

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/03/2025.



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

**ANÁLISE FUNCIONAL DO miRNA-1914-5p NO PROCESSO PRÓ-
ESTEATÓTICO NÃO ALCOÓLICO EM CULTURA CELULAR**

CAMILA CRISTIANE PANSA



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

**ANÁLISE FUNCIONAL DO miRNA-1914-5p NO PROCESSO PRÓ-
ESTEATÓTICO NÃO ALCOÓLICO EM CULTURA CELULAR**

CAMILA CRISTIANE PANSA

Orientadora: Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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

P196a

Pansa, Camila Cristiane

Análise funcional do miRNA-1914-5p no processo pró-esteatótico não alcoólico em cultura celular / Camila Cristiane Pansa. -- Rio Claro, 2023

127 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Biologia Molecular. 2. Cultura de célula. 3. Epigenética. 4. Fígado doença. 5. microRNA. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Análise funcional de genes associados aos processos de acetilação e metilação no metabolismo da doença hepática gordurosa não alcoólica e sua relação com o miR-1914-5p

AUTORA: CAMILA CRISTIANE PANSA

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

COORDINADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Karen Cristiane
Martinez de
Moraes:25703784883
Assinado de forma digital por Karen
Cristiane Martinez de
Moraes:25703784883
Dados: 2023.03.21 18:07:36 -03'00'

Documento assinado digitalmente

Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



MARIO SERGIO PALMA
Data: 22/03/2023 09:29:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES (Participação Virtual)
Departamento de Biociências / Universidade Estadual de Campinas



Documento assinado digitalmente

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participação Virtual)
Departamento de Educação Física / Unesp - IB Rio Claro



ADRIANO POLICAN CIENA
Data: 21/03/2023 18:37:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CLAUDIA APARECIDA RAINHO (Participação Virtual)
Laboratório de Epigenética / Unesp - IB Botucatu



Documento assinado digitalmente
CLAUDIA APARECIDA RAINHO
Data: 22/03/2023 13:37:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio Claro, 21 de março de 2023

Título alterado para:

Análise funcional do miRNA-1914-5p no processo pró-esteatótico não alcoólico em cultura celular

Dedico esse trabalho ao meu companheiro de vida e melhor amigo, Caio. Se não fosse você, a caminhada até aqui não teria sido a mesma. Talvez, infinitamente mais árdua ou impossível.

Ofereço essa tese a minha família, meu pai Rafael e minha mãe Maria, vocês foram a base para o início desse sonho.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por essa benção e por me guiar até aqui, assim como em todos os caminhos e momentos da minha vida, inclusive naqueles mais desafiadores.

A minha orientadora, professora Dra^a Karen C M de Moraes, que durante essa caminhada se demonstrou mais que uma orientadora, uma verdadeira amiga. Meus mais sinceros agradecimentos e gratidão por tudo! Obrigada, te levarei para a vida!

A UNESP de Rio Claro, pelo suporte da pesquisa nesses quatro anos.

A FAPESP processos n° 2013/21186-5 e 2018/05286-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Á minha amiga Leticia Rocha, por sua amizade de anos e por confiar e fazer a ponte para meu ingresso ao doutorado.

Aos meus primeiros amigos de laboratório, aqueles que tornaram minha chegada receptiva, professora Márcia Braga, Murilo Bazon, Isabela Bazon, Lucas Machado, Thais Porto (Lirizinha) e Letícia Ramos, vocês tornaram o início do doutorado leve e alegre.

Aos amigos que vivenciaram cada etapa desse trabalho comigo, que me ajudaram e apoiaram, assim como viveram junto a mim a fase mais difícil da pandemia, e de alguma forma tentamos aliviar as tensões e preocupações um do outro: Indyanara, Leticia Molica, Fabiano e Ana Pimentel. Vocês foram fundamentais. Obrigada pela companhia, amizade, ajuda, e pelas risadas! Com certeza foi essencial durante essa caminhada!

Aos meus grandes amigos, aqueles que me acompanham desde meu início na ciência e que nunca deixaram de acreditar em mim e estiveram a cada minuto do meu lado: Aline (Darlan), Bazani, Daia Ayres, Diego (Chessus), Juanzito Felipe, Le Bazani, Mah Moraes, Mota Bellini, Nah Filippe, Nay Cunha, Paulo Ayres, Paulo (Gegys), Plinio (Pih), Re Robles, Sah Menezes, Tavs Cunha.

À minhas amigas que tanto me aguentaram nesta reta final, que me ouviram e me deram seus ouvidos e ombro amigo em diversos momento que necessitei. Nay Cunha e Nah Felipe, vocês aliviaram momentos e me trouxeram para o eixo em outros. Minhas Double N's, muito obrigada!

À família Duzo (José Roberto Duzo, Maria José Sartorelli Duzo, Fabiola Lais Duzo e Caio Fillipe Sartorelli Duzo), por todo apoio, suporte e pela força que me foi dada nesta reta final do meu trabalho. Definitivamente, foi fundamental! Meus mais sinceros agradecimentos!

A minha irmã de coração, minha prima Fernanda Silva, que sempre esteve ao meu lado, que sempre me apoiou. Você é mais que essencial para mim, você é meu exemplo de ser humano, espero um dia ser metade do que você me representa. Obrigada, minha Nininha!

Aos meus mais novos amigos, aqueles que fiz neste último semestre, salvo o Jorge que já sou amiga a mais de 10 anos, mas que demonstraram tamanha afeição a mim e que foram compreensíveis com minha ausência em diversos passeios e eventos, a fim de finalizar minha tese: Barbara, Dalila, Tatiane, Jamille, Jorge, Lupércio e João, muito obrigada! Obrigada pela força e por me apoiarem!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho. Meu muito obrigada!

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o imenso oceano na verdade continua
misterioso diante de meus olhos”.*

Isaac Newton

Resumo

Nos últimos anos a prevalência das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) tem aumentado no mundo. Esta condição é caracterizada pelo acúmulo desequilibrado de triglicerídeos no interior dos hepatócitos, e sua progressão pode levar a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), cirrose e até mesmo hepatocarcinoma. Diversas são as etiologias que contribuem para o desenvolvimento da DHGNA, dentre elas a obesidade, o diabetes, a genética e epigenética, agrotóxicos, vírus entre outros, o que complica ainda mais o desenvolvimento de terapias eficazes. Atualmente, o único tratamento para esta condição se baseia no estilo de vida e mudança nos hábitos alimentares dos indivíduos. Assim, buscar entender detalhes mecanísticos que subsidiem ao desenvolvimento de novas drogas é pertinente. Dessa maneira o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade funcional do miRNA-1914-5p, baseado em estudos proteômicos e análises bioquímica, na biologia do sistema de células hepáticas em condições de pró-esteatose. As análises dos resultados proteômicos apontaram mecanismos reguladores do ambiente pro-esteatótico, entre os quais, o processo epigenético que foi avaliado em ensaios bioquímicos e análises de expressão gênica (qPCR e *western blotting*). Estas análises evidenciaram que a presença do miRNA-1914-5p no processo de pró-esteatose levou a maior perturbação do equilíbrio celular por aumento das proteínas HSP e a presença da proteína HSP5, sinalizadora de estresse do retículo endoplasmático, além de possível progressão da DHGNA com o aumento da expressão gênica de *MAT2A* e *MAT2B*. Contrariamente, a inibição do miRNA-1914-5p, apresentou atenuar os processos de pró-esteatose por possível aumento das expressões de genes fundamentais da via do 1-carbono (1C) como *AHCY*, *MTHFRD2* e *MTR*, além de apresentar possível consumo exacerbado de GSH, pertencente a via da transsulfuração, anexa a via do 1C, para a recuperação do equilíbrio e homeostasia celular. Em conclusão, a inibição do miRNA-1914-5p, apresentou atenuar a condição de pró-esteatose no modelo de co-cultura por possível atuação na via do 1C e facilitação do consumo exacerbado de GSH. Entretanto mais investigações são necessárias para melhor compreender de fato a atuação deste miRNA na via da do 1C e na via da transsulfuração.

Palavras-chaves: análise funcional, doenças hepáticas, epigenética, miRNA-1914-5p, modelo celular.

Abstract

In recent years, the prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has increased worldwide. This condition is characterized by unbalanced accumulation of triglycerides within hepatocytes, and its progression can lead to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), cirrhosis and even hepatocellular carcinoma. There are several etiologies that contribute to the development of NAFLD, including obesity, diabetes, genetics and epigenetics, pesticides, viruses, among others, which further complicates the development of effective therapies. Currently, the only treatment for this condition is based on lifestyle and changing eating habits of individuals. Thus, seeking to understand mechanistic details that support the development of new drugs is pertinent. Thus, the present work aimed to evaluate the functional activity of miRNA-1914-5p, based on proteomic studies and biochemical analysis, in the biology of the liver cell system under conditions of pro-steatosis. The analyzes of the proteomic results pointed regulatory mechanisms of the pro-steatotic environment, among which, the epigenetic process that was evaluated in biochemical assays and analysis of gene expression (qPCR and western blotting). These analyzes showed that the presence of miRNA-1914-5p in the process of pro-steatosis led to a greater disruption of cell balance due to an increase in HSP proteins and the presence of the HSP5 protein, which signals endoplasmic reticulum stress, in addition to the possible progression of NAFLD with increased gene expression of MAT2A and MAT2B. In contrast, the inhibition of miRNA-1914-5p, attenuated pro-steatosis processes by possibly increasing the expression of fundamental genes of the 1-carbon (1C) pathway, such as AHCY, MTHFRD2 and MTR, in addition to presenting a possible exacerbated consumption of GSH, belonging to the transsulfuration pathway, attaches to the 1C pathway, for the recovery of cellular balance and homeostasis. In conclusion, the inhibition of miRNA-1914-5p, showed to attenuate the condition of pro-steatosis in the co-culture model by possible action in the 1C pathway and facilitation of the exacerbated consumption of GSH. However, further investigations are needed to better understand the actual role of this miRNA in the 1C pathway and in the transsulfuration pathway.

