

INTRODUÇÃO

As células estreladas hepáticas (*Hepatic Stellate Cells* - HSC) são responsáveis pelo armazenamento de vitamina A em gotas lipídicas e, em situações de dano hepático, 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 como aumento na taxa de proliferação, desequilíbrio entre a 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 miofibroblastóide. A linhagem celular GRX é conhecida como um modelo experimental de HSC ativadas. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (*Peroxisomes Proliferator-Activated Receptor* - PPAR) são um grupo de proteínas que atuam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipídios. O PPAR γ estimula a transcrição de proteínas lipogênicas, aumentando a síntese e o armazenamento de lipídios. Durante a transição das HSC para o fenótipo ativado miofibroblastóide, tem sido observada uma significativa redução da expressão de PPAR γ . Várias evidências experimentais relacionam a menor expressão de PPAR γ com a perda da capacidade das HSC de armazenar lipídios. Por outro lado, o aumento de expressão do PPAR γ é suficiente para restabelecer diversos marcadores do fenótipo quiescente das HSC, mostrando a 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 a fim de verificar a relação deste fator de transcrição com a lipogênese em HSC, mostrando sua relevância em estudos relacionados à fibrose hepática.

METODOLOGIA

Células GRX foram obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ,RJ) e cultivadas em DMEM suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino sob atmosfera de CO₂ a 37°C. O RNA foi extraído utilizando-se Trizol, e a síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa. O gene de PPAR γ (número de acesso no banco de dados *GenBank*: NM_011146.3) foi amplificado com *primers* específicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto de PCR purificado de gel de agarose (0,8%) foi ligado ao plasmídeo pcDNA 3.1. O plasmídeo recombinante foi clonado por meio de transformação de células competentes de *Escherichia coli* JM109 e purificado pelo kit PureLink Quick Plasmid Miniprep. Para confirmar a presença da sequência original do gene de interesse no vetor produzido, foi realizado sequenciamento de uma alíquota de DNA plasmidial recombinante. O plasmídeo recombinante foi então utilizado na concentração de 0,3 μ g para transfectar células GRX com o reagente Lipofectamina. Células GRX não-transfectadas foram utilizadas como controle. Após a transfecção, todas as células foram analisadas por microscopia óptica. Para verificar a expressão protéica de PPAR γ , foi realizado *Western Blot*, utilizando-se a proteína β -actina como controle constitutivo. Por fim, realizou-se a comparação do acúmulo intracelular de lipídios nas linhagens GRX transfectada e não-transfectada tratadas ou não com Indometacina, utilizando-se a sonda fluorescente Adipo Red.

RESULTADOS

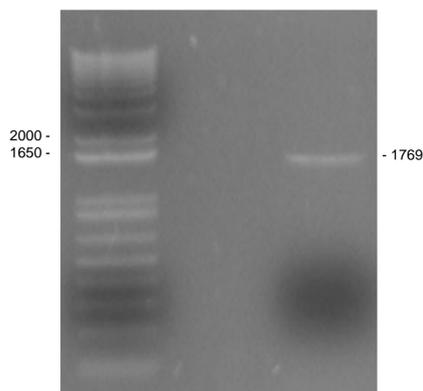


Figura 1: A partir da obtenção do produto de PCR de 1769 pb correspondente ao gene de PPAR γ e purificação de gel de agarose (0,8%), foi possível a ligação do gene de interesse ao vetor de clonagem e expressão.

