisar se estes aspectos característicos do fenótipo ativado são inibidos pela superexpressão de PPAR γ .

7 FINANCIAMENTO

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPERGS (Bolsa PROBIC) e do CNPq (Edital Universal 475079/2010-8).

8 REFERÊNCIAS

ALBANIS, E.; FRIEDMAN, S. L. **Antifibrotic agents for liver disease.** Am J Transplant, v. 6, n. 1, p. 12-9, 2006.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. **Liver fibrosis.** J Clin Invest, v. 115, n. 2, p. 209-18, 2005.

BOROJEVIC, R. et al. **Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers.** In Vitro Cell Dev Biol, v. 21, n. 7, p. 382-90, 1985.

BOROJEVIC, R. et al. **In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX.** In Vitro Cell Dev Biol, v. 26, p. 361-8, 1990.

CHUNG, S. et al. **Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols.** Arch Biochem Biophys, v. 501, n. 1, p. 79-90, 2010.

DA SILVA, F. M. et al. **Hepatic stellate cell activation in vitro: cell cycle arrest at G2/M and modification of cell motility.** J Cell Biochem, v. 90, n. 2, p. 387-96, 2003.

DESVERGNE, B. **PPARdelta/beta: the lobbyist switching macrophage allegiance in favor of metabolism.** Cell Metab, v. 7, n. 6, p. 467-9, 2008.

FRIEDMAN, S. L. **Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury.** J Biol Chem, v. 275, n. 4, p. 2247-50, 2000.

FRIEDMAN, S. L. **Liver fibrosis - from bench to bedside.** J Hepatol, v. 38 Suppl 1, p. S38-53, 2003.

FRIEDMAN, S. L. **Mechanisms of hepatic fibrogenesis.** Gastroenterology, v. 134, n. 6, p. 1655-69, 2008.

GROLL, A. V. **Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfeção in vitro de células eucarióticas.** Porto Alegre, 2003. 102 p. Dissertação (Mestrado). Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GUIMARÃES, E. L. et al. **Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line.** *Liver Int*, v. 26, n. 4, p. 477-85, 2006.

GUIMARÃES, E. L. et al. **Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors.** *Liver Int*, v. 27, n. 9, p. 1255-64, 2007.

HAUTEKEETE, M. L.; GEERTS, A. **The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease.** *Virchows Arch*, v. 430, n. 3, p. 195-207, 1997.

HAZRA, S. et al. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells.** *J Biol Chem*, v. 279, n. 12, p. 11392-401, 2004.

LI, J. T. et al. **Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies.** *J Gastroenterol*, v. 43, n. 6, p. 419-28, 2008.

LOTERSZTAJN, S. et al. **Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 45, p. 605-28, 2005.

MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. **Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX).** *Biochim Biophys Acta*, v. 1011, n. 1, p. 1-5, 1989.

MIYAHARA, T. et al. **Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation.** *J Biol Chem*, v. 275, n. 46, p. 35715-22, 2000.

PETERSON, G. L. **Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.** *Anal Biochem*, v. 100, n. 2, p. 201-20, 1979.

REEVES, H. L.; FRIEDMAN, S. L. **Activation of hepatic stellate cells -a key issue in liver fibrosis**. Front Biosci, v. 7, p. d808-26, 2002.

SOUZA, I. C. C. et al. **Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells**. Mol Cell Biochem, v. 315, n. 1-2, p. 1-7, 2008.

SOUZA, I. C. C. **Efeitos do resveratrol sobre as células estreladas hepáticas**. Porto Alegre, 2009. 88 p. Tese (Doutorado). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOYER, M. T.; CEBALLOS, R.; ALDRETE, J. S. **Reversibility of severe hepatic damage caused by jejunoileal bypass after re-establishment of normal intestinal continuity**. Surgery, v. 79, n. 5, p. 601-4, 1976.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. **Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica**. Arq Bras Endocrinol Metabol, v. 51, n. 4, p. 526-33, 2007.

TSUKADA, S.; PARSONS, C. J.; RIPPE, R. A. **Mechanisms of liver fibrosis**. Clin Chim Acta, v. 364, n. 1-2, p. 33-60, 2006.