Keywords: functional analysis, hepatic diseases, epigenetics, miRNA-1914-5p, cell model.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG: ácidos graxos

AHCY: adenosil-homocisteinase

AKT: serina treonina proteína quinase

ALT: alanina aminotransferase

AMPK: proteína quinase catalítica ativada por AMP

ANPEP: aminopeptidase N

APOB: apolipoproteína B

APOE: apolipoproteína E

BHMT: betaína-homocisteína S-metiltransferase

CBS: cistationina β -sintase

CES: células endoteliais sinusoidais

-CH₃: metil

CHC: carcinoma hepatocelular

ChREBP: proteína de ligação ao elemento responsiva a carboidratos

CPT-1: carnitina palmitoiltransferase-1

DAMP: *molecular patterns associated with mitochondria-derived damage* (padrões moleculares associados a danos derivados da mitocôndrias)

DHF: dihidrofolato

DHFR: DHR redutase

DM2: diabetes melitus 2

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagles's Medium*

DNMT: DNA metiltransferase

ENO1: enolase 1

ERO: espécies reativas de oxigênio

FA: *fatty acid* (ácido graxo)

FABP: proteínas de ligação de AG

FASN: ácido graxo sintase

FATP: proteínas de transporte de AG

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de alimentos e fármacos)

FFA: *free fatty acids* (ácidos graxos livres)

FOXO1: forkhead box protein O1

GAPDH: gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GCKR: regulador de glucoquinase

GNAT: N-acetiltransferases relacionadas a GCN5

GNMT: glicina N-metiltransferase

GPI: glicose-6-fosfatase isomerase

GSH: glutathione

GWAS: *genome-wide association studies* (estudos de associação do genoma)

H1: histona 1

H2S: sulfeto de hidrogênio

H4: histona 4

HAT: histonas acetilase

HAT1: histona acetiltransferase 1

HCC: hepatocarcinoma

HDAC: histona deacetilase

HDF: *high-calorie fat* (gordura de alto teor calórico)

HDL: *high-density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

HHP: hepatócitos humanos primários

HSC: células estreladas hepáticas

HSD17B13: hidroxisteroide 17 β -desidrogenase

HSP: proteína de choque térmico

IRS-1: substrato do receptor de insulina 1

KLF6: fator 6 semelhante a Kruppel

LDN: lipogênese *de novo*

LPI: fosfatidilinositol

LPIN1: lipina 1

LSEC: células endoteliais sinusoidais

LXR: receptor X do fígado

MAT: *methionine adenosyltransferase* (metionina adenosiltransferase)

MBOAT7: domínio de O-aciltransferase ligado à membrana contendo 7

MDH2: Malato Desidrogenase 2

MEC: matriz extracelular

miRNA: microRNA

MLYCD: malonil-CoA descarboxilase

MMP-2: matriz metalopeptidase 2

MMP-9: matriz metalopeptidase 9

MR-PDFF: *magnetic resonance Imaging* (imagem de ressonância magnética)

MTHFD: metileno-tetraidrofolato desidrogenases

MTHFR: metileno-tetraidrofolato redutase

MTR metionina sintase

MTRR metionina sintase redutase

NAA40: N-alfa-acetiltransferase 40

NAD: nicotinamida e adenina

NAE: N-acil etanolaminas

NAFLD: *non-alcoholic fatty liver disease* (doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas)

NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferase

NASH: *Non-Alcoholic SteatoHepatitis* (esteato-hepatite não alcoólica)

NAT: N-acil taurinas

ncRNA: non-coding RNA (RNA não codificante)

NF-κB: fator nuclear Kappa B

NLRP3: domínio de pirina contém 3

NOD: *nucleotide oligomerization domain*

NPC: células não parenquimatosas

NRF2: *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2* (eritróide nuclear relacionado ao fator 2)

OCA: ácido obetecólico

p300: acetilase transferase p300

PCB: *polychlorinated biphenyl* (bifenil policlorados)

PCG1α: receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa coativador gama

PGAM1: proteínas fosfoglicerato Mutase 1

PGK1: fosfoglicerato quinase 1

PHB1: proibitina 1

PHB2: proibitina 2

PheWAS: estudos de associação em todo o fenômeno

PI: fosfatidilinositol

PIGR: *polymeric immunoglobulin receptor*

PNPLA3: *protein 3 containing patatin-like phospholipase domain*

PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*

PSD3: *Pleckstrin Sec7 domain-containing 3*

PTP1B: *protein tyrosine phosphatase 1B*

PVDF: difluoreto de polivinilideno

RE: retículo endoplasmático

RI: resistência a insulina

ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativa de oxigênio)

SAH: *S-Adenosylhomocysteine* (A-adenosilhomocisteína)

SAM: *S-adenosylmethionine* (S-adenosilmetionina)

SHMT1: serina hidroximetiltransferase

SIRT: sirtuina

SOD2: superóxido dismutase 2

SREBP1c: proteína de ligação de elemento regulador de esterol-1c

TG: triglicerídeos

TGFB1: transformador de proteína induzida por fator de crescimento beta ig-H3

THF: tetraidrofolato

TM6SF2: *transmembrane decoder 6 member of superfamily 2*

TSP: via da transsulfuração

VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa

Sumário

INTRODUÇÃO	16
1.1 Fígado: o motor do metabolismo e modulador da homeostasia.....	16
1.2 Agentes etiológicos da DHGNA.....	18
1.2.1 Obesidade e diabetes no desenvolvimento de DHGNA	19
1.2.2 Genética e epigenética na DHGNA.....	20
1.2.3 Agentes xenobiontes no desenvolvimento de DHGNA	25
1.3 DHGNA: considerações terapêuticas.....	26
1.4 Modelo de estudo de condições pró-esteatóticas: a co-cultura de células hepáticas	29
2 OBJETIVO GERAL	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
REFERÊNCIAS	32

CAPÍTULO I. Non-alcoholic fatty liver disease establishment and progression: genetics and epigenetics as relevant modulators of the pathology	42
--	-----------

CAPÍTULO II. Inibição do miR-1914-5p atenua ambiente pro-esteatótico em modelo de co-cultura de células hepáticas pela modulação de processos epigenéticos e atuação na via do 1- carbono	57
Resumo	59
Abstract.....	60
1 Introdução	61
2 Materiais e métodos	63
2.1 Cultura celular e modelo experimental.....	63
2.2 Análise proteômica.....	64
2.2.1 Obtenção e digestão das amostras proteicas	64
2.2.2 Espectrometria de massa	65
2.2.3 Análises de bioinformática: identificação gênica, enriquecimento de vias e redes de interação proteína-proteína a partir de análises proteômicas.....	65
2.3 Ensaios bioquímicos epigenéticos.....	66
2.3.1 Quantificação da acetilação de histona H3 e H4	66
2.3.2 Quantificação de metilação de histona H3-K4.....	66
2.3.3 Quantificação de metilação global do DNA	67
2.3.4 Quantificação dos níveis de SAM e SAH	67
2.3.5 Quantificação dos níveis de GSH	68
2.4 Ensaios de PCR quantitativo (qRT-PCR).....	68
2.5 Western Blot.....	69
2.6 Gráficos e análises estatísticas	70

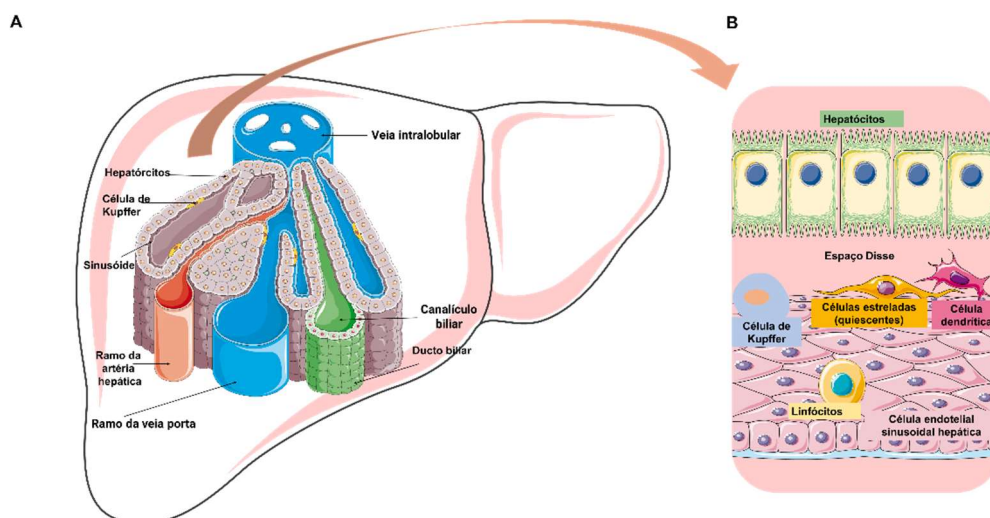
3 Resultados	71
3.1 Análise de estudos proteômicos: abordagem de bioinformática e sua validação funcional.....	71
3.1.1 Análise proteômica de co-cultura de células hepática sugere indução de pró-esteatose no modelo celular incubado com ácidos graxos e sugere atuação do miR-1914-5p em processos epigenéticos.....	71
3.1.2 Redes de interação proteína-proteína sugerem atenuação da via glicolítica e da gliconeogênese após inibição do microRNA1914-5p	76
3.2 Validação dos resultados proteômicos no modelo celular de co-cultura	78
3.2.1 Níveis de acetilação de histonas H3 e H4 aumenta na presença de AG e não apresenta modulação pelo miR-1914-5p.	78
3.2.2 Inibição do miR-1914-5p apresenta atenuação da condição pró-esteatose do modelo de co-cultura por possível atuação na via do 1C.	80
3.2.3 Inibição do miR-1914-5p reduz GSH por possível utilização para o equilíbrio da célula.	81
4 Discussão.....	84
5. Conclusão	88
Referências	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
ANEXO.....	95

INTRODUÇÃO

1.1 Fígado: o motor do metabolismo e modulador da homeostasia

O metabolismo sistêmico é regulado por vias complexas que controlam o gasto de energia e a absorção de nutrientes (PRIEST, C.; TONTONÓZ et al., 2019). Este processo é realizado pela atividade funcional do fígado que é considerado a maior glândula e o segundo maior órgão do nosso organismo (JENSEN-CODY, S. O.; POTTHOFF, M. J., 2021). O fígado possui uma arquitetura em lóbulos hexagonais que permite o desempenho de diversas funções importantes no equilíbrio celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RUI, 2014; TARASENKO; MCGUIRE, 2017). Este órgão está localizado na parte superior direita do abdômen do corpo humano sendo formado por vários tipos de células (ILUZ-FREUNDLICH, 2020) tais como: as células não parenquimatosas (NPCs), que são compostas pelos fibroblastos e células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais (CES), células estreladas hepáticas (HSCs), e por células parenquimatosas como os hepatócitos parenquimatosos e colanginócitos (Figura 1 A) (PANWAR; DAS; TAN, et al., 2021; SHU et al., 2022).