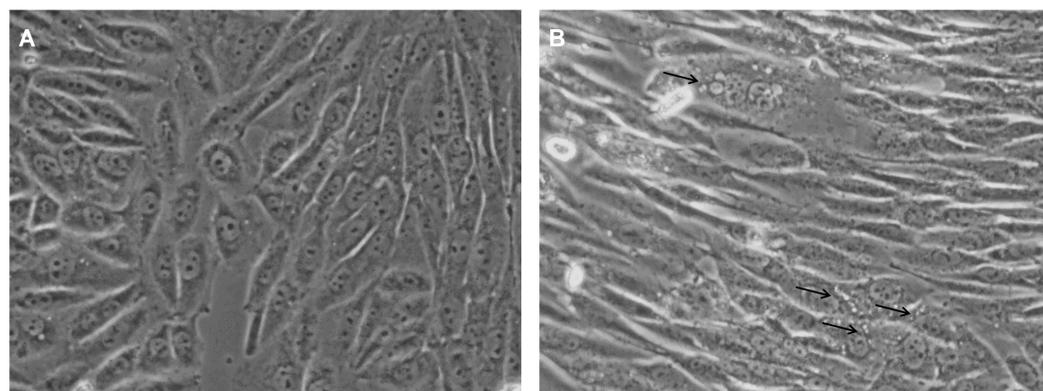


Figura 2: (A) Células GRX em aumento de 400 vezes. (B) Células GRX transfectadas em aumento de 400 vezes. As imagens obtidas por microscopia óptica mostraram que as células GRX transfectadas foram capazes de acumular lipídios espontaneamente, sem o uso de indutores, em relação às células GRX. Setas apontam gotas lipídicas.

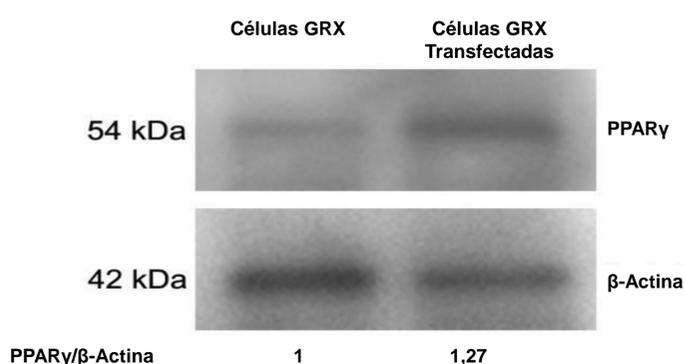


Figura 3: A imunocuantificação de PPAR γ e β -actina por Western Blot em células GRX e células GRX transfectadas revelou um aumento de aproximadamente 30% na expressão protéica de PPAR γ em células GRX transfectadas.

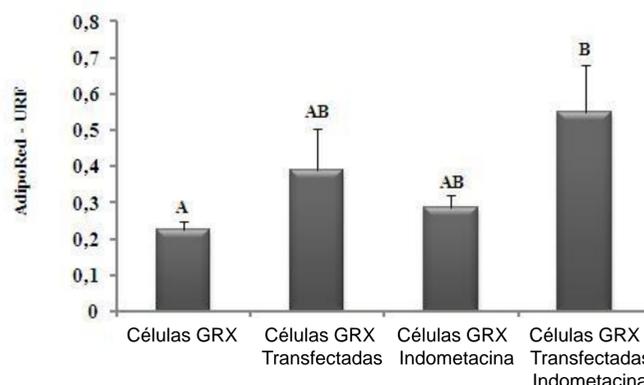


Figura 4: A análise do acúmulo intracelular de lipídios com a sonda fluorescente Adipo Red mostrou aumento significativo de gotas lipídicas nas células GRX transfectadas tratadas com Indometacina em comparação às células GRX. Dados expressos como média e erro padrão; médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) no teste de ANOVA seguido de Duncan.

CONCLUSÕES

Como esperado, a expressão de PPAR γ foi significativamente aumentada nas células transfectadas. Além disso, estas células apresentaram aumento espontâneo do acúmulo de lipídios no citoplasma, mostrando a relação deste fator de transcrição com a lipogênese em HSC, restaurando a formação de gotas lipídicas e corroborando, assim, a hipótese de que PPAR γ exerce um papel de grande importância na manutenção do fenótipo quiescente de HSC.

APOIO FINANCEIRO