Figura 1. Representação histológica e estrutural do fígado.



(A) Localização estrutural dos compartimentos e das células do fígado (Adaptada do site *Smart Servicer Medical Art* - Disponível em: <https://smart.servier.com/>); (B) Organização histológica do fígado (Adaptada de ROEHLEN; CROUCHET; BAUMERT, 2020 e *Smart Servicer Medical Art*).

As células de Kupffer são os macrófagos que residem no espaço sinusoidal do órgão em proximidade com as células endoteliais. Essas células possuem como função a fagocitose de partículas como bactérias, secreção de moléculas reguladoras do sistema imune e remoção de células senescentes (GIBERT-RAMOS et al., 2021). As células de Kupffer quando ativadas, podem secretar citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando assim uma resposta inflamatória no tecido do fígado (KMIEĆ, 2001; SLEVIN et al., 2021). Já as células endoteliais sinusoidais, contribuem para a formação das paredes

dos sinusoides hepáticos, moldando o sistema vascular endotelial no órgão e formando uma interface entre o fluxo sanguíneo e os outros tecidos que se distingue pela fenestração dos poros que é separada dos hepatócitos pelo espaço subendotelial de Disse (POISSON et al., 2017) (Figura 1B). Este espaço contém uma matriz semelhante a uma membrana basal de baixa densidade que é essencial para manter a função diferenciada de células parenquimatosas e suficientemente poroso para permitir a troca metabólica entre a corrente sanguínea e os hepatócitos (BINATTI et al., 2022). No espaço Disse são encontradas as células estreladas hepáticas (CEHs), que ficam entre os hepatócitos e as células endoteliais sinusoidais. As CEHs, em estados fisiológicos saudáveis armazenam gotículas de lipídeos ricos em retinol no seu citoplasma (SILVA et al., 2020) e contribuem para a produção de matriz extracelular no fígado secretando diversos tipos de colágenos. Atualmente, as CEH são consideradas as principais células envolvidas no processo de fibrose hepática (CAI et al., 2020). Em condições de homeostase, apresentam uma forma quiescente, entretanto, em condições de estresse, estas células podem se tornar ativadas, passando de um estado quiescente para o estado ativado (HIGASHI; FRIEDMAN; HOSHIDA, 2017), perdendo seu armazenamento de retinóides e adquirindo uma morfologia semelhante à miofibroblastos, o que desempenha um papel importante na resposta inflamatória (FRIEDMAN, 2008). Já os hepatócitos, estes constituem >80% das células do fígado e representam o principal atuante dos processos metabólicos do corpo (TRIVEDI; WANG; FRIEDMAN, 2021). Justamente por esta capacidade, os hepatócitos são ricos em organelas, como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, que participam ativamente no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas (OZOUGWU, 2017).

São esses vários tipos de células e estruturas de tecidos que são afetados à medida que o DHGNA se desenvolve e estão envolvidos na progressão da doença em diferentes estágios (BESSONE; RAZORI; ROMA, 2019). Dentre as diversas funções metabólicas do fígado, estão a metabolização de carboidratos, aminoácidos e gorduras, a oxidação de ácidos graxos, o controle dos níveis de colesterol, a ureagênese, desintoxicação de resíduos endógenos e xenobióticos, síntese de proteínas e produção de enzimas digestivas (ILUZ-FREUNDLICH et al., 2020). Além disso, este órgão regula a homeostase sistêmica da glicose por meio da produção hepática de glicose e armazenamento de glicogênio (RODEN; BERNROIDER, 2003). O fígado também fornece cetonas da oxidação de lipídios e lipídios aos tecidos periféricos por meio da produção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Essa regulação da produção, utilização e armazenamento de energia pelo fígado é essencial para manter a homeostase energética fisiológica. Todos esses processos que resultam em funções metabólicas são regulados por mecanismos alostéricos, transcricionais e pós-transcricionais mediados por hormônios, fatores de transcrição e metabólitos celulares

(AGUILERA-MÉNDEZ et al., 2013). A desregulação de qualquer uma das várias vias metabólicas do fígado podem resultar em disfunção e contribuir para o desenvolvimento da doença hepática, principalmente as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (JENSEN-CODY; POTTHOFF, 2021).

1.2 Agentes etiológicos da DHGNA

Dentre as condições patológicas do fígado, as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA), também conhecida como esteatose hepática, se encontra com significativa prevalência no mundo. Estima-se que 1,5 bilhão de pessoas sejam afetadas por doenças crônicas do fígado que eventualmente progridem para fibrose e cirrose (MOON; SINGAL; TAPPER, 2020). Nas condições mais graves da doença, o transplante de fígado é o único tratamento eficaz que melhora radicalmente o desfecho da insuficiência hepática (BRUNO et al., 2021). Atualmente, a nível global, 25% dos adultos (RAMOS et al., 2022) e de 1 a 3% das crianças e adolescentes desenvolvem DHGNA, e a estimativa é de que no futuro essa estatística aumentará para 31% em adultos até 2030 (ESTES et al., 2018; LE GARF et al., 2021; LAZARUS et al., 2022) elevando as preocupações da rede pública de saúde com relação a esta doença.

O termo “doença hepática gordurosa não alcoólica” foi introduzido pela primeira vez por Schaffner e Thaler em 1986 para descrever doença do fígado gorduroso (DFG) que ocorre na ausência de consumo significativo de álcool (KANG ET al., 2021). Esta doença se caracteriza quando lipídios, mais comumente triglicerídeos, são acumulados de forma desequilibrada no interior dos hepatócitos (CAI; ZHANG; LI, 2018). Atualmente a DHGNA é considerada uma doença multifatorial, ou seja, possui fisiopatologia complexa e, embora os estudos de sua compreensão tenham avançado, esta patologia ainda não é completamente compreendida (VACHHER et al., 2022). O desenvolvimento da DHGNA foi inicialmente explicado usando uma “hipótese de dois alvos/ estímulos”, no inglês “*two hits*”, onde o “primeiro alvo” é o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, o que aumenta a vulnerabilidade do fígado ao “segundo estímulo”, que inclui uma variedade de fatores prejudiciais, como estresse oxidativo, polimorfismos genéticos, modificações epigenéticas, apoptose, vias inflamatórias, secreção desregulada de adipocinas e estimulação de células estreladas hepáticas (DAY; JAMES, 1998; TILG; EFFENBERGER et al., 2020). Entretanto, a primeira teoria evoluiu para a “teoria de múltiplos alvos paralelos” da progressão da DHGNA (TILG; MOSCHEN, 2010; WANG et al., 2022), que fornece uma explicação mais precisa da patogênese desta doença. Esta teoria inclui múltiplos processos interligados que se baseiam na resistência à insulina, lipotoxicidade, ativação imune inata, microbioma, genética, bem como dieta (gordura saturada e frutose) e estilo de vida sedentário são os múltiplos fatores que se interligam e levam à progressão da DHGNA (PASCHOS; PALETAS, 2009; ZARGHAMRAVANBAKHSH;

FRENKEL; PORETSKY, 2021). Entretanto, sabe-se que as disfunções metabólicas são acometidas a partir de diversas etiologias (KANG et al., 2021) dentre elas a obesidade e diabetes, que muitas vezes está atrelada a hábitos alimentares pouco saudáveis (PIROLA; SOOKOIAN, 2022) ou condições genéticas dos indivíduos (ESLAM; GEORGE, 2020), fármacos (ARCONZO; PICCININ; MASCHETTA, 2021), agrotóxicos (NAGARAJU et al., 2020) e até infecções por vírus e parasitas (BOECKMANS et al., 2021) que podem ser apontadas como agentes da NAFLD.

1.2.1 Obesidade e diabetes no desenvolvimento de DHGNA

A maioria dos modelos matemáticos de previsão de DHGNA/NASH são baseados na prevalência de obesidade e diabetes (ESTES et al., 2018). Em 2016 o total de 1,9 bilhões de pessoas no mundo estavam acima do peso, sendo que 13% eram obesas (WHO, 2016). Em 2020 a OMS divulgou que 39 milhões de crianças de 5 anos estavam em condições de sobrepeso ou obesas no ano de 2016, e que a população entre a faixa etária de 5 a 19 anos, alcançavam o 340 milhões acometidos pelas mesmas condições (AMORIN; BARBOSA; SOBRAL, 2022). É conhecido que desde 1975, a obesidade mundial quase triplicou (WHO, 2016) e segundo o Atlas da obesidade publicado pela Federação Mundial da Obesidade em 2022, a previsão é de que um bilhão de pessoas em todo o mundo (1 em cada 5 mulheres e 1 em cada 7 homens), estarão com obesidade até 2030 (WOA, 2022). Já, a prevalência global de diabetes se encontra estimada em 536,6 milhões de pessoas na faixa etária de 20 a 79 anos, com uma expectativa para 783,2 milhões em 2045 (SUN et al., 2022). Esses dados reforçam a preocupação com relação ao aumento de pessoas que poderão vir a ser acometidas pela DHGNA e os impactos que essa possível epidemia virá a trazer no futuro para a rede de saúde pública.

Em condições de sobrepeso e de aumento do consumo de uma dieta rica em gordura, leva ao aumento de ácidos graxos (AG) na corrente sanguínea, os quais são captados pelo fígado tanto por difusão passiva quanto por transporte ativo. Neste processo, diferentes proteínas participam desta captação, incluindo a translocase de AG CD36, as proteínas de transporte de AG (FATPs) e as proteínas de ligação de AG (FABPs) (SHEEDFAR et al., 2014; STENERBERG et al., 2015; NASSIR, 2022). O aumento da captação de ácidos graxos acarreta o acúmulo de AGs no interior dos hepatócitos e como consequência leva ao distúrbio das vias metabólicas e resistência à insulina (RI). A RI na obesidade, aumenta a lipólise do tecido adiposo e a liberação de AGs na circulação, aumentando a captação dessas moléculas nas células hepáticas, promovendo lipogênese *de novo* (LDN) por meio do aumento da atividade da glicoquinase e da ativação prejudicada do glicogênio sintase. Este desequilíbrio leva a captura de AGs em excesso, que pode causar lipotoxicidade e a progressão da doença, a partir do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) (WANG et al., 2020). Por sua

vez a produção de EROs, promove a peroxidação lipídica, resultando em lesão de organelas e da membrana celular, e como consequência promove a apoptose. Todo esse processo em paralelo contribui para a progressão da DHGNA para NASH (RADA et al., 2020). As vias metabólicas, assim como os genes atuantes no desenvolvimento da DHGNA, serão discutidas e mais detalhadas no capítulo I desta tese no item: *Lipid metabolism as a relevant mechanism for NAFLD establishment*.

1.2.2 Genética e epigenética na DHGNA

Embora a obesidade seja a maior causa da DHGNA no mundo, estudos tem evidenciado que aproximadamente 20% dos indivíduos com DHGNA, não tem sobrepeso ou obesidade (VILARINHO et al., 2021). A “DHGNA magra”, como ela tem sido chamada, foi relatada pela primeira vez na população asiática e tem sido evidenciada como uma das principais causas de doença hepática que não se conhece sua definitiva origem (VOS et al., 2011; MAIER et al., 2021). YUN et al., 2019, tem associado a microbiota intestinal como um forte agente da DHGNA magra, por observar diferenças consideráveis nos perfis da microbiota entre indivíduos obesos e magros com a DHGNA estabelecida (YUN et al., 2019). Já, YE et al., 2020 em seu estudo de meta análise, observou que o grupo não obeso com DHGNA era mais propenso a ser resistente à insulina, ter concentrações plasmáticas de triglicerídeos elevadas e, quando não diabético, ter um meio metabólico semelhante ao de pacientes obesos com DHGNA. Esses dados evidenciam que além da microbiota, a influência genética pode ter forte correlação com ao desenvolvimento desta doença nos indivíduos magros (DONGIOVANNI; VALENTI, 2016; ESLAM; GEROGGE, 2020; MERONI et al., 2020). A hereditariedade genética tem sido associada no desenvolvimento de doenças hepáticas, tanto pela penetrância gênica, expressividade e até polimorfismos gênicos (CHOUDHARY; DUSEJA, 2021; PANSA; MOLICA; MORAES, 2022). Alguns estudos anteriores demonstraram e relataram a influência de variantes genéticas no desenvolvimento de DHGNA e progressão para NASH (NIU et al., 2019; YUAN et al., 2022). Portanto, a genética pode entrar neste contexto como uma forte candidata para explicar a NAFLD magra, uma vez que, estudos com base em um inquérito prévio sobre consumo alimentar, identificaram que indivíduos não obesos com DHGNA tiveram colesterol substancialmente mais alto e menor ingestão de ácidos graxos poliinsaturados do que os indivíduos obesos com DHGNA (YASUTAKE et al., 2009). Além disso, há também evidências de variações étnicas que também podem contribuir para uma pré-disposição no desenvolvimento desta doença (ZHOU et al., 2019; HUANG et al., 2021; PANSA; MOLICA; MORAES, 2022). Esses fatores citados, devem ser considerados nos estudos sobre o desenvolvimento e progressão da DHGNA.

Conjuntamente com os fatores genéticos, as condições ambientais, como o estilo de vida sedentário e dieta rica em calorias/carboidratos agem como uma força motora para o

desenvolvimento e progressão de doenças hepáticas gordurosas e distúrbio metabólicos (PANSA et al., 2022). Esses fatores ambientais modulam os processos chamados de epigenéticos, os quais são caracterizados por alterações hereditárias e/ou reversíveis na expressão gênica (CHOI et al., 2010; FERNANDES; ERIKA; COUTINHO, 2020). Nos últimos anos, a epigenética tem se despontado como um elemento controlador da expressão dos genes e como consequência modulador da homeostasia celular (ESLAM, 2021; PANSA; MOLICA; MORAES, 2022). Basicamente, a epigenética atua em um organismo pela intermediação de três mecanismos básicos de atuação: modificações no padrão de metilação de moléculas de DNA, modificações no padrão de empacotamento dos cromossomos pelas modificações pós-traducionais de histonas (metilação e acetilação) e atuação de RNAs não decodificadores (miRNAs e RNAs longos e não decodificadores, lncRNAs) (ZHAOU et al., 2018; PANSA; MOLICA; MORAES, 2022).

Considerando o processo de metilação, este é diretamente envolvido com a via do um carbono (1C), que é composto por associação a três vias complementares: via do folato, metionina e transsulfuração (LAI et al., 2019) (Figura 2). A via do 1C sintetiza a molécula S-adenosiltransferase (SAM também conhecida como AdoMet), principal doador de metil para o processo de metilação. Para se chegar a SAM, uma série de reações moleculares entre as três vias acontecem. Iniciando pelo ácido fólico, este obtido através da alimentação é reduzido a dihidrofolato (DHF) pela DHF redutase (DHFR) e em seguida é reduzido para a forma biologicamente ativa, tetrahydrofolato (THF), a qual dá início de fato ao do ciclo do folato (DUCKER, RABINOWITZ, 2017). O THF sofre diversas conversões pela atuação das enzimas: serina hidroximetiltransferase (SHMT), que é dependente de B6 e depois pela enzima metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) dependente de B2, que originam a molécula 5-mTHF. A desmetilação do 5-mTHF completa o ciclo do folato à medida que o 1C é doado para a remetilação da homocisteína (HCY) em metionina (METH; LOCASALE, 2016), pela atuação da enzima metionina sintase (MTR) também dependente de B12. Esta última enzima atua em paralelo interligando o ciclo do folato ao ciclo do 1C. No ciclo do 1C, a metionina também pode ser obtida através da dieta e inicia o ciclo do 1C por sua adenilação pela metionina adenosiltransferase (MAT), que transforma a metionina em SAM (ROJE, 2006). Por sua vez, a SAM sofre a transferência/doação de metil (-CH₃) para o DNA pela atuação das DNA metiltransferase (DNMT), e neste processo a SAM é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH) (ULREY ET AL., 2005), que em seguida é hidrolisada para HCY através de uma reação reversível catalisada pela S-adenosilhomocisteína hidrolase (AHCY) para completar o ciclo da metionina (CAUDILL et al., 2001). Neste momento, ocorre novamente o encontro da HCY com o ciclo do folato através da atuação da MTR. Entretanto, quando os níveis de metionina e folato são suficientes, altos níveis de SAM sintetizado

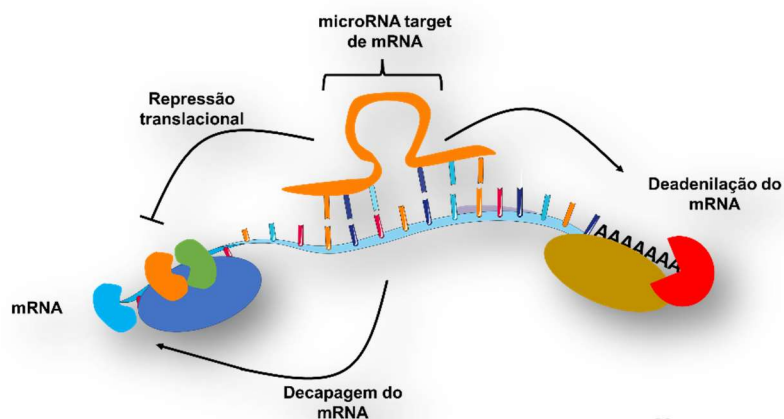
a transcrição gênica por hipometilação ou silenciando por hipermetilação (aumento da metilação) (LEE et al., 2017; LAI et al., 2019).

Um outro processo epigenético atuante no metabolismo hepático é a acetilação de histona. A acetilação é um processo no qual o grupo acetil da acetil coenzima A (Ac-CoA) é transferido para um local específico da histona (DRAZIC et al., 2016), através da atividade das acetiltransferases (HATs) que ao adicionar o grupo acetil ativam a transcrição gênica, enquanto a histonas desacetilases (HDACs) responsável pela deacetilação, ou seja, retirada do grupo acetila da histona leva a inibição dos processos de transcrição (PANSA; RAMOS e MORAES 2022). Este processo compete com processos metabólicos, como a biossíntese de ácidos graxos, uma vez que são dependentes da molécula de acetil-CoA (GALDIERI e VANCURA, 2012). Em mamíferos, o acetil-CoA pode ser produzido a partir de nutrientes como carboidratos, gorduras e proteínas, os quais são reduzidos a partir da atividade de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺) (MENZIES Et al., 2016). Uma restrição calórica, assim como uma dieta rica em gorduras afetam a acetilação das histonas por afetar a disponibilidade de NAD⁺ e como consequência interferir nos processos de acetilação (CHENG et al., 2009; BRAIDY et al., 2011; SU, WELLEN e RABINOWITZ, 2015). Um estudo com camundongos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica apresentaram a diminuição da atividade enzimática da nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT), essencial na síntese de NAD⁺. Portanto, a dieta está intimamente ligada a este processo epigenético. Todos esses dados, até o momento, evidenciam a relação dos processos epigenéticos com a modulação de doenças hepáticas, entretanto, embora muito se tenha aprendido com essas modificações, suas contribuições na regulação do metabolismo ainda necessitam de maior elucidação (RAMOS et al., 2020; STEVANOVIĆ et al., 2020; PANSA; MOLICA; MORAES, 2022).

1.2.2.1 miRNA na epigenética: miRNA-1914-5p

Dentro do contexto epigenético, os miRNAs tem importante atuação, essas pequenas moléculas de RNA não codificantes de cerca de 22 nucleotídeos estão envolvidos na maquinaria de interferência de RNA (RNAi) ligando-se às regiões não traduzidas (UTRs) do mRNA para suprimir a tradução de proteínas ou decair o mRNA (FAN et al., 2013; SUN et al., 2016; LIU et al., 2017). Essa regulação pode acontecer por clivagem de endonuclease, promovendo a repressão da tradução ou acelerando a desadenilação e decapagem do mRNA (Figura 4) (CHEN et al., 2009; SALMENA et al., 2011; SEBASTIAN-DELACRUZ et al., 2021).

Figura 4. Mecanismos de silenciamento gênico mediado por microRNA



Elaborada pela autora da tese, 2023.

Os miRNA moléculas podem atuar como moduladores epigenéticos, visando enzimas-chave responsáveis por reações epigenéticas, como DNA metiltransferases (DNMTs), histonas desacetilases (HDACs) e histonas metiltransferases (SATO et al., 2016; KWA; JACKSON; 2018, LI et al., 2018). Além disso, a expressão de miRNAs também é regulada pela maquinaria epigenética, como a metilação do DNA, modificação do RNA e modificação das histonas. Esses fatores tornam a relação entre miRNAs e a epigenética recíproca, uma vez que a epigenética regula sua expressão e os miRNAs podem regular os processos epigenéticos (YAO, CHEN, ZHOU, 2019). Neste contexto, o miRNA-1914-5p, quando filtrado no banco de dados *Target Scan Human* ([TargetscanHuman 8.0: predicted miRNA targets of miR-1914-5p](https://www.targetscan.org/vert-8.0/predicted_miRNA_targets_of_miR-1914-5p)), foi identificado possuir diversos sítios de ligação com os mRNA de genes atuantes na via do 1 carbono e nos processos de acetilação, tais como: *MTHFR*, *MTHFDL1*, *SET*, *ACHYL*, *BHMT1* e *SHMT1* (via do 1 carbono), Sirtuína 3 (*SIRT3*) e *HDAC2*. O miRNA-1914-5p, também já foi observado no ambiente hepático modulando processos de fibrose em células estreladas hepáticas (DE OLIVEIRA et al., 2018). Portanto, apostar em um aprofundamento detalhado desses mecanismos nas patologias hepáticas torna-se promissor no sentido de se caracterizar elementos chaves que possam subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No capítulo 1 desta Tese são apresentados aspectos detalhados do assunto: genética e os processos epigenéticos na DHGNA no artigo publicado intitulado: *Non-alcoholic fatty liver disease establishment and progression: genetic and epigenetics as relevant modulator of the pathology* (*Scandinavian Journal*, DOI: <https://doi.org/10.1080/00365521.2022.2148835>)

1.2.3 Agentes xenobiontes no desenvolvimento de DHGNA

Dentre os fatores ambientais que modulam e levam ao desenvolvimento da DHGNA, os xenobióticos ou produtos químicos, que são extrínsecos ao metabolismo normal de um organismo, incluindo carcinógenos, drogas, aditivos alimentares, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos e pesticidas, estão sendo cada vez mais reconhecidos como contribuintes para o desenvolvimento de doenças hepáticas (AL-ERYANI et al., 2015; RAJAK et al., 2022). Dentre estes compostos, os pesticidas têm se destacado como causador de uma variedade de problemas de saúde, como desregulação metabólica, obesidade e diabetes (KAHN et al., 2020; NAGARAJU et al., 2020).

O rápido aumento da população global trouxe como consequência maior demanda do fornecimento de alimentos, produtos agrícolas e seus recursos associados. Na busca para superar e atender a esses requisitos, os agricultores optaram por aplicar pesticidas (inseticidas, herbicidas, fungicidas etc.) às plantas agrícolas (LIU et al., 2019). Além disso, esses pesticidas também são continuamente usados na indústria, fazendas de gado e instalações humanas para controlar e erradicar pragas e insetos (BEN-ZUR et al., 2011; DIAUUDIN et al., 2019; LIU et al., 2019). É notório que os pesticidas desempenham um papel crucial nas técnicas agrícolas modernas. Entretanto, a quantidade de constituintes perigosos liberados em corpos d'água e outros nichos ecológicos têm crescido vertiginosamente devido à frequente atividade humana (BILAL; IQBAL; BARCELÓ, 2019; FANG et al., 2020). Recentemente um estudo relatou que países de alta renda como Estados Unidos e emergentes como o Brasil exibem alta dependência do uso de pesticida com um uso anual de 408 e 383 mil toneladas, respectivamente, desses agentes químicos na agricultura (WYCKHUYS et al., 2022). Estes constituintes químicos são persistentes no meio ambiente e ecossistemas, e gradualmente entram nas cadeias alimentares. O contato com esses químicos, por seres humanos, pode levar a problemas de saúde graves, dentre os quais incluem tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, problemas reprodutivos, neurotoxicidade, perturbações do sistema endócrino, danos ao fígado e alterações físicas e de desenvolvimento dos sistemas biológicos (UMAPATHI et al., 2022). Os trabalhadores agrícolas como os agricultores, pulverizadores, misturadores, carregadores, formuladores e pessoas que residem perto das terras onde os pesticidas são frequentemente pulverizados, sofrem de exposição direta. Enquanto as demais pessoas são indiretamente afetadas pela ingestão de frutas, vegetais, alimentos e água contaminados com pesticidas. A absorção de resíduos de pesticidas tóxicos ocorre principalmente através da pele, sistema gastrointestinal e trato respiratório. Devido a esses perigos, a poluição por esses agentes tornou-se um dos desafios globais mais alarmantes (BILAL; IQBAL; BARCELÓ, 2019; FARKHONDEH et al., 2020)

Recentemente, a exposição a pesticidas foi reconhecida como um dos principais contribuintes para o acúmulo de gordura no fígado (JIANG et al., 2022). Estudos tem mostrado uma forte correlação entre os níveis séricos de inseticidas organoclorados, incluindo dieldrin, e os metabólitos de clordano, heptacloro epóxido e trans-nonacloro, com a elevação de alanina aminotransferase (ALT) em pacientes com suspeita de DHGNA (WAHLANG et al., 2020; YANG et al., 2018). Mecanicamente, os inseticidas podem induzir peroxidação lipídica e estresse oxidativo nos hepatócitos e interromper o metabolismo lipídico e da glicose (PEYRE et al., 2012; RAJAK et al., 2022). Além disso, foi comprovada a inibição da atividade de amida hidrolase de ácidos graxos, responsável pela degradação de N-acil taurinas (NATs) que são derivadas de ácidos graxos ômega-3 hipotrigliceridêmicos, da N-acil etanolaminas (NAEs), que incluem atividade sob diversas moléculas biologicamente ativas (GREVENGOED et al., 2021). Também foi observada a inibição da carboxilesterase hepática, que desempenham um papel fundamental na biotransformação de drogas, substratos endógenos e produtos químicos contendo ésteres, amidas, carbamatos ou tioésteres (LIU et al., 2022), além da colinesterase circulante, que atua na clivagem de moléculas maiores, dentre as quais incluem a clivagem de ligações éster em lipídios (ABOUGHAZALA; ANAN, 2020). Outros estudos também observaram que os pesticidas aumentaram a expressão hepática em camundongos obesos da enzima PEPCK, atuante na gliconeogênese promovendo seu aumento (KONDAKALA et al., 2017; HOWELL et al., 2018; YAN et al., 2020). Portanto, esses estudos evidenciam que a exposição crônica a inseticidas pode contribuir para o desenvolvimento da DHGNA (RAJAK et al., 2022), e estudos no sentido de compreender as vias perturbadas por esses agentes químicos, assim como o nível de danos que estes pesticidas causam, podem contribuir para a conscientização e mitigação do seu uso.

Contudo, os dados evidenciados no item 1.2, oferecem evidências de que podem ser diversos os fatores que desequilibram as vias do metabolismo hepático e que contribuem para o desenvolvimento da DHGNA e sua progressão para NASH. Portanto, para minimizar o avanço desta doença, é necessário medidas de prognósticos e o desenvolvimento de medicamento e/ou terapias para atenuar os impactos futuros que a DHGNA poderá trazer à rede de saúde pública.

1.3 DHGNA: considerações terapêuticas

A DHGNA é uma doença hepática cada vez mais presente na população e de crescente morbidade, com estimativa de impactos na saúde pública e na economia, o que tem despertado grande interesse pela busca de tratamentos eficazes (WANG et al., 2022). Embora existam ensaios clínicos de fármacos em andamento, nenhum método ainda foi aprovado (PELECHÁ et al., 2022). Atualmente, o tratamento se baseia na modificação do estilo de vida (PELECHÁ et al., 2022) com abordagens que visam principalmente controlar o

peso corporal e os distúrbios metabólicos (RAZA et al., 2021). Entretanto, vale ressaltar que nem todos os pacientes com DHGNA estão associados à obesidade, e apenas uma proporção de pacientes obesos podem perder peso com sucesso, portanto, esta terapia apresenta limitações (WANG et al., 2022). Contudo, é urgente encontrar medicamentos ou métodos terapêuticos seguros e eficazes para tratar a NAFLD.

Para o desenvolvimento de medicamentos, a etiopatogenia multidimensional da DHGNA deve ser considerada (THIAGARAJAN; AITHAL, 2019), uma vez que os tratamentos se concentram no controle das diferentes vias implicadas na progressão desta doença, como inflamação crônica, resistência à insulina e fibrogênese (XU et al., 2022). Portanto, o aprofundamento no conhecimento dos diferentes mecanismos moleculares que levam a DHGNA se faz necessário para contribuir com estudos da fisiopatologia da doença e identificar novos alvos terapêuticos (RAMOS-LOPEZ et al., 2022). Atualmente, os medicamentos em fase de testes são moléculas que tem como alvo vários aspectos da disfunção metabólica, incluindo lipotoxicidade, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e fibrose (NASSIR 2022). Alguns destes são agonista de mRNAs, como do receptor farnesóide X, ácido obeticolico (OCA), o agonista do receptor de hormônio tireoidiano $THR\beta$ (Resmetirom) e o Aramchol (ácido biliar e conjugado de FA, ácido cólico-ácido araquídico), são drogas atualmente em fase 3 de ensaios clínicos randomizados para o tratamento de DHGNA e NASH não cirrótica (ALKHOURI et al., 2021; NASSIR, 2022).

Nos últimos anos, estudos tem sugerido a utilização dos microRNAs como possíveis alvos terapêuticos no tratamento da DHGNA (FANG; DOU; WANG, 2021; RUSU et al., 2022), principalmente por sua atuação na regulação da tradução gênica. Além disso, tem sido relatada que cada miRNA tem como alvo centenas de mRNAs (SELBACH et al., 2008). Acredita-se que mais de 30% dos genes humanos sejam alvo de miRNAs, o que significa que os miRNAs têm um impacto global nos transcriptomas e proteomas de eucariotos (VASUDEVAN et al., 2007; ORANG et al., 2014). São diversos os miRNAs descritos e caracterizados em bancos de dado, como na plataforma miRbase (<http://www.mirbase.org>), que contém aproximadamente 2000 miRNAs em seu banco de dados que são classificados com diferentes processos metabólicos e o metabolismo lipídios (CAI; LIN; YU, 2019). Vários estudos apontam a atuação dessas pequenas moléculas na lipogênese *de novo*, na modulação da oxidação lipídica e mesmo na captação/exportação de tais metabólitos pelo fígado. Na Figura 5 resume várias das atuações metabólicas de diversos miRNAs no metabolismo hepático e relacionados ao desenvolvimento de DHGNA (HAN; KAUFMAN, 2016; GJORGJIEVA et al., 2019).

Figura 5. MiRNAs já identificados e atuantes nas vias metabólicas da patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e da esteatohepatite não alcoólica (NASH).

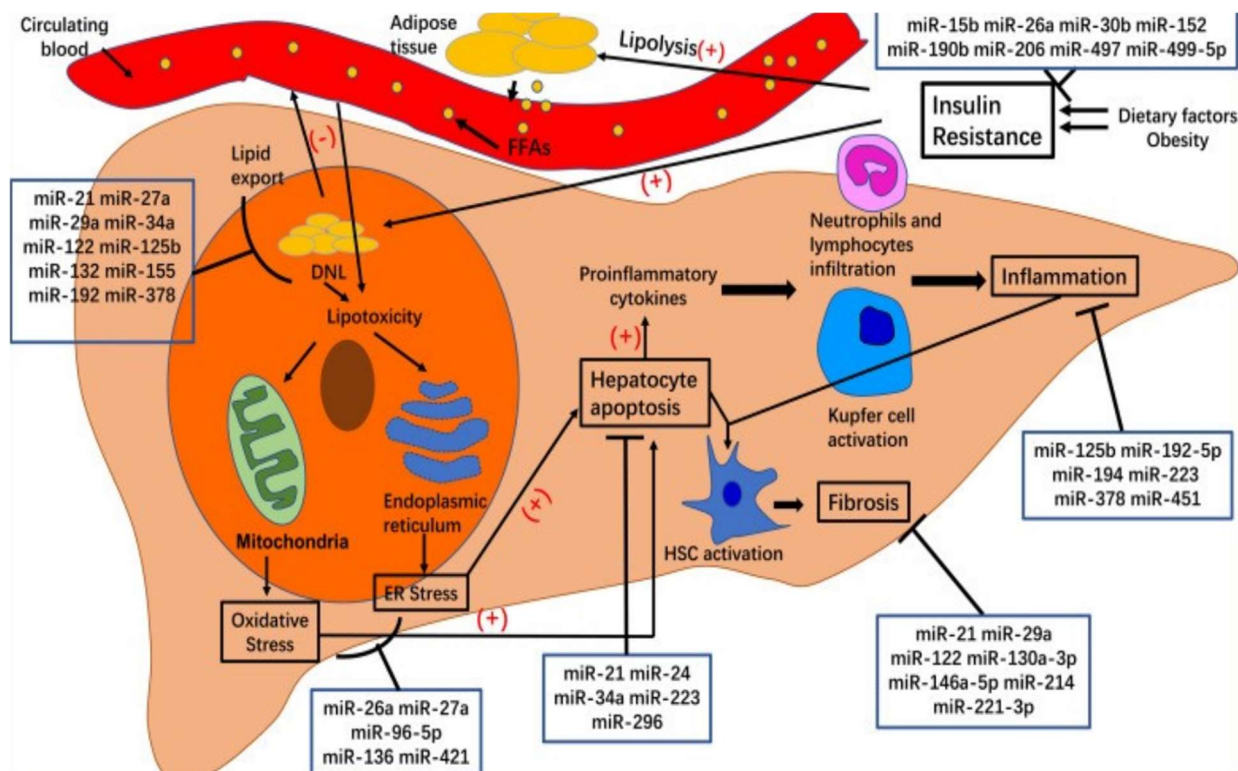


Imagem por FANG; LOU; WANG, 2021.

Já o miRNA-1914-5p, embora não apresentado na imagem, este se mostrou importante na modulação de enzimas chaves no metabolismo lipídico como malonil-CoA descarboxilase (MLYCD), acetil-CoA sintetase de cadeia longa 4 (ACSL4) e lipina (LPIN1), contribuindo para a reversão do fenótipo ativado para o fenótipo quiescente (normal) da linhagem LX-2 (DE OLIVEIRA et al., 2018). Essas evidências reforçam a importância dos miRNAs e a relevância dessas pequenas moléculas na homeostase hepática, mostrando que o desbalanço nitidamente pode se correlacionar com o aparecimento de anomalias como as DHGNA (HAN; KAUFMAN, 2016; GJORGJIEVA et al., 2019).

Embora esses dados representem uma base importante para novas estratégias terapêuticas, sua relevância em relação à DHGNA deve ser considerada com cautela, pois os mecanismos regulatórios para miRNAs podem ser altamente específicos do tecido (GJORGJIEVA, 2022). Além disso, as particularidades mecanístico-funcionais de atuação dos microRNAs, dentro do contexto da biologia dos sistemas, ainda necessitam ser melhor investigadas antes de suas aplicações terapêuticas e análises clínicas (BAFFY, 2015). Sendo assim, o estudo e caracterização de novos miRNA e seus mecanismos de ação no tecido hepático e no controle do metabolismo de lipídios, pode avançar para futuramente subsidiar o desenvolvimento dessa nova estratégia terapêutica.

1.4 Modelo de estudo de condições pró-esteatóticas: a co-cultura de células hepáticas

A necessidade de tratamentos seguros e eficazes instigou o desenvolvimento de modelos *in vivo* e *in vitro* que subsidiam a elucidação de detalhes celulares e moleculares que sustentam a DHGNA, identificar alvos potenciais e avaliar o potencial terapêutico de drogas antes de transferi-las para testes clínicos (FRIEDMAN et al., 2018; PELECHA et al., 2022). Neste sentido, os modelos celulares têm sido amplamente utilizados (ANSTEE; GOLDIN, 2006; BHATTACHARJEE et al., 2014; WANG et al., 2022), principalmente pela minimização do uso de animais na pesquisa. Nas últimas duas décadas, foi alcançado progresso significativo na criação de modelos celulares humanos de DHGNA (WANG et al., 2022). Esses modelos se baseiam no cultivo de células hepáticas em monocamadas, hepatócitos humanos primários (HHP), co-culturas de diferentes células hepáticas e plataformas de fígado manipuladas, como sistemas de perfusão (OSEINI et al., 2018). O uso de células em co-cultura que mimetizam o parênquima hepático endógeno celular e células não parenquimatosas (NPCs) e indutores de acúmulo de lipídios, do qual inclui nutrientes e metabólitos, têm sido empregados nos atuais estudos (CHO et al., 2010; MESSNER et al., 2013; WARE et al., 2018). Uma vez que, a progressão da DHGNA envolve múltiplas interações de tipo celular e remodelação do ambiente tecidual, a interação de duas ou mais células tem se tornado uma prática viável (WANG et al., 2022).

O uso experimental do modelo em co-cultura torna-se confiável principalmente pela interação célula a célula na progressão da DHGNA. Estudos com co-cultura, observaram que uma ativação das células de Kupffer por endotoxina pode desencadear a indução de citocinas inflamatórias em outros tipos de células no fígado (por exemplo, hepatócitos), que desempenham um papel vital na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por frutose (SPRUSS et al., 2011; KANURI et al., 2013). Ainda, a ativação de HSC co-cultivada foi relacionada à regulação positiva do fator regulador nuclear antioxidante relacionado ao eritróide 2 (NRF2) em hepatócitos danificado pelo acúmulo de lipídios. Esses estudos evidenciaram a interação entre o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos e a ativação das HSC com um fenótipo fibronogênico em modelos de co-cultura de esteato hepatite (YU et al., 2021).

Contudo, os dados apresentados indicam que as linhagens de células hepáticas imortalizadas cultivadas em co-cultura, podem oferecer um potencial de estudos amplo e confiável para a DHGNA. Assim, como a combinação de resultados de modelos *in vitro* bem validados e novas abordagens como as ômicas, podem resultar em ensaios mais preditivos. Além de auxiliar na compreensão de mecanismos pró-esteatóticos e sua progressão, bem como, também serem úteis no desenvolvimento de medicamentos. E embora no decorrer dos anos, tenha se observado um claro progresso no esclarecimento da etiopatogenia da DHGNA

e na busca pelo desenvolvimento de tratamentos farmacológicos, ainda há muitos desafios para elucidar os mecanismos implicados nessa doença e sua progressão afim de encontrar novas terapias (PELECHÁ et al., 2022). Portanto, a pesquisa pré-clínica básica se despona torna-se essencial para a continuidade evolutiva do conhecimento da fisiopatologia da DHGNA.

REFERÊNCIAS

- ABOUGHAZALA, ANAN. Study on Serum Cholinesterase as Marker of Chronic Liver Disease. **Al-Azhar University Journal of Virus Researches and Studies**, v. 2, n. 8, p. 1–15, 31 dez. 2020.
- AGUILERA-MÉNDEZ, A. et al. Hepatic Diseases Related to Triglyceride Metabolism. Mini-reviews In Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1691-1699, set. 2013.
- AL-ERYANI, L. et al. Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 4, p. 482–497, jun. 2015.
- ALKHOURI, N. et al. What Does the Future Hold for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis: Diagnostic Strategies and Treatment Options in 2021 and Beyond? **Hepatology Communications**, v. 5, n. 11, p. 1810–1823, nov. 2021.
- AMORIM, A.; BARBOSA, A. DE H.; SOBRAL, P. J. DO A. Hunger, Obesity, Public Policies, and Food-Based Dietary Guidelines: A Reflection Considering the Socio-Environmental World Context. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 805569, 18 jan. 2022.
- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research: Mouse models in NAFLD and NASH research. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 1, p. 1–16, 23 jan. 2006.
- ARCONZO, M.; PICCININ, E.; MOSCHETTA, A. Increased risk of acute liver failure by pain killer drugs in NAFLD: Focus on nuclear receptors and their coactivators. **Digestive and Liver Disease**, v. 53, n. 1, p. 26–34, jan. 2021.
- BAFFY, G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J. Clinical Medicine**. v. 4, p. 1977–1988, 2015.
- BAKIR, M. B, *et al.* Evaluating the therapeutic potential of one- carbon donors in nonalcoholic fatty liver disease. **Eur J Pharmacol**. v. 847, p. 72-82, 2019.
- BEN-ZUR, R. et al. Optical analytical methods for detection of pesticides. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 3–4, 1 jan. 2011.
- BESSONE, F.; RAZORI, M. V.; ROMA, M. G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 1, p. 99–128, jan. 2019.
- BHATTACHARJEE, J. et al. Role of immunodeficient animal models in the development of fructose induced NAFLD. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 219–226, fev. 2014.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; BARCELÓ, D. Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. **Science of The Total Environment**, v. 695, p. 133896, dez. 2019.
- BINATTI, E. et al. The Role of Macrophages in Liver Fibrosis: New Therapeutic Opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6649, 14 jun. 2022.

BOECKMANS, J. et al. Infections at the nexus of metabolic-associated fatty liver disease. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 7, p. 2235–2253, jul. 2021.

BRUNO, S. et al. Human Liver Stem Cells: A Liver-Derived Mesenchymal Stromal Cell-Like Population With Pro-regenerative Properties. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 644088, 26 abr. 2021.

CAI, C.; LIN, Y.; YU, C. Circulating miRNAs as Novel Diagnostic Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease : A Systematic Review and Meta-Analysis. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 2019, p. 11, 2019.

CAI, J.; ZHANG, X.-J.; LI, H. Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 1, p. 328–348, jan. 2019.

CAI, X. et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104720, maio 2020.

CAUDILL, M. A. et al. Intracellular S-Adenosylhomocysteine Concentrations Predict Global DNA Hypomethylation in Tissues of Methyl-Deficient Cystathionine β -Synthase Heterozygous Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 11, p. 2811–2818, 1 nov. 2001.

CHEN, C.-Y. A. et al. Ago–TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 11, p. 1160–1166, nov. 2009.

CHO, C. H. et al. Layered patterning of hepatocytes in co-culture systems using microfabricated stencils. **BioTechniques**, v. 48, n. 1, p. 47–52, jan. 2010.

CHOI, S. W., *et al.* Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. **Adv. Nutr.** v. 1, p. 8-16, 2010.

CHOUDHARY, N. S.; DUSEJA, A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, p. 2–2, jan. 2021.

CLARE, C. E. et al. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p. 263–287, 15 fev. 2019.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842–845, abr. 1998.

DIAUUDIN, F. N. et al. A review of current advances in the detection of organophosphorus chemical warfare agents based biosensor approaches. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 26, p. 100305, nov. 2019.

DRAZIC, A. et al. The world of protein acetylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 10, p. 1372–1401, out. 2016.

DONGIOVANNI, P.; VALENTI, L. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1026–1037, ago. 2016.

DUCKER, G. S.; RABINOWITZ, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 27–42, jan. 2017.

ESLAM, M.; GEORGE, J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 1, p. 40–52, jan. 2020.

ESTES, C. et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease: Estes et al. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 123–133, jan. 2018.

FAN, M. et al. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 4, p. 1143–1146, abr. 2013.

FANG, L. et al. Recent progress in immunosensors for pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 164, p. 112255, set. 2020.

FANG, Z.; DOU, G.; WANG, L. MicroRNAs in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1851–1863, 2021.

FARKHONDEH, T. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in organophosphate pesticide-induced neurotoxicity and its amelioration: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 20, p. 24799–24814, jul. 2020.

FERNANDES, D. P.; ERIKA, V.; COUTINHO, A. Nutrientes y compuestos bioactivos en modulación epigenética asociados a la prevención y al cáncer de combate. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2020.

FERNANDES, D. P.; ERIKA, V.; COUTINHO, A. Nutrientes y compuestos bioactivos en modulación epigenética asociados a la prevención y al cáncer de combate. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2020.

FRIEDMAN, S. L. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 24, n. 7, p. 908–922, jul. 2018.

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

GIBERT-RAMOS, A. et al. The Hepatic Sinusoid in Chronic Liver Disease: The Optimal Milieu for Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 22, p. 5719, 15 nov. 2021.

GJORGJIEVA, M. et al. MiR-22 Deficiency Fosters Hepatocellular Carcinoma Development in Fatty Liver. **Cells**, v. 11, n. 18, p. 2860, 14 set. 2022.

GJORGJIEVA, M. et al. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. **Gut**, v. 68, n. 11, p. 2065–2079, nov. 2019.

GREVENGOED, T. J. et al. An abundant biliary metabolite derived from dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids regulates triglycerides. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 6, p. e143861, 15 mar. 2021.

HAN, J. KAUFMAN, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. **J Lipid Res**, v. 57, p. 1329–38, 2016.

HIGASHI, T.; FRIEDMAN, S. L.; HOSHIDA, Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 27–42, 2017.

HOWELL, G. E. et al. Inhibition of cholinergic and non-cholinergic targets following subacute exposure to chlorpyrifos in normal and high fat fed male C57BL/6J mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 821–829, ago. 2018.

HUANG, D. Q.; EL-SERAG, H. B.; LOOMBA, R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 4, p. 223–238, abr. 2021.

ILUZ-FREUNDLICH, D. et al. The relative expression of hepatocellular and cholestatic liver enzymes in adult patients with liver disease. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 2, p. 204–208, mar. 2020.

JENSEN-CODY, S. O.; POTTHOFF, M. J. Hepatokines and metabolism: Deciphering communication from the liver. **Molecular Metabolism**, v. 44, p. 101138, fev. 2021.

JIANG, F.; PENG, Y.; SUN, Q. Pesticides exposure induced obesity and its associated diseases: recent progress and challenges. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 2, p. 119–124, jun. 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAHN, L. G. et al. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 703–718, ago. 2020.

KANG, S. H. et al. From nonalcoholic fatty liver disease to metabolic-associated fatty liver disease: Big wave or ripple? **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 257–269, 1 abr. 2021.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11963–11980, 5 jun. 2013.

KWA, F. A. A.; JACKSON, D. E. Manipulating the epigenome for the treatment of disorders with thrombotic complications. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 719–726, mar. 2018.

KMIEĆ, Z. **Cooperation of liver cells in health and disease**. Berlin ; New York: Springer, 2001.

KONDAKALA, S. et al. Effects of acute exposure to chlorpyrifos on cholinergic and non-cholinergic targets in normal and high-fat fed male C57BL/6J mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 337, p. 67–75, dez. 2017.

LAI, Z. et al. Association of Hepatic Global DNA Methylation and Serum One-Carbon Metabolites With Histological Severity in Patients With NAFLD. **The Obesity Society**. v. 00, n. 00, p. 1–9, 2019.

LAZARUS, J. V. et al. The global NAFLD policy review and preparedness index: Are countries ready to address this silent public health challenge? **Journal of Hepatology**, v. 76, n. 4, p. 771–780, abr. 2022.

LE GARF, S. et al. Metabolic Fatty Liver Disease in Children: A Growing Public Health Problem. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1915, 14 dez. 2021.

LEE, J. et al. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p. 78-88, 2017.

LI, Y. et al. EZH2-DNMT1-mediated epigenetic silencing of miR-142-3p promotes metastasis through targeting ZEB2 in nasopharyngeal carcinoma. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 6, p. 1089–1106, jun. 2019.

LIU, C. et al. Cancer-Related Triplets of mRNA-lncRNA-miRNA Revealed by Integrative Network in Uterine Corpus Endometrial Carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

LIU, J. et al. Emerging role of carboxylesterases in nonalcoholic fatty liver disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 205, p. 115250, nov. 2022.

LIU, M. et al. Aptasensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 130, p. 174–184, abr. 2019.

MAIER, S. et al. Lean NAFLD: an underrecognized and challenging disorder in medicine. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 22, n. 2, p. 351–366, jun. 2021.

MERONI, M. et al. Nutrition and Genetics in NAFLD: The Perfect Binomium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2986, 23 abr. 2020.

MENTCH, S. J.; LOCASALE, J. W. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity: One-carbon metabolism and epigenetics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1363, n. 1, p. 91–98, jan. 2016.

MESSNER, S. et al. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 1, p. 209–213, jan. 2013.

MOON, A. M.; SINGAL, A. G.; TAPPER, E. B. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 12, p. 2650–2666, nov. 2020.

NAGARAJU, R. et al. Effect of chronic exposure to monocrotophos on white adipose tissue in rats and its association with metabolic dyshomeostasis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 39, n. 9, p. 1190–1199, set. 2020.

NASSIR, F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 824, 13 jun. 2022.

NIU, L. et al. Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease. **Molecular Systems Biology**, v. 15, n. 3, mar. 2019.

OSEINI, A. M. et al. Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology International**, v. 12, n. 1, p. 6–16, jan. 2018.

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

PACHOS, P.; PALETAS, K. Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial Character of the second hit. **Hippokratia**, 13 (2) (2009), p. 128.

PAGE A, *et al.* Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape. **J Hepatol.** v. 64, p. 661-673, 2016.

PANSA, C. C.; MOLICA, L. R.; MORAES, K. C. M. Non-alcoholic fatty liver disease establishment and progression: genetics and epigenetics as relevant modulators of the pathology. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, p. 1–13, 25 nov. 2022.

PANWAR, A.; DAS, P.; TAN, L. P. 3D Hepatic Organoid-Based Advancements in LIVER Tissue Engineering. **Bioengineering**, v. 8, n. 11, p. 185, 14 nov. 2021.

PELECHÁ, M. *et al.* Cell Models and Omics Techniques for the Study of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focusing on Stem Cell-Derived Cell Models. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 86, 30 dez. 2021.

PEYRE, L. *et al.* Effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion: Epithelial–mesenchymal transition and anoikis resistance. **Toxicology**, v. 300, n. 1–2, p. 19–30, out. 2012.

PIROLA, C. J.; SOOKOIAN, S. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: advances in genetic and epigenetic implications. **Current Opinion in Lipidology**, v. 33, n. 2, p. 95–102, abr. 2022.

POISSON, J.; LEMOINNE, S.; BOULANGER, C.; DURAND, F.; MOREAU, R.; VALLA, D.; RAUTOU, P. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 212–227, 2017.

PRIEST, C.; TONTONNOZ, P. Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 12, p. 1177–1188, 9 dez. 2019.

RADA, P. *et al.* Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 9, p. 802, 25 set. 2020.

RAJAK, S. *et al.* Environmental Toxicants and NAFLD: A Neglected yet Significant Relationship. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 67, n. 8, p. 3497–3507, ago. 2022.

RAMOS, M. J. *et al.* In vitro models for non-alcoholic fatty liver disease: Emerging platforms and their applications. **iScience**, v. 25, n. 1, p. 103549, jan. 2022.

RAMOS-LOPEZ, O. Multi-Omics Nutritional Approaches Targeting Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. **Genes**, v. 13, n. 11, p. 2142, 17 nov. 2022.

RAZA, S. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. **Frontiers in Bioscience**, v. 26, n. 2, p. 206–237, 2021.

RODEN, M.; BERNROIDER, E. Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 365–383, set. 2003.

ROEHLEN, N.; CROUCHET, E.; BAUMERT, T. F. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 875, 3 abr. 2020.

ROJE, S. S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, p. 1686–1698, ago. 2006.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.177-197, jan. 2014.

RUSU, I. et al. The Implications of Noncoding RNAs in the Evolution and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-Related HCC. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12370, 15 out. 2022.

SALMENA, L. et al. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? **Cell**, v. 146, n. 3, p. 353–358, ago. 2011.

SATO, S. et al. Histone Deacetylase Inhibition in Prostate Cancer Triggers miR-320–Mediated Suppression of the Androgen Receptor. **Cancer Research**, v. 76, n. 14, p. 4192–4204, 15 jul. 2016.

SEBASTIAN-DELACRUZ, M. et al. The Role of lncRNAs in Gene Expression Regulation through mRNA Stabilization. **Non-Coding RNA**, v. 7, n. 1, p. 3, 5 jan. 2021.

SELBACH, M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 58–63, set. 2008.

SHEEDFAR, F. et al. Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Aging**, v. 6, n. 4, p. 281–295, 9 abr. 2014.

SHU, W. et al. Cellular crosstalk during liver regeneration: unity in diversity. **Cell Communication and Signaling**, v. 20, n. 1, p. 117, 8 ago. 2022.

SILVA, C. M. et al. Cellular and molecular effects of silymarin on the transdifferentiation processes of LX-2 cells and its connection with lipid metabolism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 468, n. 1–2, p. 129–142, maio 2020.

SLEVIN, E. et al. Kupffer Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 190, n. 11, p. 2185–2193, nov. 2020.

SPRUSS, A. et al. Role of the Inducible Nitric Oxide Synthase in the Onset of Fructose-Induced Steatosis in Mice. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 11, p. 2121–2135, jun. 2011.

STENEGER, P. et al. Hyperinsulinemia Enhances Hepatic Expression of the Fatty Acid Transporter Cd36 and Provokes Hepatosteatosis and Hepatic Insulin Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 19034–19043, jul. 2015.

STEVANOVIĆ, J. et al. Physical exercise and liver “fitness”: Role of mitochondrial function and epigenetics-related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease. **Molecular Metabolism**, v. 32, p. 1–14, fev. 2020.

SUN, H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 183, p. 109119, jan. 2022.

SUN, J. et al. Long noncoding RNA FGFR3-AS1 promotes osteosarcoma growth through regulating its natural antisense transcript FGFR3. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 5, p. 427–436, maio 2016.

TAKAHASHI, Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 19, p. 2300, 2012.

TARASENKO, T. N.; MCGUIRE, P. J. The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM). **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 121, n. 4, p.283-288, ago. 2017.

TEUFEL, A. et al. Comparison of Gene Expression Patterns Between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues From Patients. **Gastroenterology**, v. 151, n. 3, p. 513- 525.e0, set. 2016.

THIAGARAJAN, P.; AITHAL, G. P. Drug Development for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Landscape and Challenges. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 9, n. 4, p. 515–521, jul. 2019.

TILG, H.; EFFENBERGER, M. From NAFLD to MAFLD: when pathophysiology succeeds. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 7, p. 387–388, jul. 2020.

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

TRIVEDI, P.; WANG, S.; FRIEDMAN, S. L. The Power of Plasticity—Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 242–257, fev. 2021.

TRYNDYAK, V. P. *et al.* Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiological events in liver injury induced by a methyl-deficient diet. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, p. 411-418, 2011.

ULREY, C. L. et al. The impact of metabolism on DNA methylation. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. suppl_1, p. R139–R147, 15 abr. 2005.

UMAPATHI, R. et al. Advances in optical-sensing strategies for the on-site detection of pesticides in agricultural foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 69–89, jan. 2022.

VACHHER, M. et al. Deciphering the role of aberrant DNA methylation in NAFLD and NASH. **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e11119, out. 2022.

VALINEZHAD ORANG, A.; SAFARALIZADEH, R.; KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. **International Journal of Genomics**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1931–1934, 21 dez. 2007.

VILARINHO, S. et al. Emerging Role of Genomic Analysis in Clinical Evaluation of Lean Individuals With NAFLD. **Hepatology**, v. 74, n. 4, p. 2241–2250, out. 2021.

VOS, B. et al. Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-NAFLD): a major cause of cryptogenic liver disease. **Acta Gastroenterol. Belg**, v. 74, p. 389–394, 2011.

WAHLANG, B. et al. Insecticide and metal exposures are associated with a surrogate biomarker for non-alcoholic fatty liver disease in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6476–6487, fev. 2020.

WANG, J. et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, p. 72, dez. 2020.

WANG, L. J.; ZHANG, H. W.; ZHOU, J. Y. Betaine attenuates hepatic steatosis by reducing methylation of the MTTP promoter and elevating genomic methylation in mice fed a high-fat diet. **J Nutr Biochem**, v. 25, p. 329–336, 2014.

WANG, W. et al. Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-NAFLD) and the development of metabolic syndrome: a retrospective study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 10977, 29 jun. 2022.

WANG, Y.-D. et al. New insight of obesity-associated NAFLD: Dysregulated “crosstalk” between multi-organ and the liver? **Genes & Diseases**, p. S2352304222000071, jan. 2022.

WARE, B. R. et al. A Cell Culture Platform to Maintain Long-term Phenotype of Primary Human Hepatocytes and Endothelial Cells. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 3, p. 187–207, 2018.

World Human Organization. Obesity and Overweight (2021). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acessado em 21 de dez de 2022.

World Obesity Atlas 2022. World Obesity Federation (2022). Disponível em: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2022>. Acessado em 21 dez de 2022.

WYCKHUYS, K. A. G. et al. Agro-ecology science relates to economic development but not global pesticide pollution. **Journal of Environmental Management**, v. 307, p. 114529, abr. 2022.

XU, X. et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH). **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 287, 13 ago. 2022.

YAN, S. et al. Neonicotinoid insecticides exposure cause amino acid metabolism disorders, lipid accumulation and oxidative stress in ICR mice. **Chemosphere**, v. 246, p. 125661, maio 2020.

YANG, J. S.; PARK, Y. Insecticide Exposure and Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10132–10138, 3 out. 2018.

YAO, Q.; CHEN, Y.; ZHOU, X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 51, p. 11–17, ago. 2019.

YASUTAKE, K. et al. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: The significance of dietary cholesterol. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 44, n. 4, p. 471–477, jan. 2009.

YE, Q. et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 8, p. 739–752, ago. 2020.

YU, H. et al. Lipid accumulation-induced hepatocyte senescence regulates the activation of hepatic stellate cells through the Nrf2-antioxidant response element pathway. **Experimental Cell Research**, v. 405, n. 2, p. 112689, ago. 2021.

YUAN, F. et al. The association between rs1260326 with the risk of NAFLD and the mediation effect of triglyceride on NAFLD in the elderly Chinese Han population. **Aging**, v. 14, n. 6, p. 2736–2747, 31 mar. 2022.

YUN, Y. et al. Fecal and blood microbiota profiles and presence of nonalcoholic fatty liver disease in obese versus lean subjects. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0213692, 14 mar. 2019.

ZARGHAMRAVANBAKHSH, P.; FRENKEL, M.; PORETSKY, L. Metabolic causes and consequences of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism Open**, v. 12, p. 100149, dez. 2021.

ZHOU, F. et al. Unexpected Rapid Increase in the Burden of NAFLD in China From 2008 to 2018: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Hepatology**, v. 70, n. 4, p. 1119–1133, out. 2019.

ZHOU, L. et al. Establishment and Comparison of Juvenile Female Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2018, p. 1–14, 7 ago. 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento das doenças hepáticas gordurosas não alcóolicas possui alta complexidade, entretanto os esforços científicos para compreender de fato o seu desenvolvimento podem fornecer esclarecimentos para sua definitiva compreensão. Em nossos estudos observamos que as particularidades dos indivíduos, como a genética e etnia podem ter forte influência no desenvolvimento e na progressão da DHGNA. Juntamente com essas características individuais, o estilo de vida tem se despontado como um forte promotor e potencializador, principalmente por modular os processos epigenéticos.

Neste trabalho, foram também avaliados aspectos da atuação funcional do miR-1914-5p em modelo pro-esteatose, correlatos a via do 1 C e a processos epigenéticos, do qual foi observado que a redução do miR-1914-5p, ou seja, a inibição desta molécula, apresentou atenuar o desequilíbrio ocasionado pela presença do óleo no modelo celular. Esses resultados foram observados ao adicionar a molécula inibidora na condição celular de pró-esteatose, do qual apresentou aumento transcricional de genes atuantes na via do 1C que possivelmente proporcionou continuidade e equilíbrio as atividades metabólicas da via e como consequência equilíbrio na produção de SAM e nos processos de metilação. Ainda, a inibição do miR-1914-5p, também apresentou facilitar/aumentar o consumo exacerbado da molécula de GSH, que pode ter levado a um aumento do equilíbrio redox da célula e contribuído para a homeostasia da célula em condições de pró-esteatose. É importante salientar que a via da produção de GSH, é uma via dependente da via do 1C, e, portanto, a inibição do miR-1914-5p, apresentou modular vias chaves que podem ter proporcionado equilíbrio as atividades metabólicas das células em condições de estresse proporcionado pela presença dos ácidos graxos. Entretanto, é necessário aprofundamento da compreensão e estudo desta interação, para se elucidar de fato o papel do miRNA nestas vias, assim como no desenvolvimento da DHGNA.